



**Miljørisikovurdering  
genmodifisert mais MON 89034 x NK603  
fra  
Monsanto Company  
(EFSA/GMO/NL/2009/72)**

**1. innspillsrunde**

**Uttalelse fra Faggruppe for genmodifiserte organismer  
Vitenskapskomiteen for mattrygghet**

**7. april 2010**

**ISBN: 978-82-8082-391-5**

**VKM Report 2010: 11**

## **BIDRAGSYTERE**

Den som utfører arbeid for VKM, enten som oppnevnte medlemmer eller på *ad hoc*-basis, gjør dette i kraft av sin egen vitenskapelige kompetanse og ikke som representanter for den institusjon han/hun arbeider ved. Forvaltningslovens habilitetsregler gjelder for alt arbeid i VKM-regi.

## **VURDERT AV**

### Faggruppe for genmodifiserte organismer:

Hilde-Gunn Opsahl Sorteberg (leder), Thomas Bøhn, Askild Holck, Helge Klungland, Richard Meadow, Anne I. Myhr, Audun Nerland, Ingolf Nes, Kåre M. Nielsen, Odd E. Stabbetorp, Vibeke Thrane, Rose Vikse

### Koordinatorer i sekretariatet:

Merethe Aasmo Finne

## SAMMENDRAG

Helse- og miljørisikovurderingen av den insektresistente og herbicidtolerante maishybriden MON 89034 x NK603 (EFSA/GMO/NL/2009/72) fra Monsanto Company er utført av Faggruppe for genmodifiserte organismer i Vitenskapskomiteen for mattrygghet (VKM). VKM er bedt av Direktoratet for naturforvaltning (DN) om å vurdere miljørisiko ved en eventuell godkjenning av maislinje MON 89034 x NK603 til dyrking og frøavl. MON 89034 x NK603 ble søkt godkjent til bruk som mat og fôr i 2007, og ble i den forbindelse vurdert av Faggruppe for genmodifiserte organismer (VKM 2008b).

Risikovurderingen av den genmodifiserte maisen er basert på dokumentasjon som er gjort tilgjengelig på EUs nettside EFSA GMO Extranet. I tillegg er det benyttet informasjon fra uavhengige vitenskapelige publikasjoner i vurderingen. MON 89034 x NK603 er risikovurdert i henhold til tiltenkt bruk i EØS-området, og i overensstemmelse med miljøkravene i genteknologiloven med forskrifter, først og fremst forskrift om konsekvensutredning etter genteknologiloven. Det presiseres at de deler av den norske konsekvensutredningsforskriften som vedrører bærekraft, samfunnsnytte og etikk er utenfor VKMs mandat, og er derfor ikke vurdert av faggruppen. Videre er kravene i EU-forordning 1829/2003/EF, utsetningsdirektiv 2001/18/EF (vedlegg 2, 3 og 3B) og veiledende notat 2002/623/EF, samt EFSAAs retningslinjer for risikovurdering av genmodifiserte planter (EFSA 2006) lagt til grunn for vurderingen.

Den vitenskapelige vurderingen omfatter transformasjonsprosess, vektorkonstruksjon, samt karakterisering, uttrykk og nedarving av genkonstruksjonen. Videre er agronomiske egenskaper, potensialet for ikke tilsiktede effekter på fitness, genoverføring, samt effekter på målorganismer og ikke-målorganismer vurdert.

F<sub>1</sub>-hybriden MON 89034 x NK603 er dannet ved tradisjonell kryssingsforedling mellom to innavlede linjer, avledet av de genmodifiserte maislinjene MON 89034 og NK603.

Foreldrelinjen MON 89034 er fremkommet ved *Agrobacterium*-mediert transformasjon av umodne maisceller fra en av Monsanto's innavlede maislinjer. MON 89034-plantene har fått satt inn et rekombinant DNA-fragment med to genekspresjonskassetter, inneholdende genene *cry1A.105* og *cry2Ab2*. *Cry1A.105* er et syntetisk gen, som er sammensatt av sekvenser fra genene *cry1Ac*, *cry1Ab* og *cry1F* fra *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*. *Cry2Ab*-genet stammer fra *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Cry1A.105*- og *cry2Ab2*-genene koder for  $\delta$ -endotoksiner, som gir plantene resistens mot enkelte arter i ordenen Lepidoptera.

Foreldrelinjen NK603 uttrykker CP4-EPSPS-proteiner, som er resultat av introduksjon av *cp4-epsps*-genet fra jordbakterien *Agrobacterium tumefaciens*. Genet koder for enzymet 5-enolpyruvylsukinat-3-fosfatsyntetase, som omdanner fosfoenolpyruvat og sukimat-3-fosfat til 5-enolpyruvylsukinat-3-fosfat, en viktig metabolitt i syntesen av aromatiske aminosyrer. I motsetning til plantens enzym er det bakterielle enzymet også aktivt ved nærvær av N-fosfonometylglycin (glyfosat). De transgene plantene vil derfor tolerere høyere doser av herbicider med virkestoff glyfosat sammenlignet med konkurrerende ugras.

MON 89034 x NK603 inneholder ingen markørgener for antibiotikaresistens.

Begge foreldrelinjene som inngår i krysningen er tidligere vurdert av Faggruppe for genmodifiserte organismer (VKM 2005c, 2008a), og er også vurdert i en rekke hybridsøknader.

Dyrkingsomfanget av mais i Norge er svært begrenset, og eventuelle økologiske effekter ved introduksjon av glyfosattolerante maissorter vurderes å være ubetydelige. Bruk av glyfosat på maisarealer vil være marginal i forhold til den totale glyfosatbruken i Norge.

Bruk av det virksomme stoffet glyfosat i herbicidtolerant mais vurderes ikke å medføre høyere risiko for miljø enn for allerede godkjente bruksområder.

Stor variasjon i agro-økologiske miljø, og mangel på relevante langvarige storskala feltforsøk gjør at potensielle effekter på biodiversitet av glyfosattolerant mais i Norge er vanskelig å predikere. Glyfosat vil sannsynligvis bekjempe ugraset mer effektivt enn herbicidene som er tilgjengelige til bruk i konvensjonelle sorter. Dette vil med stor sannsynlighet medføre redusert artsdiversitet på jordbruksarealer og indirekte effekter på fauna ved at næringstilgangen blir redusert. På den andre siden vil ugrasbekjempelsen skje på et seinere tidspunkt i vekstsesongen, og ugraset som da får stå lenger kan være en viktig næringsressurs i en periode hvor det ellers er lite levende plantemateriale tilgjengelig i åkeren.

Under norske forhold vil glyfosat i voksende åker være en resistensbryter i et ensidig kornomløp og dermed redusere faren for resistensutvikling hos ugrasarter.

I Norge er det kun registrert enkeltfunn av målorganismen *Ostrinia nubilalis*, men arten er ikke rapportert som skadegjører. Det er ikke gjort observasjoner av andre målorganismer av Lepidoptera og det har ikke vært søknader om sertifisering av insekticider mot disse herbivorene.

Publiserte vitenskapelig studier viser små eller ingen negative effekter av Cry1A.105- og Cry2Ab2-proteinene på ikke-målarthropoder som lever på eller i nærheten av maisplanter. Det vurderes ikke å være risiko for rødlistede arter i Norge. Siden det ikke er godkjente *Bt*-produkter til bruk i mais i Norge, og det ikke er registrert Lepidoptera-arter som skadegjørere i mais er problematikken knyttet til resistens i målorganismene ikke relevant i norsk sammenheng.

Det finnes enkeltstudier som viser små, men signifikante effekter av *Bt*-toksin og tiltenkt pesticid på jordlevende organismer og mikrobiell samfunnsstruktur i jord. De fleste studiene konkluderer imidlertid med at disse effektene er små og forbigående sammenlignet med effekter av dyrkingsmessige og miljømessige forhold. Det er kunnskapsmangler med hensyn på effekter av toksinet på vannlevende organismer. Konsentrasjonene av *Bt*-endotoksiner er imidlertid vist å være svært lave i akvatiske systemer og eventuell eksponering på disse organismene vil være marginal i Norge.

Med unntak av insektsresistens og herbicidtoleranse, viser feltforsøk i Europa og USA små eller ingen signifikante forskjeller mellom MON 89034 x NK603 og konvensjonelle linjer med hensyn på agronomiske karakterer. Det vurderes ikke å være økt risiko knyttet til spredning, etablering og invasjon av maislinjen i naturlige habitater, eller utvikling av ugraspopulasjoner av mais i dyrkingsmiljø sammenlignet med konvensjonelle sorter.

Det er ingen stedegne eller introduserte viltvoksende arter i den europeiske flora som mais kan hybridisere med, og vertikal genoverføring vil være knyttet til krysspollinering med konvensjonelle og eventuelle økologiske sorter. I tillegg vil utilsiktet innblanding av genmodifisert materiale i såvare representere en mulig spredningsvei for transgener mellom ulike dyrkingsystemer. En slik spredning vurderes som ubetydelig.

## **NØKKELORD**

Mais, *Zea mays* L., genmodifisert maishybrid MON 89034 x NK603, EFSA/GMO/NL/2009/72, herbicidtoleranse, insektsresistens, CP4 EPSPS, Cry1A.105, Cry2Ab2, miljørisiko, forordning 1829/2003/EF,

## FORKORTELSER OG ORDFORKLARINGER

ALS	Acetolactatsyntase-enzym
AMPA	Aminometylphosphonic acid, nedbrytningsprodukt fra glyfosat.
ARMG	Antibiotikaresistensmarkør
Backcross (BC)	Tilbakekryssing. Kryssing mellom en hybridlinje (avkom fra to genetisk ulike foreldre) og en av foreldrelinjene, alternativt en genetisk ekvivalent organisme. Strategi i planteforedling for å overføre primært kvalitative karakterer, for eksempel sjukdomsresistens, til elitelinjer av både kryssbefruktede og selvpollinerte arter. Gjentatte tilbakekryssinger eliminerer det genetiske bidraget, som uønskede alleler, fra den andre donorplanten.
	BC <sub>1</sub> , BC <sub>2</sub> etc: betegnelse på 1. og 2. tilbakekryssingsgenerasjon, etc.
BLASTn	Algoritme som benyttes for homologisammenligning av nukleotidsekvenser.
BLASTP	Algoritme som benyttes for homologisammenligning av aminosyresekvenser i proteiner.
BLASTx	Algoritme som benyttes for oversetting fra kodende nukleotidsekvenser til aminosyresekvenser.
bp	Basepar
<i>Bt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Codex	FAO/WHO-organ som etablerer globale handelsstandarder for mat.
CP4	<i>Agrobacterium</i> sp. stamme CP4
CP4 EPSP	Glyfosattolerant EPSPS
<i>cp4 epsps</i>	DNA-sekvens fra <i>Agrobacterium</i> sp. stamme CP4, koder for CP4 EPSPS-protein.
Cry	Krystallproteiner fra <i>Bacillus thuringiensis</i> .
Cry1A.105	Et kimært protein som består av domener fra Cry1Ab-, Cry1F- og Cry1Ac- proteiner
Cry2Ab2	Et Cry2-klasse krystallprotein fra <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>
CTP	Kloroplasstransittpeptid
DN	Direktoratet for naturforvaltning
DNA	Deoxyribonukleinsyre (DNA)
EFSA	European Food Safety Authority
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EPSPS	5-enolpyruvylsukinat-3-fosfat-syntetase
FAO	Food and Agriculture Organization, FN's organisasjon for ernæring og landbruk
FIFRA	US EPA Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act. USAs føderale lov om insektdrepende midler, soppdrepende midler og midler mot skadedyr.
Fitness	Et individs relative evne til å føre sine gener/alleler videre til kommende generasjoner.
GAT	Glyfosat acetyltransferase-enzym
GLP	Good Laboratory Practices, retningslinjer for godt laboratoriearbeid.
Glyfosat	Bredspektret herbicid
GMO	Genmodifisert organisme
GMP	Genmodifisert plante
Herbicid	Ugrasmiddel
Locus	Spesifikk posisjon på kromosomet der et gen er lokalisert.
MALDITOF	Massespektrometrimetode for å måle molekylvekt til peptider.
MT	Mattilsynet
NDF	Neutral detergent fiber, dvs. fiberfraksjon som inneholder hemicellulose og ADF.
Northern blot	Teknikk for overføring av RNA til en membran for videre studier av overførte RNA-sekvenser.
Nucosulfuron	Smalspektret herbicid, hemmer ALS enzymer
Nær-isogen linje	Linjer eller sorter som er genetisk identiske, med unntak av ett locus eller kromosomsegment.
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
ORF	Open Reading Frame (åpen leseramme)

PCR	Polymerase chain reaction. Polymerase kjedereaksjon. Metode for å syntetisere mange kopier av en DNA-sekvens vha. primere.
Rimsulfuron	Smalspektret herbicid, hemmer ALS enzymer.
RNA	Ribonukleinsyre
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat (SDS)-polyakrylamidelektroforese. Elektroforetisk metode for separasjon av proteiner.
Southern blot	Teknikk for overføring av DNA til en membran for videre studier av overførte DNA-sekvenser.
T-DNA	DNA fra Ti-plasmidet fra jordbakterien <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . Ti-plasmidet (Transfer-DNA) overføres fra bakterien, og settes inn i plantecellenes kjernegenom. T-DNAet som overføres avgrenses av V (venstre) og H (høyre) flankesekvenser, og begrenser derfor den delen av Ti-plasmidet som overføres og gjør at resten av vektoren ikke blir satt inn i plantekromosomene.
U.S. EPA	United States Environmental Protection Agency, USAs miljøvernmyndigheter.
Utviklingsstadier hos mais:	
	<u>Vegetative stadier</u>
	VE: oppspiring
	V1: 1. blad
	V2: 2. blad
	V(n): n'te blad
	VT: synlige hannblomsterstand (tassel)
	<u>Reproduktive stadier</u>
	R1: synlige hunnblomster
	R2: 'blister'
	R3: melkematning
	R4: deigmatning
	R5: dent
	R6: fysiologisk moden
Western-blot	Metode for overføring av proteiner til en membran som binder protein.
WHO	World Health Organisation. Verdens helseorganisasjon, organ under FN.
ZM-HRA	ZM står for <i>Zea mays</i> , og HRA er et acetolaktatenzym fra mais. Enzymet er blitt endret ved at to aminosyrer er byttet ut. Enzymet er tolerant for herbicider som hemmer ALS-enzymet.

## INNHOLDSFORTEGNELSE

BIDRAGSYTERE .....	2
VURDERT AV .....	2
NØKKEWORD.....	5
FORKORTELSER OG ORDFORKLARINGER.....	6
INNHOLDSFORTEGNELSE .....	8
BAKGRUNN .....	10
OPPDRAG FRA DIREKTORATET FOR NATURFORVALTING .....	10
MILJØRISIKOVURDERING.....	12
1. Innledning.....	12
1.1. Beskrivelse av egenskap(er) og virkningsmekanismer .....	12
2. Molekylær karakterisering .....	13
2.1 Hybridproduksjon.....	13
2.2 Evaluering av foreldrelinjer .....	13
2.3.Hybriden MON 89034 x NK603.....	20
3. Komparative analyser.....	26
3.1. Valg av komparator og forsøksdesign.....	26
3.2. Agronomiske egenskaper .....	26
3.3. Delkonklusjon .....	27
4. Maisdyrking i Norge .....	30
5. Potensiale for utilsiktede effekter på fitness relatert til genmodifiseringen.....	30
6. Potensiale for genoverføring .....	31
6.1. Horisontal genoverføring .....	31
6.2 Vertikal genoverføring .....	32
7. Samspill mellom GMP og målorganismer .....	34
8. Samspill mellom GMP og ikke-målorganismer.....	35
8.2. Røddlistede arter .....	38
8.3. Delkonklusjon .....	38
9. Potensial for samspill med abiotisk miljø og eventuelle effekter på bio-geokjemiske prosesser .....	39
9.1. <i>Bt</i> -toksiner .....	39
9.2. Herbicidtoleranse .....	42
10. Potensiale for effekter på agroøkologiske forhold, dyrkingspraksis etc. ....	44
10.1. Dyrkingspraksis og herbicidregimer i mais .....	44
10.2. Direkte effekter av glyfosat på miljø.....	46



10.3. Mulige langsiktige effekter på miljø knyttet til endringer i dyrkingspraksis, bruksmønstre av plantevernmidler etc .....	48
11. Miljøovervåkingsplan.....	53
12. Vurdering av søkers dokumentasjon .....	53
KONKLUSJON .....	54
REFERANSER .....	55
VEDLEGG I.....	69

## BAKGRUNN

Faggruppe for genmodifiserte organismer i Vitenskapskomiteen for mattrygghet (VKM) er bedt av Direktoratet for naturforvaltning om å foreta en vitenskapelig vurdering av miljørisiko ved en eventuell godkjenning av maishybrid MON 89034 x NK603 fra Monsanto Company (Monsanto Europe S.A.) (EFSA/GMO/NL/2009/72) for dyrking og frøavl. MON 89034 x NK603 er søkt omsatt i EU/EØS-området under forordning (EF) Nr 1829/2003 om genmodifiserte næringsmidler og fôrvarer (artiklene 5, 17, 3(1c) og 15 (1c), og i overensstemmelse med direktiv 2001/18/EF, del C.

Søknaden ble fremmet og ble anbefalt av belgiske myndigheter i juni 2009. Dokumentasjonen knyttet til søknaden ble lagt ut på EFSA-nett 9. oktober november 2009, med frist på 90-dager for innspill fra EU- og EØS/EFTA-landene. På grunn av interne tekniske problemer besluttet imidlertid EFSA i november 2009 å forlenge høringsperioden fram til 4. februar 2010.

Monsanto Company søkte om godkjenning av MON 89034 x NK603 for bruksområdene import, videreføring, mat og fôr i 2007 (EFSA/GMO/NL/2007/38), og hybridene ble i den forbindelse vurdert av Faggruppe for genmodifiserte organismer (VKM 2008b). EUs vitenskapskomité (EFSA) leverte sin uttalelse i september 2009 (EFSA 2009a).

Foreldrelinjen MON 89034 ble søkt godkjent til bruk som mat og fôr, og til import og prosessering i 2007 (søknad EFSA/GMO/NL/2007/37), og godkjent av EU-kommisjonen 30. oktober 2009.

Foreldrelinjen NK603 ble godkjent for bruksområdene import, prosessering, mat og fôr i 2004 og 2005 under henholdsvis direktiv 2001/18/EF og Novel Foodsforordningen (EF.) Nr. 258/97.

Linjen ble videre notifisert som eksisterende produkt under forordning 1829/2003/EF i 2004. Godkjenningen av NK603 gikk ut i april 2007, og Monsanto har søkt om fornyet godkjenning fram til 2017 (EFSA-GMO-RX-NK603). Det er også søkt om godkjenning av NK603 for dyrking og frøavl under forordning 1829/2003/EF (søknad EFSA/GMO/NL/2005/22). I mai 2009 publiserte EFSA en felles risikovurdering for begge disse søknadene (EFSA 2009b). I tillegg foreligger det søknader om godkjenning av hybrider der en eller flere av foreldrelinjene inngår.

I Norge ble maislinjen NK603 innmeldt som prosessert fôrvare under den nasjonale overgangsordningen for eksisterende GM-produkter 15. mars 2006 (jfr. fôrvareforskriftens § 7a), og var i utgangspunktet tillatt å omsette på det norske markedet fram til 15. september 2008. På bakgrunn av at implementeringen av EUs GM-regelverk har tatt lengre tid enn antatt, har Mattilsynet vedtatt å forlenge dispensasjonen om krav til godkjenning fram til 15. september 2010. Notifiseringene omfatter kun prosesserte, ikke spiredyktige fôrvarer til oppdrettsfisk, og gjelder ikke husdyrfôr.

[http://www.mattilsynet.no/for/dispensasjon\\_fra\\_godkjenningskrav\\_i\\_focirc\\_rvareforskriften\\_73820](http://www.mattilsynet.no/for/dispensasjon_fra_godkjenningskrav_i_focirc_rvareforskriften_73820)

Utenfor EU/EØS-området er MON 89034 x MON NK603 godkjent for omsetning som mat og/eller fôr i Japan, Sør-Korea, Filippinene og Taiwan (Agbios 2010). I tillegg er søknader for ulike bruksområder under vurdering i flere land.

## OPPDRAK FRA DIREKTORATET FOR NATURFORVALTING

Direktoratet for naturforvaltning har i brev datert 3.7.2009 (ref. 2008/4367 ART-BI-BRH) gitt Vitenskapskomiteen for mattrygghet i oppdrag å foreta løpende miljørisikovurderinger av genmodifiserte næringsmidler og fôrvarer som faller inn under EUs forordning 1829/2003/EF, og som er relevante i forhold til den norske genteknologiloven. VKM er bedt om å vurdere miljøaspekter ved slike produkter, og på bakgrunn av vurderingene gi innspill til EFSA GMO Extranet.

Søknad EFSA/GMO/BE/2009/71, genmodifisert maislinje MON 89034 x NK603, ble lagt ut på EFSA-nett i oktober 2009. Faggruppe for genmodifiserte organismer skal, i tråd med oppdragsbrev,

utarbeide en vitenskapelig risikovurdering av MON 89034 x NK603 med hensyn på eventuelle effekter på miljø ved dyrking av maislinjen. Vurderingen av MON 89034 x NK603 skal utføres i henhold til tiltenkt bruk og i overensstemmelse med kravene i genteknologiloven med forskrifter, først og fremst forskrift 16. desember 2005 nr. 1495 om konsekvensutredning etter genteknologiloven. Videre skal kravene i EUs utsettingsdirektiv 2001/18/EF med annekser, herunder prinsippene for miljørisikovurdering i vedleggene II, III og IIIB og veiledende notat 2002/623/EF legges til grunn for vurderingen. Prinsippene er nedfelt i EFSA's retningslinjer for vurdering av genmodifiserte planter ("Guidance document of the scientific panel on genetically modified organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed") (EFSA 2006).

I henhold til oppdragsbrev fra DN skal VKM primært fokusere på miljørisiko i EØS-området, og på miljørisiko som er spesifikke for Norge. VKMs miljørisikovurderinger skal for alle søknader som gjelder dyrking av genmodifiserte linjer i EØS-området omfatte produktets miljørisiko ved eventuelle endringer i landbrukspraksis. Oppdraget omfatter både direkte miljøeffekter av bruk av tiltenkt plantevernmidler i den genmodifiserte kulturen under norske forhold, og miljørisiko som følge av endret agronomi og mulige langsiktige endringer i bruksmønstre av plantevernmidler.

VKMs foreløpige miljørisikovurdering skal også ta hensyn til søkeres forslag til generell overvåking og eventuell særskilt overvåking. I de tilfeller hvor søker ikke har foreslått særskilt overvåking, må VKM vurdere hvorvidt det er behov for særskilt overvåking. I de tilfeller hvor søker har foreslått særskilt overvåking, skal VKM vurdere hvorvidt overvåkingsplanen er egnet til å avdekke så vel umiddelbare og direkte virkninger, samt forsinkede og indirekte virkninger påvist i miljørisikovurderingen.

*Produktet som ønskes vurdert:*

Genmodifisert maishybrid MON 89034 x NK603 fra Monsanto Company (EFSA/GMO/NL/2009/72)

Unik kode: MON-89034-3 x MON-ØØ6Ø3-6

Status i EU: Søkt godkjent for bruksområdene mat, fôr, import og prosessering under forordningen (EF) Nr. 1829/2003 i 2007 (EFSA/GMO/NL/2007/38).

Frist for innspill til EFSA-nett 4. februar 2010.

Ønsket svarfrist til DN: 1. februar 2010.

# MILJØRISIKOVURDERING

## 1. Innledning

Miljørisikovurderingen av den genmodifiserte maishybriden MON 89034 x NK603 er basert på dokumentasjon som er gjort tilgjengelig på EFSA's nettside EFSA GMO Extranet. I tillegg er det benyttet uavhengige vitenskapelige publikasjoner med referee i vurderingen. Vurderingen er gjort i henhold til tiltenkt bruk, og i overensstemmelse med kravene i genteknologiloven med forskrifter, først og fremst forskrift om konsekvensutredning etter genteknologiloven. Videre er kravene i EUs forordning 1829/2003/EF og utsettingsdirektiv 2001/18/EF med annekser lagt til grunn for vurderingen.

I tråd med VKMs mandat presiseres det at vurderinger av etikk, bærekraft og samfunnsnytte i henhold til kravene i genteknologiloven og dens konsekvensforskrift ikke skal utføres av Faggruppe for genmodifiserte organismer. Faggruppen har derfor ikke vurdert mulige helse- og miljøeffekter ved dyrking og prosessering utenfor EU/EØS-området.

Faggruppe for genmodifiserte organismer har vedtatt å benytte EFSA's retningslinjer som retningslinjer for vurdering av genmodifiserte planter. Prinsippene som er lagt til grunn for vurderingen er derfor hentet fra EFSA's dokument "Guidance document of the scientific panel on genetically organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed" (EFSA 2006).

Det er kun medlemmene i faggruppen som har vurdert den genmodifiserte maisen.

### 1.1. Beskrivelse av egenskap(er) og virkningsmekanismer

Maishybriden MON 89034 x NK603 er dannet ved tradisjonell kryssingsforedling mellom to innavlede linjer, avledet av de genmodifiserte maislinjene MON 89034 og NK603.

Foreldrelinjen MON 89034 er fremkommet ved *Agrobacterium*-mediert transformasjon av umodne maisceller fra en av Monsanto's innavlede maislinjer. MON 89034-plantene har fått satt inn et rekombinant DNA-fragment med to genekspressjonskassetter, inneholdende genene *cry1A.105* og *cry2Ab2*. *Cry1A.105* er et syntetisk gen, som er sammensatt av sekvenser fra genene *cry1Ac*, *cry1Ab* og *cry1F* fra *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*. *Cry2Ab*-genet stammer fra *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Cry1A.105*- og *cry2Ab2*-genene koder for  $\delta$ -endotoksiner som gir plantene toleranse mot enkelte arter i ordenen Lepidoptera, eksempelvis maispyralide (*Ostrinia nubilalis*), "Mediterranean corn borer" (*Sesamia nonagroides*), "fall armyworm" (*Spodoptera frugiperda*), stort jordfly (*Agrotis ipsilon*), og "corn earworm" (*Helicoverpa zea*).

Foreldrelinjen NK603 uttrykker CP4-EPSPS-proteiner, som er resultat av introduksjon av *cp4-epsps*-genet fra jordbakterien *Agrobacterium tumefaciens*. Genet koder for enzymet 5-enolpyruvylsukinat-3-fosfat-syntetase, som omdanner fosfoenolpyruvat og sukinat-3-fosfat til 5-enolpyruvylsukinat-3-fosfat, en viktig metabolitt i syntesen av aromatiske aminosyrer. I motsetning til plantens enzym er det bakterielle enzymet også aktivt ved nærvær av N-fosfonometyl glycin (glyfosat). De transgene plantene vil derfor tolerere høyere doser av herbicider med virkestoff glyfosat sammenlignet med konkurrerende ugras.

Maishybriden MON 89034 x NK603 inneholder ingen markørgener for antibiotikaresistens.

## 2. Molekylær karakterisering

### 2.1 Hybridproduksjon

Hybridforedling er den dominerende foredlingsstrategien i konvensjonell foredling og sortsutvikling i mais i dag. Metodikken innebærer utvikling av innavlede, tilnærmet homozygote foreldrelinjer, som så krysses for produksjon av F<sub>1</sub>-hybridfrø. Dette gir ensartede og produktive sorter (heterosiseffekt). Den transgene hybriden MON 89034 x NK603 er dannet ved konvensjonell kryssing mellom maislinjene MON 89034 og NK603.

### 2.2 Evaluering av foreldrelinjer

#### 2.2.1 Maislinje MON 89034

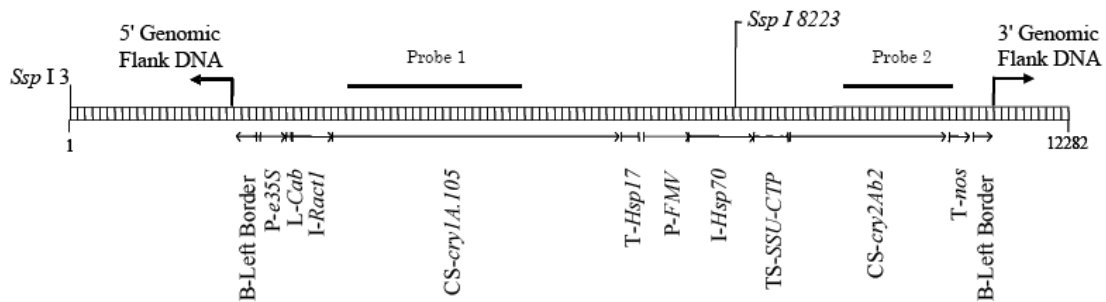
##### *Transformasjonssystem og vektorkonstruksjon*

I henhold til søkers dokumentasjon er det benyttet *Agrobacterium*-mediert transformering til produksjon av den transgene maislinjen MON 89034. Plasmidet PV-ZMIR245, som inneholder to rekombinante DNA-fragmenter, ble benyttet til transformasjon av umodne celler fra en av Monsanto umodifiserte, innavlede foredlingslinjer. Begge de rekombinante DNA-fragmentene (T-DNA I og T-DNA II) ble satt inn i maisgenomet. T-DNA I inneholder en *cryIA.105*- og en *cry2Ab2*-ekspresjonskasset, mens T-DNA II inneholder en *nptII*-ekspresjonskasset. Transformanter ble selektert ved at de overlevde og vokste i nærvær av paromomycin. Påfølgende innavl på F<sub>1</sub>-generasjonen førte til at T-DNA I (*cryIA.105/cry2Ab2*-kassetten) ble segregert fra T-DNA II (*nptII*-kassetten). MON 89034-plantene inneholder bare rekombinant DNA-fragment som inneholder *cryIA.105*- og *cry2Ab2*-genkassetten (T-DNA I), mens planter som inneholder *nptII*-kassetten (T-DNA II) ble eliminert.

##### *Karakterisering av geninnsettingen/genkonstruksjonen*

Ekspresjonskassetten som koder for Cry1A.105-protein består av promoteren *P-e35S* med et forsterkerelement, ledesequens fra blomkålmosaikkvirus (*CaMV*) 35S RNA, 5' ikke-translatert ledesequens fra hveteklorofyll a/b/ bindingsprotein (*L-Cab*) og et intron fra risaktingenet (*I-Ract1*) (tabell 1). Videre inneholder ekspresjonskassetten *cryIA.105*-sekvenser, som er optimalisert for ekspresjon i enfrøbladet planter, og 3' ikke-translatert sekvens fra hvete "heat shock"-protein 17.3 (*T-Hsp17*). En 3' ikke-translatert sekvens fra hvete avslutter transkripsjonen. *Cry2Ab2* ekspresjonskassetten uttrykker Cry2Ab2-proteinet. Ekspresjonskassetten består av 35S promoter fra brunrotmosaikkvirus (*P-FMV*), første intron (*I-Hsp70*) fra maisgenet *Hsp 70* og *cry2Ab2*-gensekvens med et modifisert kodon *CS-cry2Ab2*. *CS-cry2Ab2* er satt sammen med et kloroplastoverføringspeptid (*TS-SSU-CTP*). *TS-SSU-CTP* er sammensatt av "small subunit" fra maisgenet *ribulose 1,5-difosfat karboksylase* og genets første intron, samt sekvensen *T-nos* fra nopalinsyntasegenet (*nos*). *Nos*-genet stammer fra bakterien *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA og *T-nos* avslutter (terminerer) transkripsjonen (uttrykkes ikke i planten). DNA-fragmentet inneholder ikke antibiotikaresistensgener.

Southern blot og sekvensering er benyttet for å karakterisere det rekombinante DNA-fragmentet i planten. Molekylærbiologisk karakterisering viser at det er satt inn en enkelt kopi av DNA-fragmentet i maisens genom. Dette fragmentet inneholder følgende gener og DNA elementer (se figur 1 og tabell 1 og 2):



**Figur 1.** Rekombinant T-DNA I fragment i maisens genom.

**Tabell 1.** Beskrivelse av de innsatte genene i MON 89034.

cryIA.105 ekspresjonskassett

- P-e35S* promoter og 9 bp ledesequens fra blomkål mosaikkvirus (CaMV) 35S RNA
- L-Cab* 5' ledesequens hvete klorofyll a/b/ bindingsprotein, uttrykkes ikke i planten
- ract1* intron intron fra risaktin- genet
- CS-cryIA.105* syntetisk gen med sekvenser fra genene *cryIAb*, *cryIAc* og *cryIF*, genene stammer av *Bacillus thuringiensis*, se figur 2
- T-Hsp17* 3' DNA sekvens som avslutter transkripsjonen, kommer fra hvete "heat shock" protein 17.3, uttrykkes ikke i planten

cry2Ab2 ekspresjonskassett

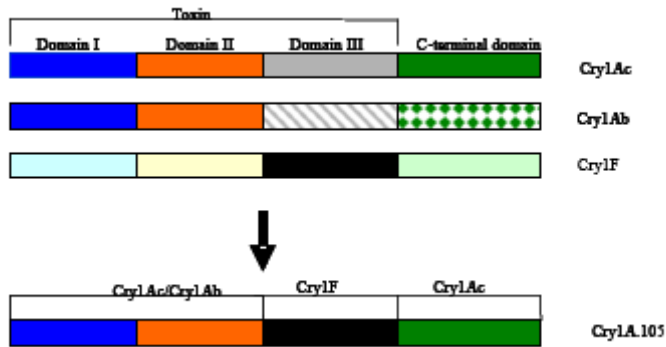
- P-FMV* 35S promoter fra brunrot mosaikkvirus
- I-Hsp 70* det første intronet fra mais "heat shock" protein-70 gen
- TS-SSU-CTP kloroplast overføringspeptid fra mais ribulose 1,5-difosfat karboksylase "small subunit," inkludert det første intronet.
- cry2Ab2* gen som koder et syntetisk Cry2Ab2-protein, fra *Bacillus thuringiensis*
- T-nos* 3' DNA sekvens som avslutter transkripsjonen, kommer fra nopaline syntase (*nos*)-genet fra *Agrobacterium tumefaciens*. Uttrykkes ikke i planten.

**Tabell 2.** Størrelsesfordeling av gener og regulatoriske elementer i MON 89034.

Genetic Element	Size (-kb)	Function (Reference)
<b>B-Left Border<sup>r1</sup></b>	0.24	239bp DNA region from the B-left Border region remaining after integration.
<b>P-<i>e35S</i><sup>99</sup></b>	0.30	Modified <i>e35s</i> promoter and 9 bp leader resulting from a recombination between the P- <i>e35s</i> and P- <i>35s</i> promoters. Differing from <i>e35S</i> in that it does not contain the duplicated enhancer element
<b>L-<i>Cab</i></b>	0.06	5' untranslated leader of the wheat chlorophyll a/b-binding protein (Lamppa <i>et al.</i> , 1985)
<b>I-<i>Ract1</i></b>	0.48	Intron from the rice actin gene (McElroy <i>et al.</i> , 1991)
<b>CS-<i>cry1A.105</i></b>	3.53	Coding sequence for the <i>Bacillus thuringiensis</i> Cry1A.105 protein (Monsanto unpublished data)
<b>T-<i>Hsp17</i></b>	0.21	3' nontranslated region of the coding sequence for wheat heat shock protein 17.3, which ends transcription and directs polyadenylation (McElwain and Spiker, 1989)
<b>P-<i>FMV</i></b>	0.56	Figwort Mosaic Virus 35S promoter (Rogers, 2000)
<b>I-<i>Hsp70</i></b>	0.80	The first intron from the maize heat shock protein 70 gene (Brown and Santino, 1995)
<b>TS-<i>SSU-CTP</i></b>	0.40	DNA region containing the targeting sequence for the transit peptide region of maize ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase small subunit and the first intron (Matsuoka <i>et al.</i> , 1987)
<b>CS-<i>cry2Ab2</i></b>	1.91	Coding sequence for a Cry2Ab2 protein from <i>Bacillus thuringiensis</i> (Donovan, 1991; Widner and Whiteley, 1989). This coding sequence uses a modified codon usage
<b>T-<i>nos</i></b>	0.25	3' termination sequence of the nopaline synthase ( <i>nos</i> ) coding sequence from <i>Agrobacterium tumefaciens</i> which terminates transcription and directs polyadenylation (Bevan <i>et al.</i> , 1983)
<b>B-Left Border<sup>r2</sup></b>	0.23	230 bp DNA region from the B-Left Border region remaining after integration

B – Border region  
 P – Promoter  
 L – Leader  
 I – Intron  
 CS – Coding sequence  
 T – Transcript termination sequence  
 TS – Targeting sequence

Den genmodifiserte maislinjen MON 89034 uttrykker insektsresistens. Bakgrunnen for insektsresistensen er at planten uttrykker bakterieproteinet Cry2Ab2, samt en variant av Cry1A-proteinet (Cry1A.105). Cry1A.105- og Cry2Ab2-proteinene, som uttrykkes av *cry1A.105* og *cry2Ab2* genene, er toksiner som gir planten resistens mot larver i sommerfuglordenen *Lepidoptera*. Cry1A.105-proteinet er et kimært protein som består av domene I og II fra Cry1Ac eller Cry1Ab, domene III fra Cry1F, og C-terminal domene fra Cry1Ac. Cry1Ab- og Cry1Ac-proteinene har 100 % aminosyresekvensidentitet med domene I og II, se figur 2. Cry1A.105-proteinets aminosyresekvensidentitet til Cry1Ac-, Cry1Ab-, og Cry1F- proteinene er henholdsvis 93,6 %, 90,0 %, og 76,7 %. Basesekvensene i *cry2Ab2*-genet og det syntetiske *cry1A.105*-genet stammer fra jordbakterien *Bacillus thuringiensis*.

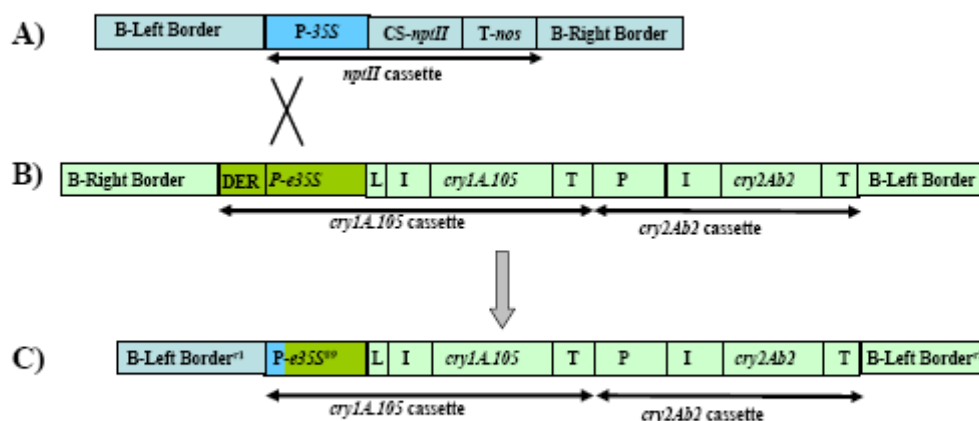


**Figur 2.** Skjematisk tegning over domeneene i *cryIA.105* og deres likhet til tilsvarende domener i *cryIAb*, *cryIAc* og *cryIF*.

Molekylærbiologiske analyser viser at det rekombinante fragmentet i planten inneholder de samme gener og genelementer som er på det tilsvarende T-DNA I-fragmentet i plasmidet PV-ZMIR245. Både Cry1A.105- og Cry2Ab2-proteinet som uttrykkes i maisplanten er undersøkt med Western-blot analyse og densitometri, SDS-PAGE og densitometri, trypsinbehandling av proteinene og peptidkartlegging med MALDITOF massespektrometri, Southern blot, analyse av N-enden til proteinet, samt glykosyleringsanalyse. Proteinene er undersøkt for bioaktivitet. Bioaktivitet-assayene viser at rensset planteprodusert Cry1A.105 og *E. coli*-produisert Cry1A.105-protein har en veksthemmende aktivitet (EC50) på målorganismen på henholdsvis  $0,0074 \pm 0,0017 \mu\text{g Cry1A.105/ml}$  diett (variasjonsbredde (vb) = 0,0055 - 0,0089) og  $0,0120 \pm 0,0062 \mu\text{g Cry1A.105/ml}$  diett (vb = 0,0053 - 0,0170). For Cry2Ab2 er tilsvarende EC50-verdier henholdsvis  $0,16 \pm 0,01 \mu\text{g Cry2Ab2/ml}$  diett (vb = 0,16 - 0,17) og  $0,16 \pm 0,04 \mu\text{g Cry2Ab2/ml}$  diett (vb = 0,13 - 0,20). Analysene viser at Cry1A.105- og Cry2Ab2- proteinene er strukturelt og funksjonelt like de *E. coli*-produserte proteinene. Det ble ikke påvist glykoliserings seter på proteinene.

Flankerende sekvenser, ca. 200 bp oppstrøms (5'-enden til genet) og ca 200 bp nedstrøms (3'-enden til genet) er sekvensert. Sekvensanalyser av det rekombinante DNA-fragmentet på 9317 bp i MON 89034 viser at flankesekvensene til fragmentet er genomisk DNA fra mais. I den genomiske 5'-enden er det påvist et innskudd på 10 bp, mens det i 3'-enden er påvist en delesjon på 57 bp i MON 89034 i forhold til umodifisert mais. Sekvensanalyser viser at både *cryIA.105* og *cry2Ab2* DNA-sekvensene er identiske med de korresponderende sekvensene på plasmidet PV-ZMIR245. Sekvenseringsdata viser også at *e35S*-promoteren som regulerer ekspresjonen av *cryIA.105* er en kortere versjon ved at det ikke inneholder det dupliserte forsterkerelementet. Høyre grense, dvs 5'-enden, til T-DNA I-fragmentet i plasmidet PV-ZMIR245 er fjernet ved innsettingen og erstattet med en forkortet versjon av venstre grense (figur 3). T-DNA II elementer, som *npII*-genet og unike T-DNA II DNA sekvenser, ble ikke påvist i MON 89034 ved bruk av Southern-blot.





**Figur 3.** Beskrivelse av rekombinasjonsprosessen som viser modifiseringen i 5'-enden av innskuddet.

*Informasjon vedr. uttrykk av introduserte gener og åpne leserammer (ORF)*

Konsentrasjonen av Cry1A.105- og Cry2Ab2-protein er målt i prøver fra MON 89034 dyrket i felt i representative områder for maisdyrking i Argentina og USA. I henhold til dokumentasjonen fra søker er det gjennomført henholdsvis 5 feltforsøk i Argentina i 2004 og 5 feltforsøk i USA vekstsesongen 2005. Ekspresjonen av Cry1A.105- og Cry2Ab2-proteinene ble målt ved hjelp av enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) i ulike plantevev og på forskjellige vekststadier. Det ble tatt prøver av blad, rot, hel plante, pollen, hunnblomster, fôrfraksjon, frø og stilk/blad (rester etter høsting).

Analyse av samtlige forsøk viste at konsentrasjonen av Cry1A.105 varierte mellom 27-850 µg/g tørrvekt (t.v.) i blad, 6,2-36 µg/g t.v. i rot, 23-570 µg/g t.v. i hel plante, 6,1-16 µg/g t.v. i pollen, 1,9-7 µg/g t.v. i frø, 19-56 µg/g t.v. i fôr og 11-85 µg/g t.v. i restfraksjon. Resultatene fra USA viste gjennomsnittlige konsentrasjoner av Cry1A.105 på henholdsvis 5,9 µg/g t.v. i frø, 520 µg/g t.v. i unge blad, 42 µg/g t.v. i fôr, 12 µg/g t.v. i pollen, 12 µg/g t.v. i rot og 50 µg/g t.v. i restfraksjon. Tilsvarende viste de nordamerikanske forsøkene gjennomsnittlige nivåer av Cry2Ab2-protein på 1,3 µg/g t.v. i frø, 180 µg/g t.v. i unge blad, 38 µg/g t.v. i fôr, 0,64 µg/g t.v. i pollen, 21 µg/g t.v. i rot og 62 µg/g t.v. i restdelen.

Teoretiske analyser av mulige polypeptider fra hver leseramme v.h.a. allergen (AD6)-, toksin (TOXIN5)- og peptid (ALLPEPTIDES)-databaser viser ingen strukturelle likheter til allergener, toksiner og farmakologiske aktive proteiner. Resultatene fra disse teoretiske analysene viser at det er lite sannsynlig at det dersom noen av disse leserammene skulle bli transkribert vil resultere i polypeptider som medfører potensielle toksiske eller allergene reaksjoner.

*Nedarving og stabilitet av innsatt DNA*

I henhold til søkers dokumentasjon er genetisk stabilitet undersøkt ved analyse av genomisk DNA fra 7 ulike generasjoner med konvensjonelle kryssinger. Resultatene viser at det rekombinante DNA-innskuddet er integrert i genomet og nedarves stabilt over generasjoner.

Fenotypisk stabilitet er vist ved spaltingsdata fra 7 kryssingsgenerasjoner og 3 generasjoner med selvbestøving. Segregasjonsanalysene (chi-kvadrat-test) viser forventet spaltingstall for insektsresistens, og det konkluderes med at det rekombinante DNA-fragmentet følger mønsteret for mendelsk nedarving av et enkelt, dominant lokus.

### Delkonklusjon

Faggruppen har tidligere vurdert de fysiske, kjemiske og funksjonelle karakteriseringene av proteinene og funnet at informasjonen er tilstrekkelig (VKM 2008a). Faggruppen konkluderer med at karakteriseringen av det rekombinante innskuddet i MON89034 er tilfredsstillende.

### 2.2.2. Maislinje NK603

#### Transformasjonssystem og vektorkonstruksjon

NK603 uttrykker CP4-EPSPS-proteiner, som er resultat av introduksjon av *cp4-epsps*-genet fra jordbakterien *Agrobacterium tumefaciens*. Genet koder for enzymet 5-enolpyruvylsikimat-3-fosfatsyntetase, som omdanner fosfoenolpyruvat og sikimat-3-fosfat til 5-enolpyruvylsikimat-3-fosfat, en viktig metabolitt i syntesen av aromatiske aminosyrer. Enzymet finnes hos alle planter og mikroorganismer, men ikke hos dyr. I motsetning til plantens enzym er det bakterielle enzymet også aktivt ved nærvær av N-fosfonometylglycin (glyfosat).

*Cp4-epsps*-genet fra *Agrobacterium* stamme CP4 ble klonet inn i plasmidet PV-ZMGT32. Det rekombinante DNA-fragmentet på 6706 basepar fra PV-ZMGT32 plasmidet inneholder to ekspresjonskassetter med et enkelt *cp4-epsps*-gen i hver kassett. Den første kassetten inneholder en aktinpromoter og et intron (r-act P+I) fra ris, et optimalisert kloroplastoverføringspeptid (CTP2), og en nopalinsyntase 3'-ende terminatorsekvens (NOS3'). Den andre ekspresjonskassetten inneholder en *e35S*-promotor, et ZmHSP70 intron *cp4-epsps* gen og en nopalinsyntase 3'-ende terminatorsekvens (NOS3'). DNA-fragmentet ble overført til embryogene maisceller ved hjelp av partikkelaksellerasjonsmetoden. DNA-fragmentet inneholder ikke antibiotikaresistensgen. Transformanter ble selektert ved at de overlevde og vokste i nærvær av glyfosat.

#### Beskrivelse av de innsatte genene

Det er benyttet Southern blot og PCR for å karakterisere det rekombinante DNA-fragmentet i planten. De molekylærbiologiske karakteriseringen viser at det er satt inn et rekombinant DNA-fragment i NK603 fôrmais. Innsatte gener og regulatoriske elementer i fragmenter er beskrevet i tabell 3 og 4.

**Tabell 3.** Beskrivelse av innsatte gener og regulatoriske elementer i NK603

---

#### Cp4epsps genkassett

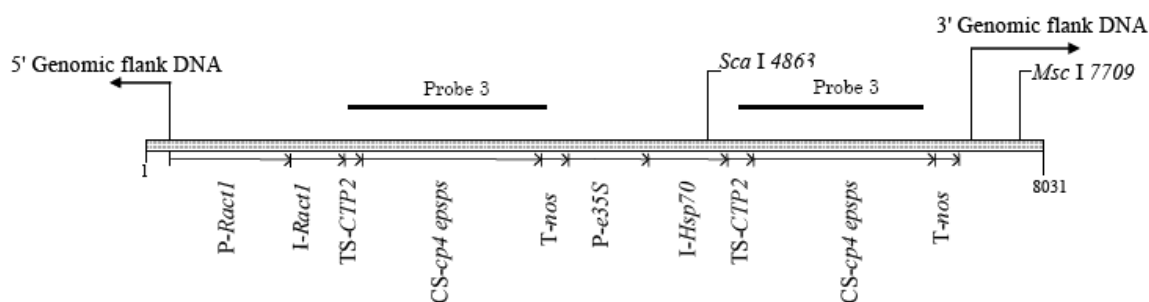
- |                           |  |
|---------------------------|--|
| a) <i>P-Ract1/I-Ract1</i> | Actingenets promoter og intron fra ris (1,4 kb)  |
| b) <i>TS-CTP2</i>         | <i>Arabidopsis thaliana</i> targeting sekvens (0,2 kb)   |
| c) <i>CS-cp4epsps</i>     | Gensekvensen <i>5 enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase</i> fra <i>Agrobacterium tumefaciens</i> stamme CP4 (1,4 kb) |
| d) <i>T-Nos</i>           | Transkripsjonstermineringssekvens fra <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (0,3 kb)  |

#### Cp4epspsl214p genkassett

- |                            |  |
|----------------------------|--|
| a) <i>P-e35S</i>           | Blomkålmosaikkvirus promoter (0,6 kb)  |
| b) <i>I-Hsp70</i>          | Heatshockprotein 70 promoter fra mais (0,8 kb)                                     |
| c) <i>TS-CTP2</i>          | <i>Arabidopsis thaliana</i> targeting sekvens (0,2 kb)                             |
| d) <i>CS-cp4epspsl214p</i> | Gensekvensen <i>epsps</i> fra <i>Agrobacterium tumefaciens</i> stamme CP4 (1,4 kb) |
| e) <i>T-Nos</i>            | Transkripsjonstermineringssekvens fra <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (0,3 kb)    |
-

**Tabell 4.** Størrelsesfordeling av gener og regulatoriske elementer i NK603.

Genetic element	Source	Size (kb)	Function
<i>cp4 epsps gene cassette (1)</i>			
<i>P-ract1/ract1</i> intron	<i>Oryza sativa</i>	1.4	5' region of the rice actin 1 gene containing the promoter, transcription start site and first intron
<i>ctp 2</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0.2	DNA sequence from chloroplast transit peptide, isolated from <i>Arabidopsis thaliana</i> EPSPS, present to direct the CP4 EPSPS protein to the chloroplast, the site of aromatic acid synthesis
<i>cp4 epsps</i>	<i>Agrobacterium</i> sp. strain CP4	1.4	The DNA sequence for CP4 EPSPS, isolated from <i>Agrobacterium</i> sp. strain CP4, which imparts tolerance to glyphosate
NOS 3'	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	0.3	A 3' nontranslated region of the nopaline synthase gene from <i>Agrobacterium tumefaciens</i> T-DNA which ends transcription and directs polyadenylation of the mRNA
<i>cp4 epsps gene cassette (2)</i>			
<i>e35S</i>	Cauliflower mosaic virus	0.6	The cauliflower mosaic virus (CaMV) promoter with the duplicated enhancer region
<i>Zmhsp70</i>	<i>Zea mays</i>	0.8	Intron from the maize <i>hsp70</i> gene (heat-shock protein) present to stabilize the level of gene transcription
<i>ctp 2</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0.2	DNA sequence from chloroplast transit peptide, isolated from <i>Arabidopsis thaliana</i> EPSPS, present to direct the CP4 EPSPS protein to the chloroplast, the site of aromatic acid synthesis
<i>cp4 epsps</i>	<i>Agrobacterium</i> sp. strain CP4	1.4	The DNA sequence for CP4 EPSPS, isolated from <i>Agrobacterium</i> sp. strain CP4, which imparts tolerance to glyphosate
NOS 3'	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	0.3	A 3' nontranslated region of the nopaline synthase gene from <i>Agrobacterium tumefaciens</i> T-DNA which ends transcription and directs polyadenylation of the mRNA



**Figur 4.** Rekombinant DNA fragment fra mais-NK603 som er integrert i 1507 x NK603 genomet.

#### Karakterisering av geninnsettingen

Molekylærbiologisk analyser av NK603 viser at det rekombinante fragmentet i planten inneholder de samme gener og genelementer som er på det tilsvarende fragmentet i bakterien. EPSPS-proteinet som uttrykkes i NK603 er, med unntak av en aminosyre, identisk med proteinet som uttrykkes i bakterien.

Ved revers transkriptase PCR (RT PCR) ble det påvist et transkripsjonsprodukt som startet inne i det rekombinante fragmentet. Transkripsjonen gikk gjennom NOS-terminatoren og inn i maisgenomets flankerende 3' område. To eller flere mRNA-molekyler ble dannet, ett på 1,4 kb (antatt å være *cp4-epsps L214P* transkriptet) og ett større enn 1,4 kb (antatt gjennomlesning av NOS). RT PCR viste at kun en svært liten del av det store fragmentet inneholdt *cp4-epsps* sekvens. I motsetning til transkriptet på 1,4 kb, kunne ikke dette transkriptet påvises med Northern blot.

Flankerende sekvenser til det rekombinante DNA-fragmentet i planten er analysert, 300 bp oppstrøms og 500 bp nedstrøms. Sammenlignende analyse med foreldrelinjen LH82xB73 viste at de flankerende sekvensene til NK603s DNA-fragment stammer fra foreldrelinjen.

Strukturell og funksjonell likhet mellom CP4 EPSPS og CP4 EPSPSL214P er undersøkt med røntgenkristallanalyse, variabel løkkestruktur i proteinet som inneholder det nye prolinet, og domenet som inneholder det nye prolinet. Disse analysene viser at CP4 EPSPS L214P proteinet er strukturelt lik CP4 EPSPS-proteinene. Analyse av enzymatisk aktivitet viser ingen forskjell mellom de to proteinene. Fordøyelighetstest viste også at begge proteinene fordøyes like raskt i simulert mage- og tarmsaft. Mengde CP4-EPSPS i korn er anslått til 0,01 % av den totale proteinmengden.

#### *Nedarving og stabilitet av innsatt DNA*

Krysning over seks generasjoner og tre selvpollineringsgenerasjon viser at det rekombinante EPSPS-fragmentet er stabilt inkorporert i maisgenomet.

#### *Delkonklusjon*

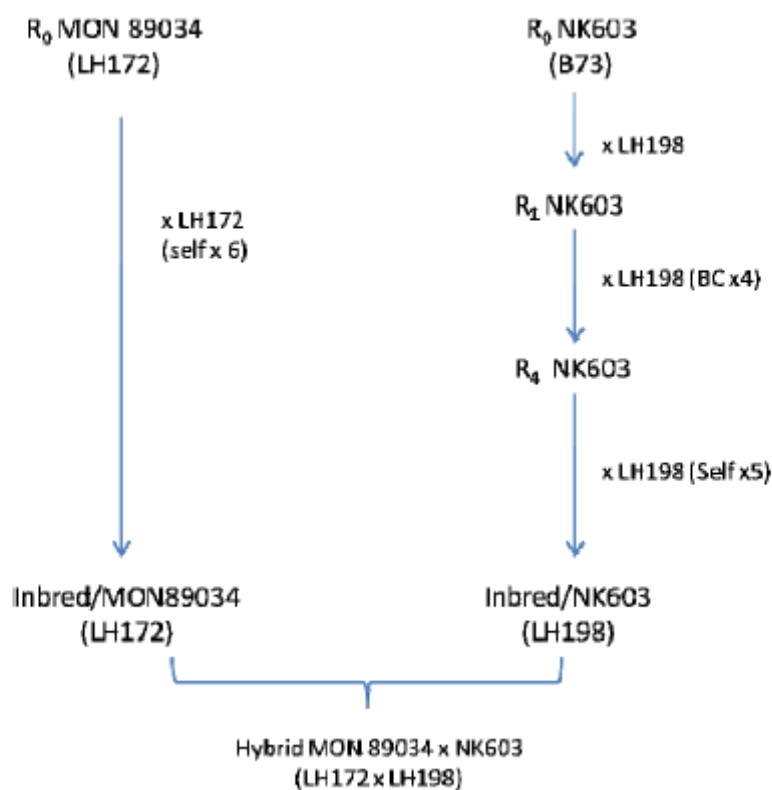
Faggruppen har tidligere vurdert de fysiske, kjemiske og funksjonelle karakteriseringene av CP4 EPSPS-proteinene og funnet at informasjonen er tilstrekkelig (VKM 2005c). Faggruppen konkluderer med at karakteriseringen av det rekombinante innskuddet i NK603 er tilfredsstillende.

### **2.3. Hybriden MON 89034 x NK603**

#### *Molekylær karakterisering*

Molekylærbiologiske analyser viser at de rekombinante fragmentene i planten inneholder de samme gener og genelementer som er i foreldrelinjene MON89034 og NK603. CP4 EPSPS-, Cry1A.105- og Cry2Ab2-ekspresjonskassetene er undersøkt med Southern-blot analyser. Disse analysene viser at integriteten til ekspresjonskassetene ikke er blitt endret ved krysning mellom MON 89034 og NK603. Flankerende sekvenser til de rekombinante DNA-fragmentene i MON 89034 x NK603 er ikke sekvensert. Siden MON 89034 x NK603 er fremkommet ved konvensjonell kryssing mellom MON 89034 og NK603 hevder søker at sekvensene i og rundt de respektive fragmentene er uendret. Monsanto har lagt ved dokumentasjon over analyser av åpne leserammer for både MON 89034 og NK603. Analysene er utført høsten 2007. Det er ikke vist at innsettingen av de rekombinante fragmentene har medført nye åpne leserammer.

Analyser av enzymatisk aktivitet av CP4 EPSPS-proteinene, dokumentert i NK603-søknad, viser ingen forskjell mellom plante- og bakterieprodusert protein. Fordøyelighetstesten viste også at CP4 EPSPS-proteinene fordøyes raskt i simulert mage- og tarmsaft. Fordøyelighetstester dokumentert i søknadene for MON 89034 viser at Cry1A.105- og Cry1Ab-proteinene fordøyes raskt i simulert magesaft. Cry1A.105 og Cry2Ab2 består av en proteaseresistent og en proteasefordøyelig del. I insektarmen vil den proteasefordøyelige delen spaltes til aminosyrer, mens den resistente delen ikke blir fordøyd. I simulert tarmsaft fra mennesker fordøyes fullengde proteinene raskt. I løpet av 24 timer ble den proteaseresistente delen av proteinene spaltet i minst 3 biter.



**Figur 5.** Kryssingsskjema for hybriden MON 89034 x NK603 (Monsanto 2009).

#### *Informasjon vedr. uttrykk av introduserte gener*

##### Feltforsøk Europa 2007

I vedlagte søknad presenterer Monsanto resultater fra en proteinekspressjonsstudie i Europa vekstsesongen 2007. Forsøkene ble lagt ut på henholdsvis tre og fire lokaliteter i representative områder for maisdyrking i Tyskland og Spania. Forsøkene inkluderte foruten testlinjen, foreldrelinjene MON 89034 og NK603, samt en ikke-transgen kontrollinje. For nærmere beskrivelse av testmateriale, forsøksdesign og – metodikk, se kapittel 3.1. Det ble tatt prøver av pollen, hunnblomster (arr), korn, blad, hel plante og rottev ved ulike tidspunkt gjennom vekstsesongen.

Ekspressjonen av CP4 EPSPS- og Cry-proteinene ble målt ved hjelp av enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) i ulike plantevev og på ulike vekststadier. Det ble tatt prøver for analyse av blad, rottev og hel plante fire ganger i løpet av vekstsesongen, tilvarende vekststadium V2-V4, V6-V8, V10-V12 og preVT. Prøver av pollen og hunnblomster ble tatt ved pollenspredning (R1) og korn ved fysiologisk modning (R6). I tillegg ble det tatt prøver av fôrfraksjon ved høsting som fôrmais (R5) og stengel/blad etter høsting av kolber. For nærmere beskrivelse av vegetative og reproduktive utviklingsstadier hos mais, se forkortelser og ordforklaringer.

Nivåene av Cry-proteiner og CP4 EPSPS i ulike plantevev og utviklingsstadier er vist i tabell 5. I gjennomsnitt over forsøkssteder var nivået av Cry1A.105-protein i blad, røtter og hel plante henholdsvis 120, 46 og 140 µg/g tørrvekt (t.v.) på vekststadium V2-V4. Gjennom vekstsesongen varierte konsentrasjonen av proteinet mellom 53 – 150 µg/g t.v. i blad, 21-46 µg/g t.v. i røtter og 56-140 µg/g t.v. i hel plante. I fôrfraksjon, stilk, hunnblomster, pollen og korn ble det gjennomsnittlige nivået av Cry1A.105 målt til henholdsvis 34, 15, 16, 8,2 og 3,1 µg/g t.v.

Uttrykket av Cry2Ab2 i MON 89034 x NK603 ble tilsvarende målt til 190 µg/g t.v. i blad, 32 µg/g t.v. i rot og 200 µg/g t.v. i hel plante. Konsentrasjonen av proteinet i blad og hel plante ble redusert utover vekstsesongen, mens nivået i rotvev var relativt konstant. I fôrfraaksjon, stilk, hunnblomster, pollen og korn ble det gjennomsnittlige nivået av Cry2Ab2 målt til henholdsvis 40, 38, 24, 0,75 og 1,9 µg/g t.v.

Tilsvarende ble nivåene av CP4 EPSPS målt til 440, 75 og 220 µg/g t.v. i henholdsvis blad, rotvev og hel plante i vekststadium V2-V4. Gjennom vekstsesongen varierte de gjennomsnittlige konsentrasjonene av proteinet mellom 160 – 440 µg/g t.v. i blad, 42-75 µg/g t.v. i røtter og 170-220 µg/g t.v. i hel plante. I fôrfraaksjon, stilk, pollen og korn ble det gjennomsnittlige nivået av CP4 EPSPS målt til henholdsvis 45, 27, 160 og 3,8 µg/g t.v.

I følge søker var nivåene av målte proteinprodukter i vegetativt vev og frø i overensstemmelse med variasjonsområdene for de respektive foreldrelinjene. Det bemerkes imidlertid at nivået av Cry2Ab2 i hel plante tidlig i vekstsesongen var om lag 100 % høyere i hybridene sammenlignet med foreldrelinjene MON 89034.

#### Feltforsøk Argentina 2004/2005

I henhold til dokumentasjon fra søker er konsentrasjonene av proteinene Cry1A.105, Cry2Ab2, og CP4 EPSPS også målt i feltforsøk i Argentina vekstsesongen 2004/2005. Resultatene fra disse analysene er også vedlagt søknad EFSA/GMO/NL/2007/38. Forsøkene ble lagt ut på 5 ulike lokaliteter i form av fullstendig randomiserte blokkdesign med 3 gjentak. En ikke-transgen maislinje med tilsvarende genetisk bakgrunn ble benyttet som konvensjonell kontroll. I tillegg var foreldrelinjene MON 89034 og NK603 inkludert i forsøkene.

I gjennomsnitt over forsøkssteder var nivået av Cry1A.105-protein i blad, røtter og hel plante henholdsvis 220, 66 og 160 µg/g tørrvekt (t.v.) på vekststadium V2-V4 (tabell 6). Konsentrasjonen av proteinet i disse vevene ble noe redusert utover i vekstsesongen (data ikke vist). I fôrfraaksjon, hunnblomster, pollen og korn ble det gjennomsnittlige nivået av Cry1A.105 målt til henholdsvis 30, 27, 9,6 og 3,1 µg/g t.v.

Uttrykket av Cry2Ab2 i MON 89034 x NK603 ble tilsvarende målt til 140 µg/g t.v. i blad, 37 µg/g t.v. i rot og 72 µg/g t.v. i hel plante. Gjennom vekstsesongen varierte konsentrasjonen av Cry2Ab2 mellom 140 – 250 µg/g t.v. i blad, 17-44 µg/g t.v. i røtter og 36-85 µg/g t.v. i hel plante. I fôrfraaksjon, hunnblomster, pollen og korn ble det gjennomsnittlige nivået av Cry2Ab2 målt til henholdsvis 33, 32, 0,66 og 1,2 µg/g t.v.

Tilsvarende ble nivåene av CP4 EPSPS målt til 240, 78 og 210 µg/g t.v. i henholdsvis blad, rotvev og hel plante i vekststadium V2-V4. Gjennom vekstsesongen varierte de gjennomsnittlige konsentrasjonene av proteinet mellom 210 – 240 µg/g t.v. i blad, 54-84 µg/g t.v. i røtter og 160-210 µg/g t.v. i hel plante. I fôrfraaksjon, pollen og korn ble det gjennomsnittlige nivået av CP4 EPSPS målt til henholdsvis 74, 390 og 8,1 µg/g t.v.

Nivåene av målte proteinprodukter i vegetativt vev og frø er i overensstemmelse med variasjonsområdene for de respektive foreldrelinjene.

**Tabell 5.** Gjennomsnittlige konsentrasjoner av Cry1A.105-, Cry2Ab2-, og CP4 EPSPS-proteiner ( $\mu\text{g/g}$  t.v.) målt i ulike plantevev av MON 89034 x NK603, og respektive foreldrelinjer. Fra feltforsøk i Europa vekstsesongen 2007.

Protein	Maislinje	Blad	Rot	Hel plante	Fôr	Hunnblomster	Pollen	Korn
		Gj.kons. (var.omr.)	Gj.kons. (var.omr.)	Gj.kons. (var.omr.)	Gj.kons. (var.omr.)	Gj.kons. (var.omr.)	Gj.kons. (var.omr.)	Gj.kons. (var.omr.)
Cry1Ab.105	MON89034	130 (85-240)	44 (27-66)	240 (160-320)	40 (31-53)	13 (4,9-22)	24 (15-30)	3,4 (1,7-5,9)
	MON89034 x NK603	120 (69-250)	46 (30-64)	140 (72-360)	34 (26-49)	16 (4,4-34)	8,2 (4,1-11)	3,1 (1,8-5,1)
Cry2Ab2	MON89034	180 (110-280)	31 (19-58)	110 (77-150)	49 (25-89)	31 (14-59)	0,59 (0,21-1,5)	1,8 (0,58-3,0)
	MON89034 x NK603	190 (83-340)	32 (18-55)	200 (100-290)	40 (25-73)	24 (7,7-95)	0,75 (0,29-2,4)	1,9 (0,74-3,0)
CP4 EPSPS	NK603	370 (270-460)	89 (48-160)	230 (120-340)	62 (31-150)	-	250 (95-450)	5,3 (1,8-10)
	MON89034 x NK603	440 (260-710)	75 (52-110)	220 (140-320)	45 (29-73)	-	160 (94-270)	3,8 (0,78-8,3)

<sup>1</sup> Prøver tatt ved utviklingstrinn V2-V4.

**Tabell 6.** Gjennomsnittlige konsentrasjoner av Cry1A.105-, Cry2Ab2-, og CP4 EPSPS-proteiner ( $\mu\text{g/g}$  t.v.) målt i ulike plantevev av MON 89034 x NK603, samt de respektive foreldrelinjene. Fra feltforsøk i Argentina vekstsesongen 2004/2005.

Protein	Maislinje	Blad	Rot	Hel plante	Fôr	Hunnblomster	Pollen	Korn
		Gj.kons. (var.omr.)	Gj.kons. (var.omr.)	Gj.kons. (var.omr.)	Gj.kons. (var.omr.)	Gj.kons. (var.omr.)	Gj.kons. (var.omr.)	Gj.kons. (var.omr.)
Cry1Ab.105	MON89034	240 (140-330)	57 (35-78)	170 (78-250)	31 (21-42)	34 (23-59)	8,4 (6,7-9,3)	2,6 (1,7-3,9)
	MON89034 x NK603	220 (62-350)	66 (48-83)	160 (97-230)	30 (10-44)	27 (13-46)	9,6 (8,0-12)	3,1 (2,6-4,3)
Cry2Ab2	MON89034	110 (60-180)	48 (23-63)	80 (41-140)	40 (30-54)	62 (29-83)	0,60 (0,38-0,83)	1,0 (0,69-1,4)
	MON89034 x NK603	140 (27-200)	37 (19-70)	72 (27-200)	33 17-53	32 (18-45)	0,66 (0,46-1,1)	1,2 (0,92-1,5)
CP4 EPSPS	NK603	220 (160-290)	97 (44-150)	190 (110-270)	63 (40-87)	-	320 (220-440)	6,7 (4,3-9,5)
	MON89034 x NK603	240 (100-340)	78 (52-140)	210 (130-190)	74 (54-100)	-	390 (180-610)	8,1 (5,8-11)

<sup>1</sup> Prøver tatt ved utviklingstrinn V2-V4.



*Nedarving og stabilitet av innsatt DNA*

Molekylærbiologiske analyser av F<sub>1</sub>-hybriden viser at det er molekylær ekvivalens og identisk kopitall mellom de rekombinante DNA-innskuddene i de respektive foreldrelinjene. På bakgrunn av disse studiene, samt analyser av proteinekspresjon og agronomiske karakterer konkluderer søker med at de rekombinante innskuddene i hybridene er stabilt integrert i genomet. Videre vises det til at F<sub>2</sub>-generasjonen som høstes, kun skal benyttes til mat og fôr, og ikke inngå i videre foredlingsarbeid. Søker vurderer derfor det derfor ikke nødvendig å undersøke stabilitet over generasjoner.

*Delkonklusjon*

F<sub>1</sub>-hybriden MON 89034 x NK603 er dannet ved konvensjonelle kryssinger mellom de innavlede maislinjene MON 89034 og NK603. Spaltingsdata og Southern-analyser indikerer at de innsatte strukturene nedarves stabilt, og at antall, struktur og organisering av disse genkonstruksjonene er ekvivalent med de som finnes i foreldrelinjene. Nivåene av Cry1A.105-, Cry2Ab2- og CP4 EPSPS-proteiner i vegetativt vev og frø er sammenlignbare med uttrykk av tilsvarende proteinprodukter i foreldrelinjene.

### 3. Komparative analyser

#### 3.1. Valg av komparator og forsøksdesign

I følge dokumentasjonen fra søker er den transgene maishybriden MON 89034 x NK603 testet i en serie feltforsøk i Europa og Sør-Amerika i en vekstsesong. I tillegg vises det til feltforsøk med foreldrelinjen MON 89034 i USA og Europa i 2004 og 2007, og forsøk med NK603 i Tyskland og Frankrike i perioden 2000-2002.

##### Feltforsøk Europa

De europeiske forsøkene var lagt ut på henholdsvis tre og fem lokaliteter i sentrale dyrkingsområder for mais i Tyskland og Spania vekstsesongen 2007. For å utvikle et plantemateriale tilpasset dyrkingsbetingelse i de ulike testområdene, ble MON 89034 x NK603 krysset inn i to ulike genetiske bakgrunner (DKC3945 og DKC5143) (figur 6). Dette er konvensjonelle maissorter med ulik tidlighet, og som er tilpasset dyrkingsforholdene i henholdsvis nordlige og sørlige regioner av Europa. DKC3945 og DKC5143 ble også benyttet som umodifiserte kontrollinjer. I tillegg var det inkludert til sammen 15 kommersielle, umodifiserte hybrid sorter som referansmateriale i forsøkene. Seks av de lokalt adapterte sortene inngikk i de tyske forsøkene, mens ni av referansesortene ble benyttet på de spanske testlokalitetene.

Testlinje, komparator og referansesorter ble plantet i fullstendig randomiserte blokkdesign med 3 gjentak på hver lokalitet. Hver forsøksrute bestod av 6 planterekker, der registreringene ble foretatt på rekke nr. 4 og 5. Søker viser til at dyrkingsregimet var i henhold til vanlig praksis i den enkelte region der forsøkene var lokaliserte. Det ble ikke sprøytet med bakterielle insekticider, men informasjon om sprøyteregimet for øvrig er ikke vedlagt. I henhold til EFSA's retningslinjer for risikovurdering av GMP (EFSA 2006) skal feltforsøk med herbicidtolerante sorter inkludere både ubehandlede blokker og blokker sprøytet med tiltenkt herbicid (er).

##### Feltforsøk Argentina

I henhold til søker ble det også utført feltforsøk ned MON 89034 x NK603 på fem lokaliteter i Argentina vekstsesongen 2004/2005. Femten kommersielt tilgjengelige hybrid sorter ble benyttet som referansmateriale i forsøkene. I tillegg ble det benyttet en ikke-transgen maislinje med tilsvarende genetisk bakgrunn som kontroll. Resultatene fra denne forsøksserien er referert i dokumentasjonen knyttet til søknad EFSA/GMO/NL/2007/38, og ble vurdert av faggruppen i 2007 (VKM 2008b).

#### 3.2. Agronomiske egenskaper

I de europeiske forsøkene ble det foretatt registreringer av til sammen 14 agronomiske og morfologiske karakterer knyttet til reproduksjon, spredning og vegetativ vekst (tabell 7). I tillegg har søker gjort registreringer av resistens mot ulike biotiske (sjukdoms- og insektsresistens) og abiotiske stressfaktorer (tørke, vind, næringsmangel etc.) på fire ulike vekststadier.

Det er foretatt separate statistiske analyser for feltene i henholdsvis Tyskland og Spania, med analyse over og innen steder for den enkelte karakter. Det er ikke foretatt statistiske sammenligninger mellom testlinje og referansesorter, men det er beregnet gjennomsnittlige maksimums- og minimumsverdier for de kommersielle linjene. Resultatene fra variansanalysen over forsøksfelt i Spania viser, med unntak av for legde (stengel), ingen signifikante forskjeller ( $p \geq 0,05$ ) mellom MON 89034 x NK603 og kontrollinjen for de undersøkte karakterene (tabell 7). Det ble registrert færre knekte planter i forsøksruter med MON 89034 x NK603 sammenlignet med umodifisert kontroll (0,0 vs. 0,5), sannsynligvis relatert til resistens mot Lepidoptera-arter. Analyse innen steder viste signifikante forskjeller på to av de fem forsøksstedene for denne variabelen. I tillegg ble det detektert signifikante forskjeller mellom test- og kontrollinjer for karakterene frøplantevitalitet og avling på en av lokalitetene. Også her ligger gjennomsnittsverdiene innenfor variasjonsområdene for referansesortene.

I det tyske forsøket ble det ikke funnet signifikante forskjeller for noen av de observerte karakterene ved analyse over lokaliteter (tabell 7). Analyse innen steder viste signifikante forskjeller ( $p \leq 0,05$ ) mellom MON 89034 x NK603 for variablene plantetetthet og kolbehøyde på ett og to av de tre forsøksstedene, men ingen av forskjellen viste et konsistent mønster. Det ble heller ikke påvist signifikante forskjeller mellom test- og kontrollinje for noen av de undersøkte karakterene knyttet til abiotisk og biotisk stress.

Når det gjelder de argentinske feltforsøkene viste statistiske analyser over forsøkssteder, med unntak av tidspunkt for pollenspredning, ingen signifikante forskjeller ( $p \geq 0,05$ ) mellom MON 89034 x NK603 og kontrollinjen for de undersøkte karakterene. Tidspunktet for 50 % pollenspredning var i gjennomsnitt 58 dager (variasjonsområde 54,7-63,3 dg) i MON 89034 x NK603 og 57 dager (54,7-60,7 dg) i umodifisert kontroll. Analyse innen steder viste signifikante forskjeller på to av fem forsøkssteder for denne variabelen. Gjennomsnittsverdien ligger imidlertid innenfor variasjonsområdene for referansesortene (54,0-68,7 dg) som var inkludert i forsøkene.

Vurdering av vitalitet hos frøplantene ble visuelt bedømt, og mangel på variasjon i datasettene fra 4 av lokalitetene gjorde at variansanalysene ble foretatt på grunnlag av observasjoner fra ett av forsøksstedene. Det ble funnet signifikante forskjeller mellom hybridene og kontrollinjen for denne karakteren, men også her ligger gjennomsnittsverdien innenfor variasjonsområde for referansesortene. Søker konkluderer med at observerte verdier av fenotypiske og agronomiske karakterer ligger innenfor forventet variasjonsområde for mais.

Monsanto viser også til at feltforsøk med foreldrelinjene MON 89034 og NK603 på en rekke lokaliteter i USA og Europa ikke har avdekket signifikante forskjeller i forhold til kontrollsorter med hensyn på agronomiske karakterer.

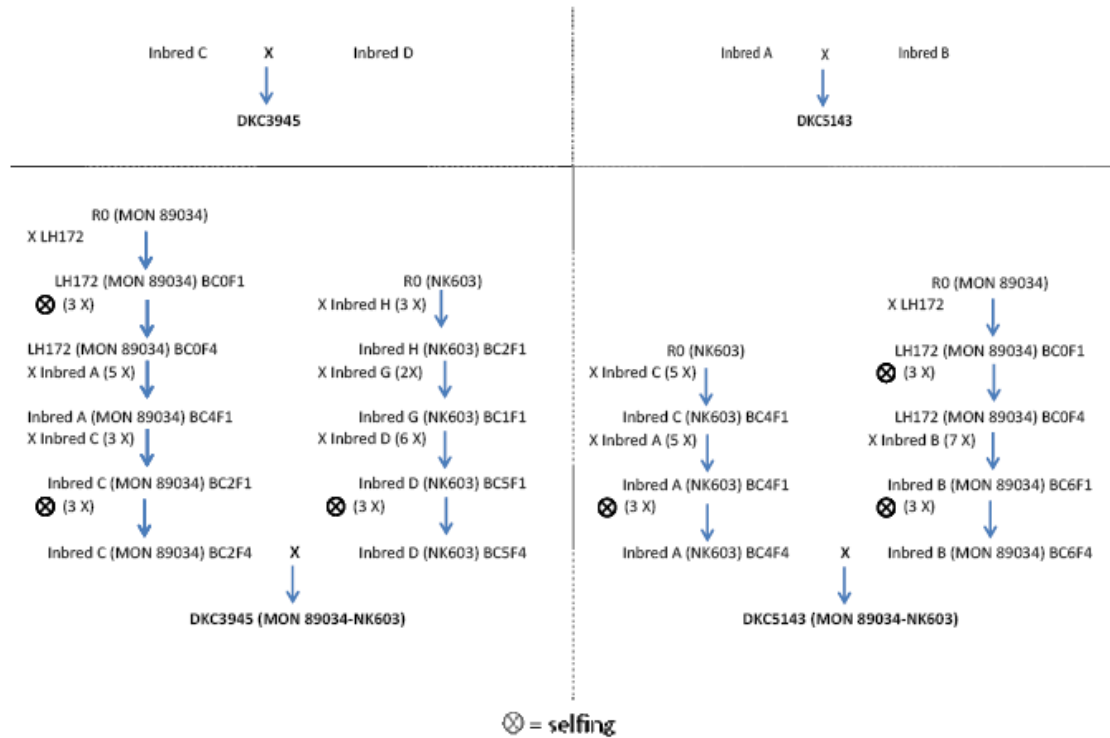
### **3.3. Delkonklusjon**

Med unntak av insektresistens og herbicidtoleranse viser feltforsøk i Europa og Sør-Amerika små eller ingen signifikante forskjeller mellom den transgene maishybriden MON 89034 x NK603 og umodifisert kontroll med hensyn på agronomiske og morfologiske karakterer.

**Tabell 7.** Resultater fra variansanalyse over steder for fenotypiske karakterer for testlinjen MON89034 x NK603, umodifisert kontroll, samt kommersielle, umodifiserte referansesorter. Fra feltforsøk i Tyskland og Spania vekstsesongen 2007.

Fenotypiske karakterer	Feltforsøk Tyskland				Feltforsøk Spania			
	MON 89034 x NK603	Kontroll	Referansesorter		MON 89034 x NK603	Kontroll	Referansesorter	
			Min.	Max.			Min.	Max.
Frøplantevitalitet (V2-V4) (0-9)	5,7	5,8	4,7	7,3	2	2,1	1,0	3,0
Plantetetthet (V2-V4) (#/rute)	93	93,4	75,7	100,0	78,9	79,1	43,2	79,7
Tidlighet (antall dager til 50 % pollenspredning)	71	71,4	66,0	73,3	81,5	81,8	75,0	91,0
Tidlighet (antall dager til 50 % blomstring.)	70,1	70,3	65,0	73,3	76,8	77	69,0	88,0
Andel grønne pl. (0-9)	5,8	5,3	2,8	6,3	9	9	8,7	9,0
Kolbehøyde (cm) <sup>1</sup>	81,1	84,7	63,1	118,3	98,1	97,6	83,0	126,2
Plantehøyde (cm)	195	203,6	177,9	233,7	194,9	196,2	165,0	226,2
Kolbetap (#/rute)	0,0 <sup>2</sup>	0	0,0	0,0	2,5	1,9	0,0	13,3
Legde- stengel (#/rute)	0,0 <sup>2</sup>	0	0,0	0,0	0,0*	0,5	0,0	0,3
Legde – rot (#/rute)	0,0 <sup>2</sup>	0	0,0	0,0	0,1	0,3	0,0	0,3
Plantetetthet ved høsting (#/rute)	76,6	76,4	69,2	76,4	77,7	76,9	41,7	80,3
Råte kolbe/frø (0-9)	0,0 <sup>2</sup>	0,0 <sup>2</sup>	0,0	0,0	0,0 <sup>2</sup>	0,0 <sup>2</sup>	0,0	0,0
Stengelråte (0-9)	0,0 <sup>2</sup>	0,0 <sup>2</sup>	0,0	0,0	0,0 <sup>2</sup>	0,0 <sup>2</sup>	0,0	0,0
Avling (t/ha)	6,1	6,4	5,1	9,3	10,4	10,2	5,7	11,7

<sup>1</sup> Avstand fra basis til nodium der kolben er festet, <sup>2</sup> Data ikke analysert pga mangel på variasjon i datasettene.



**Figur 6.** Kryssingsskjema for produksjon av to ulike testlinjer av MON 89034 x NK603. MON 89034 x NK604 er krysset inn i ulike genetiske bakgrunner, DKC3945 for testing i Tyskland og DKC5143 for testing i Spania.

## 4. Maisdyrking i Norge

Norge er i utkanten av dyrkingsområdet for mais, og dyrkingsomfanget er svært begrenset. Det foreligger ingen offisiell statistikk over det samlede maisarealet i Norge, men i henhold til tall fra SSB ble det i 2008 dyrket 1039 dekar sukkermais til konsum (SSB 2009). Informasjon fra ulike frøfirma viser at de tre siste årene har vært dyrket fôrmais på om lag 2000-2400 dekar, tilsvarende under 0,1 % av kornarealet (Netland 2010). Det er ikke registrert produksjon av økologisk mais eller maisarealer under omlegging til økologisk drift (<http://www.debio.no>). Maisproduksjonen er hovedsakelig lokalisert sør på Østlandet og på Sør-Vestlandet. De største arealene av mais ligger i fylkene Østfold og Vestfold. Det foregår også noe dyrking av fôrmais i Agder og Rogaland.

Fôrmais er særlig egnet for storfe, og med avlinger på 800-1000 kg tørrstoff pr. dekar gir fôrmais lønnsom produksjon og et energirikt tilskudd som kan erstatte kraftfôr. Når vekstsesongen er lang nok gir mais store avlinger og et godt, smakelig og næringsrikt fôr som kan øke grovfôropptaket. Blir imidlertid vekstsesongen for kort, slik at kolbene ikke får tid til å utvikle seg, kan fôrenhetskonsentrasjonen bli svært lav (0,75 FEm/kg TS; <http://www.grovfôrnett.no>).

Resultatene fra forsøksdyrking med fôrmais i ulike deler av landet viser store forskjeller i avling og kvalitet både mellom år og steder. Nesheim (2008) rapporterer om tilfredsstillende avlinger av fôrmais i Nord-Trøndelag ved bruk av plastdekke (1100 kg t.s. per dekar). Andre undersøkelser har konkludert med at med dagens sortsmateriale er fôrmaisproduksjon i Trøndelag og Rogaland et risikoforetak, også dersom en tar i bruk intensive dyrkingsmetoder (Bakken *et al.* 2005). I denne undersøkelsen, der en testet et utvalg tidlige sorter på ulike lokaliteter i Sør- og Midt-Norge, ble det konkludert med at selv i de beste jordbruksområdene langs Oslofjorden vil det være risiko for avlingssvikt og maisavlinger av varierende kvalitet.

Interessen for mais som kommersiell fôrvekst har vært økende de siste årene. Mais er en lite arbeidskrevende kultur, og nye og tidligere sorter, samt utvikling av en kostnadseffektiv teknologi for såing under plast, har gjort at flere dyrkere har ønsket å supplere tradisjonelt grovfôr med surfôr av mais. Det forventes imidlertid ikke noen sterk økning i maisdyrkingen i Norge uten at det skjer en ytterligere forbedring av sortsmaterialet og teknologi som gjør at en kan så tidligere. I de viktigste husdyrdistriktene er imidlertid vekstsesongen for kort til at fôrmais vil kunne bli et reelt alternativ til annen fôrproduksjon (Netland 2010). Klimaendringer, som medfører lengre vekstsesong og høyere gjennomsnittstemperaturer, kan imidlertid på sikt utvide dyrkingsarealet for mais i Norge.

## 5. Potensiale for utilsiktede effekter på fitness relatert til genmodifiseringen

Mais er en ettårig kulturplante som har gjennomgått langvarig og systematisk foredling. Planten krever omfattende kultiveringstiltak, og er generelt ikke i stand til spredning, overlevelse og etablering utenfor dyrket mark. Frøene er ubeskyttet, sitter godt festet til kolben, omsluttet av modifiserte blad. Planten er uten evne til naturlig frøspredning, og eventuell frøspredning er primært knyttet til høsting, transport og prosessering. Fôrmais, brukt som surfôr, dominerer maisdyrkingen i Norge og kolbene høstes før frømodning.

Spredning og overlevelse hos mais påvirkes av flere faktorer. Maisfrø mangler frøkvile og stiller store krav til spiretemperatur (OGTR 2008). Videre har maisplantene lav frosttoleranse, liten konkurransevne og er mottakelige for angrep av ulike plantepatogener og herbivorer. I store deler av Europa vil ikke frø og frøplanter av mais overleve de lave vintertemperaturene (Gruber *et al.* 2008). I sørlige deler av Europa kan spillfrø som tapes før og under høsting overvintré og spire påfølgende vekstsesong. Dette betinges imidlertid av tørre og varme værforhold etter høsting (Devos *et al.* 2009). I en undersøkelse av forekomsten av transgene spillplanter i konvensjonelle maisfelt i Spania ble det funnet store variasjoner i tetthet av spillplanter, fra <30 til over 8000 spillplanter pr. ha (tilsvarende om

lag 10 % av ordinær plantetetthet) (Melé *et al.* 2007; Palauelmás *et al.* 2009). Planter som når blomstringsstadiet kan lokalt krysspollinere naboplanter, men Palauelmás *et al.* (2009) konkluderer med at de i liten grad bidrar til utilsiktet innblanding av i avlingen. Tap av heterosis (hybridstyrke) gjør at spillplanter av mais er lite vitale og produserer få kolber, ofte uten frø.

Høy grad av domestisering gjør at mais ikke er persistent og i stand til å overleve som ugras/forvillede populasjoner utenfor dyrkingsområder. Til tross for omfattende dyrking av mais over mange år i Europa, er det ikke påvist noen risiko knyttet til spredning, etablering og invasjon av naturlige habitater eller andre arealer utenfor jordbruksområder (COGEM 2008; Devos *et al.* 2009). Det er ingen stedegne eller introduserte viltvoksende arter i den europeiske flora som mais kan hybridisere med (OECD 2003).

Herbicidtoleranse kan bare betraktes å være en selektiv fordel for den transgene planten på arealer der det benyttes herbicider med virkestoff glyfosat. Tilsvarende vil resistens mot visse skadegjørere i ordenen Lepidoptera representere en potensiell fordel der målorganismene er tilstede under dyrking. Overlevelse og spredning av mais til andre habitater i Europa er imidlertid hovedsakelig begrenset av dårlig konkurransevne, manglende frøkvile, mottakelighet for sykdom og liten toleranse for lave temperaturer. Undersøkelse av fenotypiske karakterer som er foretatt av søker i Tyskland, Spania og Argentina viser ingen forskjeller mellom den insektresistente og herbicidtolerante maishybriden og konvensjonelle sorter med tilsvarende genetisk bakgrunn for disse karakterene. Det er ingen indikasjoner på at de introduserte egenskapene i MON 89034 x NK603 og avkomstlinjer vil medføre økt fitness og økt evne til overvintring eller etablering av ugraspopulasjoner utenfor dyrkingsmiljø i forhold til konvensjonelle maissorter.

## 6. Potensiale for genoverføring

En forutsetning for genspredning er tilgjengelige veier for overføring av genetisk materiale, enten via horisontal genoverføring av DNA, eller vertikal genflyt i form av frøspredning og krysspollinering. Eksponering av mikroorganismer for rekombinant DNA skjer under nedbryting av plantemateriale på dyrket mark og/eller pollen i åkrer og omkringliggende arealer. Rekombinant DNA er også en komponent i en rekke mat- og fôrprodukter som er avledet av plantemateriale fra den transgene sorten. Dette medfører at mikroorganismer i fordøyelseskanalen hos mennesker og dyr kan eksponeres for rekombinant DNA.

Siden mais ikke har viltvoksende populasjoner eller nærstående arter utenfor dyrking i Europa, vil vertikal genoverføring være knyttet til krysspollinering med konvensjonelle og eventuelle økologiske sorter. I tillegg vil utilsiktet innblanding av genmodifisert materiale i såvare representere en mulig spredningsvei for transgener mellom ulike dyrkingssystemer. Risiko for pollenspredning fra spillplanter vil være helt marginal under norske dyrkingsbetingelser. Alle varieteter av mais som produseres i Europa er innbyrdes fertile.

### 6.1. Horisontal genoverføring

Data fra tilgjengelige eksperimentelle studier viser at genoverføring fra transgene planter til bakterier etter all sannsynlighet inntreffer svært sjelden under naturlige forhold, og at denne overføringen forutsetter sekvenshomologi mellom overført DNA og bakterien (EFSA 2004b, 2009c; VKM 2005a).

Ut fra dagens vitenskapelige innsikt med hensyn til barrierer for genoverføring mellom ubeslektede arter og flere års forskning for om mulig å framprovosere tilfeldig overføring av genetisk materiale fra planter til mikroorganismer er det lite som tyder på at transgenene i MON 89034 x NK603 skal kunne overføres til andre enn naturens kryssingspartnere ved detekterbare frekvenser i laboratoriestudier. Det er gjort forsøk som ser på stabilitet og opptak av DNA fra tarmkanalen hvor mus er oralt tilført M13 DNA. Det tilførte DNAet var sporbart i avføring opp til syv timer etter fôring. Svært små mengder av

M13 DNA (<0.1 %) kunne spores i blodbanene i en periode på maksimum 24 timer, mens M13 DNA ble funnet i opptil 24 timer i lever og milt (Schubbert *et al.* 1994). Ved oralt inntak av genmodifisert soya er det vist at DNA er mer stabilt i tarmen hos personer med utlagt tarm sammenlignet med kontrollgruppen (Netherwood *et al.* 2004). I kontrollgruppen ble det ikke påvist GM DNA i feces. Nielsen *et al.* (2000) og De Vries & Wackernagel (2002) har undersøkt persistens av DNA og opptak av GM DNA i jord. I disse laboratorieforskningene ble det påvist svært små mengder DNA som var overført fra planter til bakterier.

Disse mengdene må imidlertid multipliseres med skalaen for dyrking, som er svært omfattende. I studiene til De Vries & Wackernagel var forutsetningen for overføring sekvenshomologi mellom plantetransgenet og mottagerbakterien. De innsatte genene i planten har sin opprinnelse fra jordbakterier og sekvenshomologi vil derfor være stor i forhold til disse. I hvilken grad det forekommer tilfeldig sekvenshomologi mellom plantetransgener og andre naturlig forekommende bakterier er usikkert, men siden de fleste transgenene inneholder rekombinerte DNA-sekvenser fra jordbakterier kan dette ikke utelukkes (Bensasson *et al.* 2004)

Med bakgrunn i opprinnelse og karakter/egenskaper av de innsatte genene og mangel på seleksjonspress i fordøyelseskanal og/eller miljøet, er sannsynligheten for at horisontal genoverføring vil gi selektive fordeler eller økt fitness på mikroorganismer svært liten (Nielsen 2003). Det er derfor usannsynlig at gener fra MON 89034 x NK603 vil etableres stabilt i genomet til mikroorganismer i miljøet eller i fordøyelseskanalen hos mennesker eller dyr. Ut fra tilgjengelig kunnskap og begrensinger i metodikk (Nielsen & Townsend 2004) kan det ikke utelukkes at horisontal genoverføring vil skje.

## 6.2 Vertikal genoverføring

Mais er primært en fremmedbefruktende art med vindspredning av pollenet. Bier og humler samler pollen fra mais, men hunnblomstene mangler nektar og pollinering via insekter ansees for lite sannsynlig (Tolstrup *et al.* 2003; Malone & Burgess 2009). Mais er normalt protandrisk, dvs. at pollenet utvikles og spres før hunnblomstene åpner seg. Innen samme plante kan en imidlertid ha en viss overlapping av perioden for frigjøring av pollen og modning av arret, noe som gir mulighet for sjølbefruktning. Under normale forhold er frekvensen av sjølpollinering under 5 prosent (Eastham & Sweet 2002).

Mais frigjør store mengder pollen, tilsvarende 14-50 millioner pollenkorner pr. plante (Treu & Emberlin 2000), og sammenlignet med andre vindpollinerte arter er pollenkornene til mais relativt store (diameter 90-100 µm) og tunge (0,25 µg) (ref. Emberlin *et al.* 1999). Pollenspredningen foregår normalt over 5-8 dager, med et variasjonsområde på 2-14 dager. Pollenets levedyktighet varierer imidlertid sterkt med miljøforholdene. Normalt er pollenet spiredyktig i om lag 24 timer, men ved lave temperaturer og høy relativ luftfuktighet er det registrert levedyktig pollen opp til 9 dager etter frigjøring (Emberlin *et al.* 1999). Under norske forhold kan en derfor forvente at maispollen gjennomsnittlig har lengre levetid enn det som ligger til grunn for de fleste studiene som er gjort av utkryssing i mais (VKM 2006).

Det finnes en omfattende litteratur på pollenmigrering og utkryssing i mais, både mellom konvensjonelle sorter, og mellom transgene og konvensjonelle sorter. Betydelige metodiske forskjeller mellom studiene og påvirkning av ulike miljøfaktorer gjør imidlertid sammenligning av forskningsresultater vanskelig. I tillegg til direkte målinger av pollenkonsentrasjon i ulike avstander fra pollenkilden, er det benyttet ulike kvalitative og kvantitative metoder til å estimere faktisk utkryssing (fenotypiske markører, proteinanalyse, molekylære markører, kvantitativ DNA-analyse) (Devos *et al.* 2005). På bakgrunn av empiriske data har det de seinere årene vært utviklet matematiske modeller for simulering av potensialet for utkryssing under ulike betingelser.



Omfanget av utkryssing mellom sorter vil avhenge av en rekke biologisk og fysiske parametere (Hüsken *et al.* 2007; Sanvido *et al.* 2008). Dette gjelder både avstand mellom donor- og mottakerpopulasjonene og relativ størrelse, utforming og orientering av dyrkingsfeltene. Størrelsen på henholdsvis donor- og mottakerfeltet vil ha betydning for mengde konkurrerende pollen og dermed faktisk utkryssing (Ingram 2000; Devos *et al.* 2005). Tilsvarende vil en buffersone med samme landbruksvekst produsere konkurrerende pollen, i tillegg til å være en fysisk hindring for vindspredt pollen mellom feltene, og redusere innkryssingsrater effektivt. Graden av utkryssing vil også avhenge av hvordan resipientfeltet er utformet. Forsøk har vist at avlange og grunne dyrkingsfelt gir betydelig høyere utkryssingsfrekvenser sammenlignet med smale og dype felt med samme areal.

Videre påvirkes utkryssingsfrekvensene av pollenets vitalitet og levedyktighet, størrelsen på reproduksjonsapparatet (pollenproduksjon og utvikling av hunnblomst), synkronitet mellom pollendonor og pollenmottaker, topografiske forhold, vegetasjon, samt klimatiske forhold som temperatur, vindstyrke, vindretning og nedbør. Resultater fra EU-prosjektet SIGMEA identifiserer dyrkingsavstand, synkronitet i blomstring og dominerende vindretning som de viktigste faktorene som påvirker krysspollinering i mais (Hüsken *et al.* 2007; SIGMEA 2009). Ved vurdering av graden av utkryssing må en i tillegg ta i betraktning tiltenkt bruksområde for planten. Når det gjelder fôrmais høstes normalt hele planten og vegetativt vev som ikke påvirkes av krysspollineringen, vil utgjøre en stor del av avlingen (avhengig av sort og modningsnivå).

Som hos andre vindbestøvede arter vil pollenspredningen hos mais følge en leptokurtisk fordeling. På grunn av pollenets egenskaper og størrelse vil det aller meste av pollenet avsettes i relativ kort avstand fra pollenkilden og ha en kort 'flight range' (Jarosz *et al.* 2005). Vertikale vinder/luftstrømmer eller vindkast under pollenslipp kan imidlertid bringe pollenet opp i høyere luftlag og resultere i at maispollenet transporteres over betydelige avstander. Konsentrasjonen av spiredyktig pollen reduseres med høyde og avstand fra pollenkilden (Aylor *et al.* 2006; Jarosz *et al.* 2005). Det er registrert pollinering mellom maissorter opp til 800 meter, men de fleste undersøkelser av spredningsmønsteret hos denne arten viser at det aller meste av pollenet avsettes innen 50 m fra donorplantene (Halsey *et al.* 2005; Brookes *et al.* 2004; Devos *et al.* (2005); van de Wiel *et al.* 2006, Hüsken *et al.* 2007; Sanvido *et al.* 2008). Devos *et al.* (2005) har gjennomgått en rekke forsøksresultater fra ulike studier av genspredning i mais. I undersøkelsene er det benyttet ulike metodikk for å estimere faktisk utkryssing i felt. I tillegg er det inkludert to matematiske modeller som simulerer effekter av dyrkingsavstand på utkryssing (MAPOD, SCIMAC). Oversikten viser at ved isolasjonsavstander på 300 m lå utkryssingsfrekvensene mellom 0 og 0,5 %. I de tilfeller der avstanden mellom donor- og mottagerplanter var henholdsvis 200 og 100 meter ble var frekvensene henholdsvis 0,3 -1,2 %, og 0-1 %. Ved avstander under 50 meter ble det registrert utkryssingsfrekvenser mellom 0,26 og 1 %.

I en seinere studie har Sanvido *et al.* (2008) vurdert en rekke undersøkelser av utkryssing i mais, og foreslått relevante kriterier for evaluering av slike studier med hensyn på definere vitenskapelig baserte isolasjonsavstander. Kriteriene for evaluering omfatter både biologiske og fysiske parametere, samt relevante dyrkingsbetingelser. Med utgangspunkt i EUs gjeldende terskelverdi for utilsiktet og teknisk uunngåelig innblanding på 0,9 % i mat og fôr, har gruppen foreslått isolasjonsavstander på 20 og 50 m for henholdsvis fôr- og sukkermais. I nasjonale sameksistensregelverk i EU varierer kravene til isolasjonsavstander mellom 25 - 600 m og 50-600 m til henholdsvis konvensjonell og økologisk mais (EC 2009).

I utkast til norsk regelverk for sameksistens er det foreslått et krav om minimum 200 meter avstandsisolering mellom dyrkingsareal med henholdsvis transgen og konvensjonell/økologisk mais. Faggruppe for genmodifiserte organismer har tidligere uttalt at foreslått dyrkingsavstand på 200 meter gir en tilstrekkelig sikkerhetsmargin, og anser at det er svært liten sannsynlighet for at den prosentvise innblandingen av transgener vil overstige 1 % med dette tiltaket (VKM 2006). Generelt anser faggruppen at det under slike forutsetninger er mer sannsynlig at den prosentvise innblandingen vil være under 0,3 % enn i intervallet 0,3 til 1,0 %. Det understrekes imidlertid at dette avhenger av forhold som dyrkingsfeltenes relative størrelse og utforming, samt eventuelle buffersoner.

Feltforsøk viser ingen indikasjoner på at karakterer knyttet til overlevelse, reproduksjon og spredning er endret hos MON 89034 x NK603 i forhold til ikke-transgene linjer. Pollenproduksjon og pollenets levedyktighet forventes ikke å påvirkes av genmodifiseringen. Det er derfor ikke sannsynlig at utkryssingsfrekvensene til andre sorter vil være forskjellig fra konvensjonelle sorter.

## 7. Samspill mellom GMP og målorganismer

Maishybriden MON 89034 x NK603 er dannet ved konvensjonelle kryssninger mellom to innavlede linjer, avledet av maislinjene MON 89034 og NK603.

Den innsatte genkonstruksjonen i foreldrelinjen MON 89034 inneholder to bakterielle gener; *cry1A.105* og *cry2Ab2*. *Cry1A.105* er et syntetisk gen, som er sammensatt av sekvenser fra genene *cry1Ac*, *cry1Ab* og *cry1F* fra *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*, mens *cry2Ab*-genet stammer fra *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*. De innsatte *cry*-genene koder for  $\delta$ -endotoksiner som gir resistens mot enkelte arter i ordenen Lepidoptera, eksempelvis maispyralide (*Ostrinia nubilalis*), "Mediterranean corn borer" (*Sesamia nonagrioides*), "fall armyworm" (*Spodoptera frugiperda*), stort jordfly (*Agrotis ipsilon*), og "corn earworm" (*Helicoverpa zea*). I henhold til søker vil den insektresistente maislinjen MON 89034 være motstandsdyktig mot et videre spekter av skadegjørere i ordenen *Lepidoptera* sammenlignet med MON 810.

I Norge er det rapportert om 10 enkeltfunn av maispyralide (<http://www.nhm.uio.no/fagene/zoologi/insekter/norlep/>). Alle påvisningene er gjort i fylkene Østfold, Vestfold, Telemark, Aust-Agder og Vest-Agder. Det er ikke rapportert om funn av arter av slekten *Sesamia* eller artene *Spodoptera frugiperda* eller *Helicoverpa zea* her i landet. Planteklinikken ved Bioforsk har verken mottatt eksemplarer av disse skadegjørerne eller prøver av plantemateriale med skader fra disse (H.M. Singh pers. komm.). Den eneste skadegjøreren som er rapportert på mais i Norge er bladlus. Stort jordfly opptrer av og til som skadedyr i rotvekster i Norge, og det er mulig at arten også kan gjøre skade i mais (Meadow 2007).

Den innsatte genkonstruksjonen i foreldrelinje NK603 inneholder *cp4-epsps*-genet som gir plantene toleranse mot herbicider med virkestoffet glyfosat.

### Resistensutvikling

Utvikling av resistens hos insekter overfor *Bt*-toksin er en viktig problemstilling, med både agronomiske og miljømessige implikasjoner. Konvensjonelle *Bt*-produkter, i form av insekticider som sprøytes på plantene, har kort virketid (dager), og behandlingen vil ikke være effektiv overfor alle individene av målorganismene. Resistensutviklingen vil foregå raskere der toksinet er tilstede i planten gjennom hele vekstsesongen. I tillegg til målorganismene, er det også risiko for resistensutvikling hos andre herbivorer, noe som kan medføre resistensproblemer i andre kulturer der *Bt*-spray benyttes.

Siden det ikke er godkjente *Bt*-produkter til bruk i mais i Norge, og det ikke er registrert Lepidoptera-arter som skadegjørere i mais er resistensproblematikken ikke relevant i norsk sammenheng.

Internasjonalt har det imidlertid vært stor oppmerksomhet med hensyn på tiltak for å hindre rask utvikling av resistens. Vanlig praksis i dag er å sette av refugearealer med ikke-transgen mais i tilknytning til arealene med *Bt*-mais. Dette for å sørge for et habitat der herbivorene ikke eksponeres for toksinet, og kan utvikle populasjoner som ikke nedarver resistensgener. Det anbefales en strategi der 5 % av maisarealene består av usprøytet, ikke-transgen mais som enten plantes i nærheten av arealene med *Bt*-mais, eller inkorporeres i åkrer med transgen mais. Alternativt anbefales et dyrkingsregime der 80 % av arealene består av *Bt*-mais og resterende 20 % med refugearealer med konvensjonell mais som behandles med ikke-*Bt*-insekticider (Shelton *et al.* 2002). Metodene med dyrking av konvensjonell mais i tilgrensende refuger har vist seg å være mest effektiv til å motvirke resistensutvikling. Undersøkelsen til Tabashnik *et al.* (2008) viser at refugearealer ikke hindrer

resistensutvikling, men at prosessen tar lengre tid. I Norge er det langt færre generasjoner av skadedyrartene som er målorganismer for *Bt*-insekticider. Dermed vil det forventes mindre fare for utvikling av resistens sammenlignet med undersøkelsene som Tabashnik *et al.* refererer til.

Det er dokumentert resistens mot toksinet Cry1F hos *Ostrinia nubilalis*. I følge Pereira *et al.* (2008) er det imidlertid ikke påvist et vesentlig nivå av kryssresistens mot Cry1Ac. Dette innebærer at målorganismer som har utviklet resistens mot ett av Cry-proteinene ikke vil overleve på grunn av andre Cry-proteiner som uttrykkes i planten. Resistensegenskapene vil derfor ikke videreføres i populasjonen.

## 8. Samspill mellom GMP og ikke-målorganismer

### 8.1. Effekter på ikke-målartropoder

Det er gjennomført en rekke studier av effekter av *Bt*-mais på ulike ikke-målorganismer av artropoder. Med unntak av enkelte laboratorieforsøk, viser flertallet av disse studiene ingen negative effekter på ikke-målartropoder (Hilbeck & Schmidt 2006).

MacIntosh *et al.* (1990), som undersøkte spesifisiteten til Cry1Ab, fant at bare et begrenset antall *lepidoptera*-larver ble påvirket. Disse studiene var basert på inntak av rene *Bt*- proteiner. Bourguet *et al.* (2002) studerte effekten av *Bt*-mais som uttrykte Cry1Ab-proteiner, på forekomst av ikke-målinsekter i felt. I forsøkene ble effekter på bladlus og deres predatorer/parasitoider spesielt studert. Det ble ikke funnet signifikante forskjeller i forekomst av bladlus eller predatorer/parasitoider. I undersøkelsen ble predatorene *Orius insidiosus*, *Syrphus corollae*, *Coccinella septempunctata*, *Chrysoperla carnea* og trips, samt parasitoider av gruppen hymenoptera (snylteveps) registrert.

I et laboratorieforsøk med pollen fra *Bt*-mais, som uttrykker Cry1Ab-protein, ble det ikke påvist effekter på *O. insidiosus*, *C. carnea* eller *Coleomegilla maculata* (Pilcher *et al.* 1997). Undersøkelsen ble etterfulgt av et feltforsøk over to år der predatorer av *O. nubilialis* ble overvåket før, under og etter pollenspredning. Forfatterne av undersøkelsen konkluderte med at pollen fra planter av *Bt*-mais ikke påvirker bevegelsene til disse predatorene (Pilcher *et al.* 1997).

En annen *Orius*-art, nebbtegen *O. majusculus*, ble undersøkt for potensielle effekter av Cry1Ab i et laboratorieforsøk (Zwahlen *et al.* 2000). Predatoren ble føret med trips (*Anaphothrips obscurus*) som hadde vært alt opp på henholdsvis *Bt*-mais og ikke-transgen mais. Selv om trips ikke er sensitiv for Cry1Ab toksinet, ble det antatt at toksinet var tilstede i organismen når denne ble konsumert av nebbtegene. Undersøkelsen viste ingen signifikante forskjeller i dødelighet eller utviklingstid for predator. Torres & Ruberson (2008) studerte effekten av Cry1Ac-toksinet på 4 rovtege-arter, *Podisus maculiventris*, *Geocoris punctipes*, *Nabis roseipennis* og *O. insidiosus*. Disse ble føret med byttedyr fra *Bt*-bomull. Forfatterne konkluderte med at tegene ikke tar skade av å spise av Cry1Ac-kontaminerte byttedyr.

Alvarez-Alfageme *et al.* (2008) føret mariehønearten *Stethorus punctillum* med midd som var avlet på maissorter som uttrykte Cry1Ab. Det ble påvist at både midden og mariehøna inneholdt Cry-toksinet, men det ble ikke observert negative effekter på disse. Toksinet ble ikke spaltet hos midden. Selv om proteasene for spalting av Cry1Ab var til stede hos mariehøna, var det ingen effekt på overlevelse, utviklingstid eller fekunditet. Tilsvarende resultater ble vist av Alvarez-Alfageme *et al.* (2009) i studier av løpebillen *Poecilus cupreus* som predator på *Spodoptera littoralis*. I denne undersøkelsen ble imidlertid toksinet kun påvist hos 8 % av de voksne løpebillene. Mariehønearten *Cheilomenes sexmaculatus* ble føret som larve på en kunstig diett inneholdende Cry1Ab- og Cry1Ac-toksiner, alternativt føret på bladlus som levde på samme diett. Det ble konkludert med at verken direkte eksponering eller eksponering via byttedyr hadde betydelig effekt på aktivitet eller antall individer av *C. sexmaculatus* (Dhillon & Sharma 2009).

I et sveitsisk preferanseforsøk fra 2001 ble alle tre larvestadiene av *C. carnea* (gulløye), samt to byttedyr, bladlusen *Rhopalosiphum padi* og sommerfuglen *Spodoptera littoralis*, benyttet. I denne studien, der det også ble brukt *Bt*-mais som uttrykte Cry1Ab, ble det ikke påvist letale effekter på noen av byttedyrene. I preferansetestene foretrakk predatorene larver av *S. littoralis* som var føret med umodifisert mais (Meier & Hillbeck 2001). Når det gjelder bladlus ble det ikke funnet noen preferanse med hensyn på diett/fôrtype. I valget mellom *S. littoralis* og *R. padi* foretrakk *C. carnea* bladlus. Forfatterne antar at dette kan ha sammenheng med at bladlusene ikke inneholder *Bt*-toksin, siden toksinet ikke er tilstede i plantenes floem. Hvis dette er tilfelle, skulle ikke transgen mais med *Bt*-toksin påvirke *C. carnea*. Laboratoriestudier, som viser at bladlus ikke tar opp *Bt*-toksin fra floemet, ble publisert av Dutton *et al.* i 2002. Disse undersøkelsene viste også at *C. carnea* som ble føret med *S. littoralis* fra *Bt*-mais, hadde økt dødelighet og forsinket utvikling. Dette vil imidlertid være av mindre betydning hvis resultatene fra laboratorieforsøkene, der *C. carnea* ikke ser ut til å preferere *S. littoralis*, er representative for forholdene i felt.

Tilsvarende studier er utført for å undersøke effekter av Ichneumonid-parasitoiden *Campoletis sonorensis*, der verten *O. nubilalis* ble føret med henholdsvis *Bt*-mais med Cry1Ab og ikke-transgen mais (Sanders *et al.* 2007). Resultatene fra denne undersøkelsen viser at hos parasitoider fra verter føret med transgen mais, ble de voksne individene signifikant mindre. Størrelsen på imago var direkte relatert til størrelsen av verten på det tidspunkt eggleggingen skjer, og vertens videre vekstrate. Ved analyse av den nye generasjonen med voksne parasitoider ble det ikke påvist Cry1Ab-protein. Dette indikerer at størrelsen på de voksne individene utelukkende var knyttet til verten, og ikke en direkte effekt av toksinet på parasitoiden. I undersøkelsen var det også inkludert en preferansetest der parasitoiden kunne velge verter fra henholdsvis *Bt*-mais og ikke-transgen mais. Ingen signifikante forskjeller ble funnet.

I en kinesisk studie ble *Helicoverpa armigera* føret med en diett inneholdende Cry1Ac-toksinet. Effekten på Braconid-parasitoiden *Microplitis mediator* var også her et resultat av vertens vekstrate og størrelse, og ikke Cry-toksinet i seg selv (Ding *et al.* 2009).

I en studie av Romeis *et al.* (2004) ble Cry1Ab-toksinet gitt direkte til larver av *C. carnea* i konsentrasjoner på om lag 10.000 ganger høyere enn normalt i lepidoptera-larver føret med *Bt*-mais. Det ble ikke påvist noen effekter av toksinet på gulløyene. Forfatterne relaterer tidligere påvisninger av negative effekter av insektresistent mais til forhold knyttet til selve byttedyret og ikke til *Bt*-toksinet.

I Spania, der *Bt*-mais har vært dyrket siden 1998, ble det gjennomført en studie av forekomst av artropoder som lever som predatorer på henholdsvis mais med Cry1Ab og konvensjonell mais (de la Poza *et al.* 2005). Predatorene ble overvåket visuelt på plantene eller registrert i fallfeller. Det ble ikke funnet forskjeller i tetthet av *Anthocoridae*, *Coccinellidae*, *Aranea* eller *Carabidae* i *Bt*-mais sammenlignet med konvensjonell mais. Dette er taxa som er vanlig på dyrket mark i Norge.

Ludy & Lang (2006) har også studert effekt av *Bt*-mais som uttrykker Cry1Ab-protein på edderkopper i et 3-årig forsøk i Tyskland. Det ble ikke funnet signifikante forskjeller i antall edderkopper i felt med *Bt*-mais eller tilhørende randsoner sammenlignet med tilsvarende arealer med konvensjonelle sorter.

Den kanskje mest omfattende og detaljerte undersøkelsen av effekter av *Bt*-mais på ikke-målorganismer av artropoder er utført av Dively (2005). Studien gikk over en 3-års periode i Maryland i USA. Over 500.000 artropoder fra 13 ordener, 112 familier og 203 taksonomiske grupper ble registrert. Maislinjene inneholdt genene som kodet for Cry1Ab og Vip3A, og det er rimelig å anta at mulige negative effekter av Cry1Ab-toksinet ville kommet fram i denne undersøkelsen. Effekter av *Bt*-mais ble sammenlignet med konvensjonelle maislinjer med og uten behandling med insekticider. Artropodene ble registrert ved visuell inspeksjon og ved bruk av ulike feller (limfeller, fallfeller, klekkfeller). Det ble også foretatt registrering i påfølgende vekstsesonger for å dokumentere eventuelle langsiktige effekter. Alle familier av artropoder som en kan forvente opptrer i maisåkrer i

Norge er representert i listen over herbivorer, saprofager, predatorer og parasitoider som er påvist i felt med isogene maislinjer. Det ble påvist signifikante forskjeller mellom henholdsvis insekticidbehandlede maisplanter og øvrige behandlinger (*Bt*-mais og ikke-transgen mais). Det konkluderes med at det ikke er signifikante forskjeller i biodiversitet og respons på samfunnsnivå forårsaket av *Bt*-mais. Forskjellene i forekomst av enkelte arter mellom *Bt*-mais og kontrollfelt ble relatert til faktorer som mangel på byttedyr eller mangel på skadete planter. Resultatene av undersøkelsen er i overensstemmelse med konklusjonene fra de andre studiene som er omtalt tidligere.

I Tyskland har Gathmann *et al.* (2006) evaluert effekter av planter med Cry1Ab på andre lepidoptera-larver i felt (ikke-målorganismer). Det ble etablert belter med ugrasplanter i plot med henholdsvis *Bt*-mais og ikke-transgen mais, med og uten behandling med insekticider. Naturlig forekommende lepidoptera-larver på ugrasplantene ble registrert. De eneste artene som forekom i tilstrekkelig antall til å behandles statistisk var kålmøll (*Plutella xylostella*) og liten kålsommerfugl (*Pieris rapae*), arter som er knyttet til korsblomstfamilien (*Brassicaceae*). Begge disse artene ble funnet på hvitsennep (*Sinapis alba*). Det ble ikke detektert forskjeller mellom forsøksfelt med *Bt*-mais og felt med ubehandlede, konvensjonelle planter.

Det tyske forsøket ble sannsynligvis initiert på bakgrunn av kontroversen etter Nature-artikkelen der effekter av pollen fra *Bt*-mais på larver av monarksommerfuglen (*Danaus plexippus*) ble rapportert (Losey *et al.* 1999). Laboratorieforsøket ble etterfulgt av en publikasjon som vurderte effekter av økologiske faktorer i felt og effekter av eksponering av naturlige mengder pollen fra *Bt*-mais på monarksommerfugl (Jesse & Obrycki 2000). Studien viser signifikant økt dødelighet for larver som ble fôret med vertsplanten rosesilkeurt (*Asclepias syriaca*) dekket med transgent maispollen, sammenlignet med planter med pollen fra konvensjonelle sorter. I en seinere publikasjon konkluderer imidlertid forfatterne med at pollen og pollenbærere fra *Bt*-mais med Cry1Ab ikke har noen målbar effekt på egglegging eller overlevelse hos monarksommerfugl (Jesse & Obrycki 2003).

Undersøkelsene med monarksommerfugl er utført i USA. Lignende studier er seinere gjort ved europeiske laboratorier med sommerfuglarten svalestjert (*Papilio machaon*) og vertsplanten pastinakk (*Pastinaca sativa*). Undersøkelsene viste at larver som ble eksponert for ulike tettheter av pollen fra *Bt*-mais (Cry1Ab) hadde lavere vekt, lengre utviklingstid, dårligere overlevelse, og mindre vinger som voksen (Lang & Vojtech 2006). Disse resultatene ble mer uttalte ved høyere tetthet av pollen. I denne undersøkelsen ble maiseventen *Bt176* benyttet, og en antar at pollen fra andre *Bt*-mais typer har betydelig lavere nivå av toksinet. Halvparten av de negative effektene av *Bt*-pollen i de første forsøkene var relatert til ensidig diett, noe som illustrerer viktigheten av utforming av forsøk og kontroller for å avdekke spesifikke effekter av for eksempel Cry1Ab (Losey *et al.* 1999).

Honningbier (*Apis mellifera*) er sannsynligvis det mest studerte ikke-målinsektet med hensyn på mulige virkninger av konvensjonelle pesticider. I nyere undersøkelser som er presentert i forbindelse med søknader om godkjenning av *Bt*-sorter er det ikke rapportert om negative effekter verken på larver eller voksne individer ved eksponering for *Bt*-toksin og toksinholdig pollen (inkludert Cry1Ab og Cry1F) (Hanley 2003; OECD 2007).

I en oversiktsartikkel av Malone & Pham-Delegue (2001) er resultater fra ulike undersøkelser av effekter av *Bt*-planter på honningbier og humler (*Bombus* spp.) diskutert. Resultater så langt tyder på at direkte effekter av transgene planter på pollinerende insekter varierer sterkt avhengig av type transgen og den biologiske aktiviteten til proteinet som uttrykkes. Når det gjelder *Bt*-toksiner som er spesifikke for Lepidoptera-arter konkluderer forfatterne med at det er svært lite sannsynlig at disse vil påvirke bier og humler. Disse konklusjonene underbygges av seinere studier.

Ramriez-Romero *et al.* (2005) har testet virkningene av Cry1Ab-protein og to ulike syntetiske insekticider på fôringsaktivitet og læringskapasitet hos honningbier. Det ble ikke påvist effekter av *Bt*-toksinet på dødelighet, næringsinntak og læreevne hos bier som ble fôret med *Bt*-toksin i sirup i konsentrasjoner som var høyere enn det som normalt uttrykkes i pollen. Fôringsaktiviteten ble derimot redusert under og etter behandlingen. For gruppene som ble behandlet med insekticider ble det påvist

effekter av behandlingen på alle undersøkte parametere. I en canadisk studie undersøkte Bailey *et al.* (2005) effekten av Cry1Ab-toksin og ulike insekticider på honningbier både ved direkte kontakt og ved inntak. I denne undersøkelsen ble det ikke funnet effekter av *Bt*-toksinet på dødeligheten av biene.

Spretthaler (Collembola) er vanlig i jordbruksjord, og har betydning for nedbryting av organisk materiale. Denne gruppen opptrer ofte i rotsonen, og vil derfor kunne eksponeres for Cry-protein fra roteksudater fra *Bt*-plantene. I studier av effekter av *Bt*-toksinet Cry1Ab på *Folsoma candida* fôret Clark & Coats (2006) spretthalerne med oppmalt bladmateriale fra henholdsvis transgen mais og umodifiserte, næringsrike maislinjer. Det ble ikke observert negative effekter på overlevelse og reproduksjon hos gruppene som ble fôret med *Bt*-mais. Forskjeller i vekst hos ikke-målorganismene som ble observert ble relatert til forskjeller i næringsinnhold i de to sortene som ble benyttet i forsøket, og ikke til selve *Bt*-toksinet. Disse resultatene er i overensstemmelse med en rekke andre studier som er gjort av effekter av Cry-proteiner på spretthaler (ref. Icoz & Stotzky 2008).

Griffiths *et al.* (2006) har undersøkt effekter av transgen mais som uttrykte Cry1Ab (MON 810) på blant annet grupper av mikroartropoder i jord. Forsøkene, som ble foretatt under kontrollerte betingelser i veksthus, inkluderte ulike jordtyper og behandling med pyretroidet deltamethrin. For å undersøke effekter på store artropoder ble kålrot (*Brassica napus* ssp. *rapifera*) dyrket i jord fra maisfelt og inokulert med egg fra liten kålflue (*Delia radicum*). Det ble ikke funnet signifikante effekter av den transgene maislinjen på noen av de undersøkte gruppene av artropoder. Tilsvarende resultater er publisert av Cortet *et al.* (2007) fra feltforsøk på 4 lokaliteter i henholdsvis Frankrike og Danmark.

## 8.2. Røddlistede arter

Det er ikke påvist negativ effekt av Cry-proteinene som inngår i MON89034 mot artropoder utover effekter på Lepidoptera. Norsk Rødliste ([www.artsdatabanken.no](http://www.artsdatabanken.no)) inneholder 174 arter av Lepidoptera som er kategorisert som truet (sterkt- eller kritisk truet). De fleste av artene er røddlistet på grunn av smalt vertspekter, samt at vertsplantenes habitater er redusert eller i ferd med å forsvinne. Fordi maislinjen MON89034 inneholder Cry-proteiner som er toksisk for et bredt spekter av Lepidoptera, ansees det som sannsynlig at de fleste av de truede artene ville kunne ta skade dersom de skulle innta disse som mat. Av sommerfuglartene, som er klassifiserte som truet, lever kun to av artene på grasarter i nærheten av jordbruksarealer, dvs. *Euthrix potatoria* (grasspinner) og *Coenonympha hero* (heroringvinge). Sistnevnte er knyttet til skogseng og ikke dyrket mark. Grasspinneren er ansett som truet på grunn av fortrenging av habitatet. Dyrking av MON89034 x NK603 vurderes derfor ikke som noen trussel overfor denne arten.

## 8.3. Delkonklusjon

Publiserte vitenskapelig studier viser små eller ingen negative effekter av Cry1A.105- og Cry2Ab2-proteinene på ikke-målartropoder som lever på eller i nærheten av maisplanter. Det vurderes ikke å være risiko for røddlistede arter i Norge. Siden det ikke er godkjente *Bt*-produkter til bruk i mais i Norge, og det ikke er registrert Lepidoptera-arter som skadegjørere i mais, er problematikken knyttet til resistens i målorganismene ikke relevant i norsk sammenheng.

## 9. Potensial for samspill med abiotisk miljø og eventuelle effekter på biogeokjemiske prosesser

### 9.1. *Bt*-toksiner

#### *Pesistens/nedbryting*

Som en konsekvens av dyrking av insektresistent mais vil *Bt*-toksiner inkorporeres i jord, og jordlevende organismer vil kunne eksponeres for disse toksinene både ved at planterøttene frigir toksin til jordvæske (roteksudater), og gjennom innkorporering av dødt plantemateriale etter høsting og jordarbeiding (Icoz & Stotzky 2008; BEETLE report 2009). Problematikken rundt mulig persistens og akkumulering i jord har vært diskutert i en rekke studier. Dette gjelder både direkte og indirekte virkninger av toksinet eller *Bt*-maisene på ikke-målorganismer og jordmiljø i form av bl.a. potensiell økning av lignininnholdet i kombinasjon med en mulig redusert nedbrytingshastighet.

Nedbryting og persistens av Cry-proteiner i jord avhengig av en rekke faktorer som mikrobiell aktivitet, jordtype, temperatur, pH, kultur og varierer mellom ulike Cry-proteiner (Icoz & Stotzky 2008). I følge søker er det bare observert neglisjerbare effekter av toksinene Cry1A.105 og Cry2Ab2, på biogeokjemiske prosesser som følge av potensielle direkte og indirekte vekselvirkninger mellom MON 89034 x NK603 og ikke-målorganismer, inkludert representative organismer som er involvert i nedbryting av organisk materiale i jord. I dokumentasjonen fra Monsanto henvises det til at Cry-proteinene brytes raskt ned i jord. Halveringstiden for Cry1A.105 er beregnet til  $\leq 7$  dager, mens DT90 for dette toksinet er  $\leq 90$  dager. Tilsvarende verdier for Cry2Ab2 oppgis til henholdsvis  $\leq 6$  dager (DT50) og  $\leq 14$  dager (DT90). I henhold til søker vil manglende persistens av disse toksinene medføre minimal eksponering på jordlevende organismer.

I litteraturen finnes mange studier av mais som uttrykker *Bt*-toksinet og dens skjebne og effekter i jordmiljøet. De fleste undersøkelser av mulige effekter av slike toksiner i jordmiljø er relatert til mais som uttrykker Cry1Ab-protein (*Bt*11, *Bt*176, MON810). Det finnes en lang rekke laboratoriestudier og omfattende feltstudier som viser fravær av effekter av *Bt*-toksiner på nedbrytningsprosesser, mikrobiell samfunnsstruktur og et bredt spekter av jordlevende organismer under relevante eksponeringsbetingelser (Sims & Martin 1997; Escher *et al.* 2000; Glare & O'Callaghan 2000; Saxena & Stotzky 2001; Koskella & Stotzky 2002; Griffiths *et al.* 2005, 2007a; Cortet *et al.* 2006; Vercesi *et al.* 2006; Icoz & Stotzky 2008; Zurbrugg *et al.* 2010).

Det er vist at *Bt*-toksiner initielt brytes relativt raskt ned i jord, men at mindre restmengder kan forbli i jorden i flere år (Vettori *et al.* 2003; Hopkins & Gregorich 2003; Icoz & Stotzky 2008), noe som indikerer potensial for langtidseksponering av jordlevende organismer. Flere laboratoriestudier har vist at Cry1Ab-proteinet kan bindes til leirmineraler og humus, slik at proteinet blir mindre tilgjengelig for mikroorganismer. Zwahlen *et al.* (2003a) har publisert resultater fra to sveitsiske feltstudier der nedbryting av Cry1A(b)-toksin fra blad av *Bt*11-mais ble registrert gjennom høst, vinter og vår i en periode på 200 dager. Ved slutten av forsøksperioden var 0,3 % av det opprinnelige proteinet fortsatt til stede i jorda. En annen studie med ulike maislinjer fra MON 810 og *Bt*11 viste at omfanget av lignifisering av *Bt*-mais ikke er forskjellig fra kontrollinjer (Jung & Scheaffer 2004).

Vettori *et al.* (2003) viste i sine undersøkelser med konvensjonelle insekticider at *Bt*-toksiner i form av krystaller er persistent i jord i minst 28 måneder.

I et laboratorieforsøk av Flores *et al.* (2005) ble nedbryting av ulike arter som uttrykte *Bt*-toksiner analysert, og resultatene diskutert i relasjon til lignininnhold og potensielle miljømessige konsekvenser. Generelt hadde planterester av nær-isogene linjer av konvensjonell mais høyere CO<sub>2</sub>-produksjon sammenlignet med *Bt*-mais, effekter som ikke kunne relateres til forskjeller i C/N-forhold, lignininnhold eller mikrobiell aktivitet. Som et ledd i EU-prosjektet ECOGEN har Cortet *et al.* (2006) undersøkt effekter av Cry1Ab-protein på nedbryting av hvete-halm i felt på 3 klimatiske ulike lokaliteter

i Europa (Danmark og Frankrike). I undersøkelsen ble *Bt*-mais og konvensjonelle, nær-isogene linjer dyrket på 3 ulike jordarter og i tråd med vanlig dyrkingspraksis. Resultater etter 4 måneder viste at nedbryting og mineralisering av organisk materiale primært var knyttet til effekter av klimaforhold. Det ble ikke påvist effekter av *Bt*-toksinet.

I en nylig publisert studie av Zurbrugg *et al.* (2010) ble nedbryting av bladmateriale fra transgene maislinjer som uttrykte Cry1Ab- og Cry3Bb1-proteiner, korresponderende nær-isogene linjer, samt konvensjonelle maissorter evaluert under feltforhold. Det ble påvist forskjeller mellom konvensjonelle maishybrider med hensyn på nedbrytingsmønster, målt som C/N-forhold, lignin-, cellulose- og hemicelluloseinnhold. Tilsvarende forskjeller ble imidlertid ikke registrert mellom transgene- og nær-isogene linjer. Det ble også funnet ulike konsentrasjoner og persistens av de undersøkte toksinene, der Cry3Bb1 hadde kortest nedbrytningstid.

#### *Effekter på jordorganismer etc*

I en oversiktsartikkel av Icoz & Stotzky (2008), der en rekke studier utført i felt, veksthus og laboratorium er vurdert, konkluderer forfatterne med at det kun er observert mindre eller ingen effekter av *Bt*-toksiner på mikrobiell samfunnsstruktur i jord (for eksempel Blackwood & Buyer 2004; Griffiths *et al.* 2006; Hönemann *et al.* 2008; Icoz *et al.* 2008). I de tilfellene der en har påvist effekter på jordmikroorganismer er disse ofte små og av temporær karakter og relatert til forskjeller i jordtype, plantesort, geografiske forhold og temperatur.

I regi av EU-prosjektet ECOGEN er det gjennomført en omfattende forsøksserie over flere vekstsesonger der effekter av *Bt*-mais på jordmikroorganismer (bakterier), mikrofauna (protozoer, nematoder), mesofauna (Collembola, midd, Enchytraeidae) og makrofauna (meitemark) ble undersøkt (Krog *et al.* 2007b, 2008). Forfatterne bak prosjektet konkluderer med at det ikke ble påvist effekter på noen av hovedgruppene av jordorganismene som kunne relateres til *Bt*-toksinet. Forskjellene som ble detektert mellom *Bt*-sorter og nær-isogene linjer var knyttet til effekter av jordarbeiding, forskjeller i jordtyper, kultur, vekstskifte, pesticider og maissort.

Eksempelvis viste feltstudier på to lokaliteter i Frankrike og to i Danmark at *Bt*-mais hadde en forbigående liten, men signifikant effekt på protozoer, nematoder og mikroorganismer i jord (Griffiths *et al.* 2005, 2007a). De største effektene ble imidlertid relatert til effekter av jordtype og plantenes vekststadium. I et annet delprosjekt under ECOGEN undersøkte Griffiths og kolleger effekter av transgen mais som uttrykte Cry1Ab (MON 810) på mikrobiell samfunnsstruktur i jord, samt mikroartropoder og larver av liten kålflue (*Delia radicum*). Forsøkene, som ble foretatt under kontrollerte betingelser i veksthus, inkluderte ulike jordtyper og behandling med pyretroidet deltamethrin. Det ble ikke funnet signifikante effekter av den transgene maislinjen på noen av de undersøkte gruppene av artropoder, men det ble påvist små, men signifikante forskjeller i antall protozoer og nematoder mellom gruppene (Griffiths *et al.* 2006). De største effektene var imidlertid relatert til jordtype, vekststadium, sort og bruk av insectider.

Effekter av nedbryting av *Bt*-mais, er videre undersøkt i en sveitsisk studie av Hönemann *et al.* (2008). Her ble meso- og macrofauna i jord undersøkt etter eksponering for nedbrytingsrester av maisblad. Det ble ikke påvist negative effekter på ikke-målorganismer, som spretthaler, midd og belteormer (Clitellata). Blackwood & Buyer (2004) har videre undersøkt effekter av transgen mais som uttrykte henholdsvis Cry1F-protein (1507) og Cry1Ab-protein (*Bt*11) på jordmikrobiell samfunnsstruktur i tre jordarter med ulik tekstur. Resultatene fra vekstkammerforsøket viste kun signifikante effekter av *Bt*-toksin på mikrobiell samfunnsstruktur i leirjord. En antar at *Bt*-mais forårsaker rask vekst i populasjonene av spesielle mikroorganismer på grunn av økt proteininnhold, og at jordtyper med et høgt innhold av leire øker retensjon av Cry-proteiner.

Meitemark spiller en nøkkelrolle i biogeokjemiske prosesser i jordøkosystemer, og har vært gjenstand for flere studier med hensyn på potensielle effekter av transgene *Bt*-sorter av mais og bomull. I henhold til Zeilinger *et al.* (2010) viser de aller fleste laboratorie- og feltstudiene ingen effekter av *Bt*-



mais som uttrykker Cry1Ab og Cry3Bb1 på overlevelse, mortalitet, endringer i biomasse, juvenil vekstrate, reproduksjon eller forekomst og biomasse av populasjoner i felt.

I en undersøkelse av Saxena & Stotzky (2001) ble det ikke funnet signifikante forskjeller i dødelighet og vekt hos stor meitemark (*Lumbricus terrestris*) etter 40 dager i jord plantet med henholdsvis *Bt*-mais (Cry1Ab) og nær-isogen linje. Det ble heller ikke observert effekter på disse parametrene etter 45 dager i jord med rester fra *Bt*-mais. Dette til tross for at proteinet ble detektert i tarm og feces fra de undersøkte individene.

En felt- og laboratoriestudie over 200 dager viste ingen økt dødelighet hos meitemark (*L. terrestris*) som ble fôret med *Bt*-mais (Cry1Ab) sammenlignet med kontrollgruppen (Zwahlen *et al.* 2003b). Ved slutten av forsøksperioden ble det imidlertid registrert signifikante forskjeller mellom gruppene med hensyn på vekst. Hos testgruppen ble det observert en vektreduksjon på 18 % i forhold til utgangsvekten sammenlignet med 4 % hos individene som ble fôret med konvensjonell mais. I henhold til forfatterne var det imidlertid ikke mulig å si om vektforskjellene var relatert til toksinet eller andre faktorer.

Lang (2006, ref Icoz & Stotzky 2008) fant ingen signifikante forskjeller i populasjonstetthet eller biomasse av meitemark i jord plantet med transgen mais som uttrykte Cry1Ab-protein, og konvensjonell mais (henholdsvis ubehandlet og behandlet med insekticid). Feltforsøket, som ble gjennomført på fem lokaliteter over fire vekstsesonger, viste at forssøkssted og –år hadde større effekt på populasjonstetthet og biomasse av *Lumbricidae* enn tilstedeværelse av Cry-protein.

I en laboratoriestudie av Clark & Coats (2006) ble det ikke påvist negative effekter av av *Bt*-toksinet Cry1Ab på overlevelse og reproduksjon hos *Eisenia fetida* (kompostmeitemark). I denne undersøkelsen ble meitemarkene fôret med oppmalt bladmateriale fra henholdsvis transgen mais og umodifiserte, nærisogene maislinjer. I en tilsvarende dansk undersøkelse ble det ikke observert negative effekter av blad eller roteksudater fra *Bt*-mais på overlevelse, vekst, utvikling og reproduksjon hos grå meitemark (*Aporrectodea caliginosa*), en av de viktigste artene av meitemark i jordbruksjord i tempererte områder (Vercesi *et al.* 2006). I denne studien ble det imidlertid registrert en lavere klekkerate hos *A. caliginosa* var. *tuberculata*). Undersøkelser i felt viste ingen forskjeller mellom *Bt*-mais og nær-isogen kontrollinje med hensyn på forekomst og biomasse av ulike meitemarkpopulasjoner (Krog *et al.* 2007a).

For å undersøke mulige sub-letale effekter på meitemark har Zeilinger *et al.* (2010) gjennomført et storskala forsøk med ulike *Bt*-linjer (Cry1Ab1, Cry3Bb1) over fire år i USA. Det ble ikke påvist signifikante forskjeller mellom transgene linjer og umodifisert kontroll med hensyn på biomasse av juvenile og voksne individer av de fire undersøkte artene. Forskningsgruppen bemerker imidlertid at få arter av meitemark er testet i denne studien, og flere studier med et større spekter av arter er nødvendige for å bekrefte resultatene.

I en undersøkelse av effekter av *Bt*-mais (Cry1Ab-protein) på livssyklus hos sneglearten *Cantareus aspersus* ble det observert redusert vekst etter fôring med Cry1Ab-protein via mat og jord i 47 og 68 uker sammenlignet med umodifisert kontroll. Etter 88 uker ble det ikke funnet noen signifikante forskjeller mellom gruppene (Kramarz *et al.* 2009).

#### *Effekter på akvatiske organismer*

Douville *et al.* (2005) har undersøkt nivå av Cry1Ab-toksin i akvatiske miljø i Canada. I undersøkelsen ble det tatt prøver av overflatevann, jord og sedimenter fra vassdrag med avrenning fra dyrkingsarealer med henholdsvis *Bt*-mais og konvensjonelle maissorter som ble sprøytet med insekticider. Resultatene viste at nedbrytingen av endotoksinet gikk raskere i vann enn i jord (halveringstid 4 og 9 dager), mens for krystaller fra pesticidene var nedbrytingstiden lengre. Nivået av Cry1Ab-proteinet i prøver fra sedimenter og overflatevann varierte fra 0,1 til 1 ng/g eller ng/ml. I flertallet av prøvene var imidlertid toksin-nivået under deteksjonsgrensen. I en oppfølgingsstudie fra 2007 undersøkte Douville *et al.* forekomst og persistens av *cry1Ab*-genet i vassdrag i nærheten av

dyrkingsfelt med *Bt*-mais. Resultatene av undersøkelsen viste at genet var persistent i 21 og 40 dager i henholdsvis overflatevann og i sedimenter, og med høyest konsentrasjon i sedimentprøver. Transgenet ble detektert i avstander opp til 82 km fra dyrkingsfeltene.

I en studie av Rosie-Marshall *et al.* (2007) er det vist at larver av vårfluer (*Tricoptera*), arter som er nært beslektet med *Lepidoptera*, er sensitive for Cry1Ab-toksinet. Disse laboratorieforsøkene viste redusert vekst og økt mortalitet hos vårfluelarver ved inntak av pollen og dødt plantemateriale fra *Bt*-mais. Målinger i felt av samme forskergruppe har imidlertid ikke påvist effekter av *Bt*-pollen på vekst og dødelighet av arter fra vårflueslektene *Hydropsyche* og *Cheumatopsyche* (Pokelsek *et al.* 2007).

## 9.2. Herbicidtoleranse

Det er publisert betydelig færre studier relatert til effekter av dyrkingsregimer med herbicidtolerante planter på nedbryting av organisk materiale, jordlevende organismer og jordmiljø sammenlignet med studier av *Bt*-planter (Griffiths *et al.* 2007a, 2008; Powell *et al.* 2009). Faggruppen er ikke kjent med at det er påvist direkte effekter av glyfosattolerante planter på abiotisk miljø og bio-geokjemiske prosesser, men det er rapportert om enkelte effekter av tiltenkt herbicid og tilhørende dyrkingspraksis på mykorrhiza, rhizobium-populasjoner og mikrobielle samfunn i jord (Zablotowicz & Reddy 2004, 2007; Powell *et al.* 2009).

Zablotowicz & Reddy (2004) rapporterte om negative effekter av glyfosat på populasjoner av *Bradyrhizobium japonicum* med hensyn på nodulering og nitrogenfiksering i soya.

I en canadisk studie ble forekomsten av ulike trofiske grupper i jord og nedbryting av organisk materiale undersøkt i felt med henholdsvis glyfosattolerant mais og soya, og tilhørende umodifiserte, nær-isogene linjer (Powell *et al.* 2009). Studien påviste signifikante effekter av herbicidbehandling og sort på enkelte grupper av jordbiota, men resultatene var ikke konsistente over forsøkssteder. Effektene som ble observert var også temporære, og ble kun påvist i første forsøksår. Tilsvarende ble det påvist redusert nedbryting av organisk materiale i enkelte av feltene med herbicidtolerante sorter, og endringer i det relative forholdet mellom sopp og bakteriebiomasse. Sistnevnte forhold indikerer seinere nedbryting og høyere C/N-forhold. Forfatterne konkluderer imidlertid med at det trengs mer kunnskap for å vurdere funksjonelle konsekvenser av de observerte temporære effektene på jordbiota, og hvordan endringer i nedbryting påvirker næringscykler og karbonbinding/akkumulering i agroøkosystemer.

I regi av EU-prosjektet ECOGEN har Griffiths *et al.* undersøkt effekter av herbicidtolerant mais på jordlevende organismer og jordmiljø. Feltforsøk over to vekstsesonger på en lokalitet i Danmark viste små, men signifikante forskjeller mellom konvensjonelle dyrkingssystemer og GA-tolerant mais med hensyn på effekter på mikrobiell samfunnsstruktur og nematoder ved slutten av forsøksperioden (Griffiths *et al.* 2007a). I en oppfølgingsundersøkelse under kontrollerte betingelser i veksthus, der GA-mais (T25) ble dyrket i ulike jordtyper fra forsøkssteder i Danmark og Frankrike, fant en ingen signifikante effekter av herbicidbruk på jordmikroartropoder (Griffiths *et al.* 2008). Det ble derimot påvist endringer i mikrobiell samfunnsstruktur og redusert forekomst av protozoer. Hovedeffektene var imidlertid knyttet til jordtype og plantens utviklingsstadium, og ikke herbicidbruk og maissort. Det konkluderes også med at effektene av herbicid-regime på mikro- og mesofauna i jord er relativt små sammenlignet med effekter av jordarbeiding og dyrkingspraksis for øvrig.

I en annen studie i tilknytning til ECOGEN-prosjektet undersøkte Krogh *et al.* (2007a) mulige virkninger av redusert jordarbeiding på populasjoner av meitemark i dyrkingssystemer med henholdsvis GA-tolerant mais og konvensjonelle maissorter. Studien, som kun ble foretatt på en lokalitet i Danmark i 2004 og 2005, viste signifikante reduksjoner i antall og biomasse av meitemark i plot med herbicidtolerant mais sammenlignet med ikke-transgen mais. Effektene ble tilskrevet eksponering for herbicidet Basta. Det ble ikke funnet noe entydig mønster med hensyn på effekter av jordbearbeiding på ulike arter av meitemark.

### 9.3. Delkonklusjon

Det finnes enkeltstudier som viser små, men signifikante effekter av *Bt*-toksin og tiltenkt pesticid på jordlevende organismer og mikrobiell samfunnsstruktur i jord. De fleste studiene konkluderer imidlertid med at disse effektene er små og forbigående sammenlignet med effekter av dyrkingsmessige og miljømessige forhold. Det er kunnskapsmangler med hensyn på effekter av toksinet på vannlevende organismer. Konsentrasjonene av *Bt*-endotoksiner er imidlertid vist å være svært lave i akvatiske systemer og eventuell eksponering på disse organismene vil være marginal i Norge.

## 10 . Potensiale for effekter på agroøkologiske forhold, dyrkingspraksis etc.

### 10.1. Dyrkingspraksis og herbicidregimer i mais

#### 10.1.1. Konvensjonell mais

Mais er et ettårig, subtropisk gras med C4-fotosyntese, tilpasset et dyrkingsklima med høy temperatur og høy lysintensitet. Rask og jevn oppspiring er betinget av høye jordtemperaturer ved såing (minimum 8-10 °C ved 10 cm dybde) (Skaland 1993). Plantene er også svært følsomme for kuldeperioder etter oppspiring. I Norge sås derfor mais seinere enn korn, ofte fra midten av mai og utover (Netland 2010). I de fleste tilfeller sås fôrmais etter pløying, men redusert jordarbeiding blir også noe benyttet.

Mais er kultur som må dyrkes med stor radavstand (75 cm), og med stor avstand mellom planter i raden for å oppnå skikkelig utvikling. Plantene vokser seint i starten og kulturen er en svært åpen og lite konkurransedyktig overfor ugras i etableringsfasen. Mais dyrkes i godt oppgjødslet jord, og spesielt ved lave temperaturer tidlig i vekstsesongen vil ugraset representere et stort problem. Det vil derfor ikke være mulig å dyrke mais uten å gå inn med tiltak, og kulturen vil bli påført permanent skade dersom ugraset ikke blir bekjempet i tide. Med en radavstand på 75 cm er mekanisk bekjemping ved radrensing et mulig tiltak. Ugras mellom plantene i raden må imidlertid fjernes manuelt, og mekanisk ugrasbekjempelse blir ofte benyttet i kombinasjon med kjemiske tiltak.

Kjemisk bekjempelse er den vanligste metoden mot ugras i fôrmais. Godkjente herbicider til bruk mot ettårige arter i fôrmais i Norge er vist i tabell 8 (Netland 2010). Dette er selektive bladherbicider som først kan sprøytes på oppspirt ugras. Det er imidlertid avgjørende at ugraset ikke blir for stort for at en skal oppnå effektiv bekjemping. Siden det er viktig at ugraset ikke tar overhand tidlig i vekstperioden, ble jordherbicidet cyanazin tidligere benyttet rett etter såing. Dette herbicidet er imidlertid trukket fra markedet.

Som det framgår av tabellen er det som regel nødvendig å sprøyte to ganger i løpet av vekstsesongen. Kombinasjoner av preparatene Titus WSB + Harmony 50 SX har brei ugrasvirkning og er vanlig brukt i fôrmais. Et alternativ er Titus WSB + Starane/Tomahawk kombinasjon som også gir god ugrasvirkning. Matrignon er et spesialmiddel mot ettårige og flerårige arter i kurvplantefamilien, samt svartøtvier og vindelslirekne. Anslagsvis vil det være nødvendig å bruke Matrignon på 10 % av arealet per år. Lentagran blir i dag lite benyttet i fôrmais.

I henhold til Netland (2010) vil dagens godkjente preparater normalt gi en tilfredsstillende ugrasbekjempelse. Det er imidlertid en svakhet at tiltakene er avhengige av preparat i sulfonylureagruppen (Harmony 50 SX og Titus WSB) (ALS-hemmere), som flere ugrasarter er blitt resistente mot. Både Starane/Tomahawk, Matrignon og Lentagran er resistensbrytere, og ved mistanke om resistens må disse preparatene benyttes i større grad. På den andre side er herbicidene i sulfonyluragruppa såkalte lavdosemidler, og tilført mengde vil derfor være en brøkdel av det som må benyttes av glyfosat.

**Tabell 8.** Godkjente preparater i fôrmais og vanlige kombinasjoner for å oppnå allsidig ugrasvirkning (Netland 2010).

Handelsnavn	Virksomt stoff	Dosering (virksomt stoff/dekar)	Eksempel på kombinasjoner ved sprøyting to ganger
Lentagran	pyridat	100 g	Mindre vanlig i fôrmais
Titus WSB	rimsulfuron	0,75 g + 0,5 g med 10 dagers mellomrom	1. 0,75 g rimsulfuron + 0,56 g tifensulfuron
Harmony 50 SX	tifensulfuron	0,75 g en gang eller 0,56+0,375 g med 10 dagers mellomrom	2. 0,5 g rimsulfuron + 0,375 g tifensulfuron 1 og 2 sprøytes med 10 dagers mellomrom
Starane 180/ Tomahawk	fluroksypyr	11-27 g	0,5-0,75 g rimsulfuron + 8 g fluroksypyr gjentatt etter ca 10 dager
Matrigon	klopyralid	12-15 g	Spesialmiddel mot ugras i korgplantefamilien (både ettårige og flerårige arter), svartstøtvier og vindelslirekne

### 10.1.2. Glyfosattolerant mais

Introduksjon av herbicidtolerante planter og bruk av bredspektrede herbicider kan åpne for en mer fleksibel ugrasbekjempelse der sprøytetidspunkt kan velges mer uavhengig av veksternes utviklingstrinn. Dette gir mulighet for en mer målrettet bruk med seinere sprøyting, færre behandlinger og redusert jordarbeiding sammenlignet med konvensjonell bruk av selektive herbicider. Slike endringer i sprøtereimer kan medføre effekter både på totalforbruk av pesticider (endringer i mengde virksomt stoff), og overgang til plantevernmidler med andre toksikologiske og miljømessige egenskaper (giftighet, persistens, mobilitet etc.).

#### Plantevern

Siden glyfosat virker godt mot de fleste ettårige og flerårige ugrasarter, kan ugrasbekjempelsen på arealer med glyfosattolerant mais bli både mer effektiv og enklere i forhold til valg av preparat og preparatkombinasjoner (Netland 2010). Dette forsterkes av at glyfosat også er virksomt på seinere utviklingsstadium enn midlene som benyttes i konvensjonell maisdyrking i dag. I henhold til Netland (2010) vil det sannsynligvis være tilstrekkelig med en sprøyting i løpet av vekstsesongen i Norge. Hvor høy glyfosatdose som er nødvendig vil variere med sammensetningen av ugrasfloraen. Ved innslag av etablerte flerårige arter må det brukes 100-150 g virksomt stoff per dekar. Ved ugrasbekjemping på arealer med kun frøugras vil dosen kunne reduseres til 50 g (Netland 2010). Godkjente doseringer for bruk av glyfosat for ulike bruksområder i Norge i dag varierer fra 36 til 288 g glyfosat/daa (Mattilsynet 2009). EU opererer med en foreslått dosering i glyfosattolerant mais for Nord-Europa på maksimalt 216 g virksomt stoff per daa, fordelt på 2 sprøytinger (Monsanto 2007).

#### Vekstskifte og jordarbeiding

Internasjonalt er utvikling av herbicidtolerante kulturer sterkt forbundet med dyrking med redusert eller uten jordarbeiding (Locke *et al.* 2008; Givens *et al.* 2009). Denne praksisen er et viktig element i "conservation agriculture", som har økt drastisk i USA, Canada, Argentina og Brasil (Dill *et al.* 2008). Ved dyrking med redusert eller helt uten jordarbeiding får toårige og flerårige ugrasarter bedre vilkår enn når de pløyes. Dette kan effektivt forhindres ved glyfosatsprøyting i veksttida for kulturen. I henhold til Dill *et al.* (2008) har det vært praktisert redusert eller ingen jordarbeiding på omlag 65-70 % av arealene med glyfosattolerant mais i USA de siste årene. Netland (2010) konkluderte imidlertid med at redusert jordarbeiding ved dyrking av glyfosattolerant mais sannsynligvis vil være mindre

egnet for denne kulturen, og da relatert til problemer med *Fusarium*. På bakgrunn av dette er det heller ikke grunn til å anta at innføring av glyfosattolerant fôrmais i Norge vil endre jordarbeiding i forhold til dagens praksis med konvensjonelle sorter (Netland 2010). Det innebærer heller ingen endringer i erosjon eller avrenning av næringsstoffer.

I Norge er det grunnet forhold som arrondering, topografi og grunt jordsmonn, mangel på egnede arealer til fôrmaisdyrking hos husdyrprodusenter i aktuelle områder for maisdyrking. Ved konvensjonell dyrking vil ugras begrense mulighetene for ensidige omløp med fôrmais år etter år. Introduksjon av glyfosattolerante sorter kan, i henhold til Netland (2010), medføre at flere dyrkere vil benytte seg av muligheten til å dyrke i monokultur.

### Sjukdomsbilde

Til nå har det ikke vært observert vekstfølgesjukdommer av betydning selv i ensidige omløp ved dyrking av konvensjonell mais (Netland 2010). Mulige endringer i sjukdomsbilde ved introduksjon av glyfosattolerant mais vil være knyttet både til omfang/areal og til eventuell økt bruk av monokultur sammenlignet med dyrking av konvensjonelle sorter. Økt bruk av monokultur må i lengden forventes å føre til vekstfølgesjukdommer og skadedyr (Netland 2010). Særlig gjelder dette hvis maisarealet øker i kornområdene og at mais i økende grad inngår i omløp med korn. I og med at planterester av mais er et svært godt substrat for mykotoksindannende sopper i *Fusarium*-komplekset, vil kornet utsettes for økt smittepress fra *Fusarium* og dermed økt risiko for mykotoksiner i avlingen. Resultater fra danske forsøk viser at omløp med mais som forgrøde før hvete kombinert med en dyrkingsteknikk uten pløying, gir høyest risiko for utvikling av *Fusarium* og mykotoksiner i kornet (ref. Henriksen 2006).

## **10.2. Direkte effekter av glyfosat på miljø**

### **10.2.1. Bruksområder og omsetning av glyfosat**

Glyfosat er et bredspektret, ikke selektivt, systemisk ugrasmiddel. Stoffet absorberes hovedsakelig av plantens overjordiske deler og transporteres via silvevet til plantens meristemer og stanser all videre vekst. Herbicidet er virksomt mot de fleste planter som har velutviklede blader og er i god vekst ved behandling.

I perioden 2004-2008 var den årlige omsetningen av glyfosat i Norge i gjennomsnitt 292 600 kg virksomt stoff (Mattilsynet 2009). Dette tilsvarer 55 % av omsatt mengde ugrasmidler. Til sammenligning var gjennomsnittlig omsetning av glyfosat om lag 70 tonn i perioden 1982-1986. Den økte bruken tilskrives i stor grad endringer i jordarbeidingspraksis. Redusert jordarbeiding (pløyefri dyrking) medfører en økning av både ett-, to- og flerårige ugrasarter sammenlignet med dyrkingssystemer med høst- eller vårpløying, og økt behov for planteverniltak (Stenrød *et al.* 2007).

I jordbruket brukes glyfosatpreparater mot enfrøbladete arter (spesielt kveke), og tofrøbladete frø- og rotugras, enten før oppspiring, før etablering eller etter høsting av alle kulturer ([www.plantevernguiden.no](http://www.plantevernguiden.no); Stenrød *et al.* 2007). Videre er glyfosatpreparater godkjent til bruk i moden byggåker uten gjenlegg/fangvekst, og ved skjermet sprøyting i frukthager, prydrær og prydog bærbusker. Plantevernmidler med glyfosat brukes også i utstrakt grad mot løvkraut i skogbruket, og til totalbekjemping av ugras og annen vegetasjon langs veier, jernbanelinjer, kraftlinjer, industriområder, planteskoler etc.

Glyfosat er ikke godkjent til bruk verken i fôr- eller sukkermais i Norge. Enkelte EU-land, eksempelvis Spania, Italia, Belgia og Nederland har godkjent bruk av glyfosat til skjermet sprøyting i maisåker (Monsanto 2009).

### 10.2.1. Miljørisikovurdering av glyfosat

Ved en eventuell godkjenning av genmodifiserte planter for dyrking i Norge vil de miljømessige aspektene knyttet til plantevernmidler bli fanget opp av den eksisterende godkjenningsordningen for pesticider. All ny bruk av plantevernmidler som kreves for de aktuelle genmodifiserte kulturene vil måtte gjennomgå en miljørisikovurdering. Også eventuelle endringer i dosering, bruksmåte og bruksområde av allerede godkjente plantevernmidler som følge av bruk av genmodifiserte planter må vurderes av VKMs Faggruppe for plantevernmidler (FG2). VKMs risikovurdering vil, sammen med informasjon om preparatets agronomiske nytteverdi og en vurdering av alternative midlers egenskaper, danne grunnlaget for Mattilsynets vedtak.

Dagens godkjenninger av glyfosat, både virkestoff og preparater, er basert på en risikovurdering fra det tidligere Rådet for plantevernmidler fra 2004. VKMs Faggruppe for plantevernmidler har ikke foretatt noen fullstendig helse- og miljørisikovurdering av glyfosat, men kun tidligere vurdert formuleringsstoffet POEA i preparatet Roundup Max (VKM 2005b). I henhold til Mattilsynets 5-årsplan for regodkjenning av plantevernmidler, vil det i 2012 bli gjennomført en fullstendig helse- og miljørisikovurdering av virksomt stoff, metabolitter og preparat for ulike bruksområder etter ordinær prosedyre. Ved miljørisikovurderinger av pesticider etter dagens regelverk blir direkte effekter på visse indikatorarter av fisk, vannlopper, alger, fugl, pattedyr, meitemark, bier, leddyr, samt persistens og utlekking til grunnvann og overflatevann vurdert. Mulige langsiktige effekter på biodiversitet og resistensutvikling omfattes ikke av dette regelverket.

Når det gjelder skjebne i miljøet og økotoksiske effekter viser Rådet for plantevernmidler til at glyfosat har relativt høy vannløselighet, og at nedbrytingen i jord under aerobe forhold er moderat til høy, mens nedbrytingen av metabolitten AMPA er lav til middels. Nedbrytingen er avhengig av mikrobiell aktivitet, og adsorpsjonen virker inn på hvor tilgjengelig glyfosat er for mikrobiell nedbryting. Adsorpsjonen i jord er høy til meget høy for både glyfosat og AMPA. På grunn av den raske nedbrytingen og bindingen til jordpartikler har en tidligere antatt at risikoen for utlekking har vært lav. Resultater av det norske pesticidovervåkingsprogrammet JOVA og tilsvarende programmer i Sverige og Danmark den siste 10-årsperioden har imidlertid påvist glyfosat og nedbrytingsproduktet AMPA i de fleste prøver som er analysert av overflatevann og grunnvann (Stenrød *et al.* 2007; Franzén *et al.* 2007). Dette forklares med sterk adsorpsjon av glyfosat i det øverste jordlaget, noe som medfører fare for partikkelbundet transport med overflateavrenning. Adsorpsjon, binding og mobilitet i jord vil imidlertid variere betydelig mellom ulike jordtyper (Borgaard & Gimsing 2008). Forsøk har vist begrenset lekkasje fra ikke-strukturert sandjord. I velstrukturete leirjordtyper derimot er det påvist lekkasje av både virkestoff og metabolitt under nordiske klimaforhold, noe som representerer en potensiell risiko for det akvatiske miljøet. Nedbryting i vann/sedimentsystem er moderat til høy.

Når det gjelder risiko for effekter på terrestrisk miljø viser Rådet for plantevernmidler (2004) til at det ikke er påvist hemmende effekter av glyfosat på mikroorganismer i jord, og at virkestoffet er lite giftig for meitemark, bier og fugl. Videre ansees glyfosat som skadelig for snylteveps (*Aphidus rhopalosiphi*) og rovmidd (*Typhlodromus pyri*), og lite giftig for plantelevende predatorer som *Chrysoperla carnea*. I akvatiske miljø er glyfosat sett å være meget til moderat giftig for ulike algearter, moderat giftig for andemat og moderat til lite giftig for vannlopper (akutt/kronisk) og fisk (akutt/kronisk). Risikoen er størst for effekter på kiselalger, som er sett å være den mest sensitive organismegruppen. Det er påvist kroniske effekter på tidlige livssyklusstadier av amfibier ved langtidseksponering av formuleringsstoffet POEA, som finnes i enkelte Roundup-preparater (Relyea 2005 a,b). VKMs Faggruppe for plantevernmidler viser imidlertid til konsentrasjonene som gir akutt toksisitet ikke er vesentlig lavere enn hva som tidligere er vist for andre organismegrupper (VKM 2005b). Faggruppen konkluderer også med at i og med at nedre konsentrasjonsgrense for disse effekter ikke er fastlagt, er det vanskelig å foreta en adekvat vurdering av risiko for effekter av langtidseksponering.

Det er utviklet flere metoder hvor en søker å gi en samlet vurdering av plantevernmidlenes effekter på omgivelsene, såkalte miljøindikatorer. EIQ (Environment Impact Quotient) er et eksempel på en risikoindeks som er mye benyttet for å estimere og sammenligne miljøeffekter av ulike bekjempelsesstrategier og behandlingsregimer (Kovach *et al.* 1992; Kleter *et al.* 2008). Den økotoksikologiske komponenten av indikatoren tar blant annet i betraktning toksiske effekter på akvatiske organismer, fugl, bier og andre nytteinsekter, som vektet ulikt. EIQ kan beregnes med bruker/steds-spesifikke data, dose og aktiv ingrediens. Ved å beregne EIQ for ulike pesticider eller årlige EIQ for pesticidprogram innen et areal eller innenfor et avgrenset område gir dette muligheten til å sammenligne ulike bekjempelsesstrategier eller sammenligne den relative risiko for effekter og utvikling over tid (Kvaløy *et al.* 1998). Basert på denne indeksen konkluderer Kleter *et al.* (2008) med at glyfosat har en gunstigere økotoksikologisk profil sammenlignet med aktuelle selektive herbicider som benyttes i konvensjonell produksjon i Europa.

*Det arbeides med å få vurdert relevansen av ulike risikoindeks under norske forhold.*

### **10.2.2. Uttalelse fra VKMs Faggruppe for plantevernmidler vedrørende bruk av glyfosat i genmodifisert mais og sukkerbete.**

På bakgrunn av en bestilling fra Mattilsynet kom Faggruppe for plantevernmidler med en uttalelse om bruk av glyfosatholdige herbicider ved dyrking av genmodifisert mais og sukkerbete i juni 2009 (vedlegg I). Oppdraget fra Mattilsynet omfattet ikke en fullstendig helse- og miljørisikovurdering, men faggruppen ble bedt om en vurdering om hvorvidt bruk av glyfosat i disse kulturene medfører *vesentlig* høyere risiko for helse og/eller miljø enn allerede godkjente bruksområder. Det ble ikke innlevert noen ny dokumentasjon for preparater eller virksomt stoff som endrer tidligere vurderinger. Faggruppen fant i dette tilfelle det tilstrekkelig å basere sin uttalelse på risikovurderingen av glyfosat som ble gjort av Rådet for plantevernmidler i 2004, og har ikke gjort noen ny vurdering av økotoksiske egenskaper, skjebne i miljø eller økotoksiske effekter i terrestrisk og akvatisk miljø. Basert på dette dokumentasjonsgrunnlaget, konkluderer faggruppen med at bruk av det virksomme stoffet glyfosat i herbicidtolerant mais og sukkerbete ikke medfører *vesentlig* høyere risiko for miljø (eller helse) enn allerede godkjente bruksområder.

Faggruppen presiserer i sin uttalelse at miljørisikovurderingen kun er relatert til direkte effekter av glyfosat på miljø, og at andre effekter knyttet til introduksjon av herbicidtolerante kulturer, som endringer i bruksmønster av plantevernmidler, endringer i jordbrukspraksis og resistensproblematikk knyttet til ensidig bruk ikke er vurdert. Dette er forhold som til nå ikke har vært en del av oppdraget i forbindelse med den ordinære godkjenningsprosessen av plantevernmidler. Faggruppe 2 understreker imidlertid at mulige langsiktige endringer i bruksmønster av plantevernmidler og den miljørisiko som dette kan medføre må tas hensyn til i en miljørisikovurdering av genmodifiserte planter.

### **10.3. Mulige langsiktige effekter på miljø knyttet til endringer i dyrkingspraksis, bruksmønster av plantevernmidler etc**

#### **10.3.1. Biodiversitet**

Introduksjon av herbicidtolerante kulturplanter og ensidig bruk av bredspektrede herbicider vil kunne påvirke biodiversiteten og sammensetningen av plantesamfunn både på jordbruksarealer og tilgrensende biotoper. Potensielle effekter på miljøet vil imidlertid avhenge av en rekke faktorer knyttet til både genetisk bakgrunn/sortsmateriale, og agronomiske og miljømessige forhold, forhold som vil variere fra vekstsesong til vekstsesong og mellom regioner.



I Europa, og spesielt Norden, er det gjennomført få storskala-forsøk hvor man har undersøkt effekter av herbicidtolerante sorter på biologisk mangfold under ordinære dyrkingsbetingelser (Squire *et al.* 2003; Franzén *et al.* 2007). De fleste studiene som er publiserte er basert på kortvarige småskala-forsøk på få lokaliteter. Det har heller ikke vært kommersiell dyrking av transgene planter med herbicidresistens som kan gi indikasjoner om mulige langsiktige økologiske konsekvenser av endret dyrkingsregime. En utredning fra Jordbruksverket og Naturvårdsverket på oppdrag fra det svenske Jordbruksdepartementet (Franzén *et al.* 2007) konkluderer også med det er svært begrenset overføringsverdi til nordiske dyrkingsbetingelser av de studiene som er publiserte så langt.

#### *Nordiske studier*

I Sverige og Danmark har det i perioden 2002-2008 vært 12 forsøksutsettinger med herbicidtolerante sorter av fôrbete, sukkerbete, mais og oljeraps ([http://gmoinfo.jrc.it/gmp\\_browsw.aspx](http://gmoinfo.jrc.it/gmp_browsw.aspx)). Det har ikke vært tilsvarende feltforsøk i de øvrige nordiske landene. Ved Sveriges Landbruksuniversitet ble det i 2002 startet opp et forskningsprosjekt som studerer miljøkonsekvenser ved dyrking av transgene sorter med herbicidresistens. I prosjektet blir risiko for resistensutvikling, samt effekter av redusert jordarbeiding, sprøytetidspunkt og – frekvens på biodiversitet og total herbicidbruk vurdert. Resultatene fra denne studien er ennå ikke publisert.

I Danmark ble de første undersøkelsene av mulige effekter på ulike biodiversitetsindikatorer gjennomført av Danmarks Miljøundersøkelser med glyfosattolerant fôrbete (Strandberg & Bruus-Pedersen 2002; Elmegaard & Bruus Pedersen 2001; Strandberg *et al.* 2005). I denne forsøksserien ble effekter av ulike herbicidregimer på flora og fauna på dyrkingsarealer med konvensjonell og transgen fôrbete studert over en treårsperiode. Resultatene fra dette arbeidet viser at tidspunktet for sprøyting, dvs. lengden på den herbicidfrie perioden, er helt avgjørende med hensyn på effekter på biodiversitet. Glyfosatsprøyting i henhold til anbefalinger medførte en større tetthet av ugras og en mer artsrik ugrasflora på forsøksruter med herbicidtolerant bete sammenlignet med umodifiserte betesorter tidlig på sommeren. Sprøyting tidligere enn anbefalt resulterte imidlertid i en svært lav diversitet, tetthet og biomasse av ugras gjennom hele vekstsesongen. Forekomst og artsmangfold blant artropoder var også i hovedsak korrelert med herbicidregime, og tetthet og biomasse både av ugrasplanter og kulturplanter. En effektiv ugraskontroll vil imidlertid, uavhengig av sprøytetidspunkt, medføre redusert/mangelfull frøproduksjon hos ugrasartene. På sikt vil dette føre til en seleksjon av mindre glyfosatsensitive arter, og redusert artsmangfold på og rundt landbruksarealene. I henhold til Netland (2010) er vindelslirekne (*Fallopia convolvulus* (L.), åkervindel (*Convolvulus arvensis* L.) og vanlig hønsegras (*Persicaria maculosa* ssp. *maculosa*) ugrasarter som fra naturen er sterke overfor glyfosat. Disse ugrasartene er vanlig til nokså vanlig i potensielle dyrkingsområder for mais i Norge (Lid & Lid 2005). Økt bruk av glyfosat vil øke mulighetene for frøproduksjon hos disse artene, og dermed på lang sikt endring i sammensetningen av ugrasfloraen. Påtagelige endringer og problemer vil imidlertid først komme i monokulturer av mais og dersom arealet av glyfosattolerant mais øker drastisk (Netland 2010).

I Danmark er det initiert en større undersøkelse for å belyse mulige kort- og langtidseffekter av ulike sprøytereimer ved dyrking av glyfosatresistente sorter av mais og hørstraps (ref. DMU 2009). Målet med prosjektet er å studere effekter av herbicidresistente kulturer på flora og fauna både på dyrkingsarealer og tilgrensende arealer gjennom et helt vekstskifte. Prosjektet ble avsluttet i 2007, og en samlet rapport med prosjektets resultater var forventet publisert i 2008. Faggruppen er imidlertid ikke kjent med at denne rapporten er publisert.

#### *Britiske studier*

Den mest omfattende studien som er publisert over effekter av herbicidtolerante planter på biodiversitet ble gjennomført i Storbritannia i perioden 2000-2003. I denne undersøkelsen (Farm Scale Evaluations (FSE)) ble ulike biodiversitetsparametere studert i dyrkingsfelt og omkringliggende arealer med henholdsvis transgene og konvensjonelt dyrkede sorter av fôrmais, fôrbete, sukkerbete og oljeraps (Champion *et al.* 2003). I denne studien ble det kun benyttet betesorter med glyfosattoleranse, mens mais- og rapssortene som inngikk i undersøkelsen var tolerante mot glufosinat-ammonium. For hver kultur ble 65 forsøksfelt etablert over et spredt geografisk område. Forsøksfeltene ble undersøkt

med hensyn på sammensetning, total biomasse, frøsetting og frøbank av ugrasarter. Videre ble diversiteten av evertebrater, samt samspill mellom arter på høyere trofi-nivå studert.

De største forskjellene i biodiversitet var knyttet til de ulike kulturene som ble vurdert, og i mindre grad forskjeller mellom herbicidtolerante og konvensjonelle dyrkingssystemer av samme jordbruksvekst (Hawes *et al.* 2003). Forsøksruter med oljeraps inneholdt generelt mer ugras og insekter sammenlignet med sukkerbete og mais. Forsøksserien viser også at de viktigste miljøeffektene ved dyrking av herbicidtolerante kulturer er knyttet til endringer i herbicidregime, jordarbeiding, vekstskifte og mulige langsiktige interaksjoner mellom ugras og populasjoner av evertebrater (Firbank *et al.* 2003). Det understrekes at effekter på biodiversitet i stor grad avhenger av dyrkingspraksis og sprøyteregime (inkludert dose, tidspunkt og frekvens av sprøyting av selektive og ikke-selektive herbicider), vekstskifte og tilgjengelighet av fôrressurser og habitat i dyrkingsområdet. Sprøytetidspunkt er spesielt avgjørende. Dette fordi bredspektrede herbicider ofte benyttes seinere i vekstsesongen sammenlignet med mer selektive herbicider i konvensjonelle sorter.

Ved bruk av herbicidprogrammer med glyfosat og glufosinat-ammonium ble det i denne forsøksserien påvist redusert plantetetthet av tofrøbladete, frøbærende ugras på arealer med transgen oljeraps og sukkerbete ved slutten av vekstsesongen (Heard *et al.* 2003). På disse arealene ble biomassen og frøspill hos ugrasartene redusert med henholdsvis 1/3 og 1/6 sammenlignet med konvensjonell dyrking. I forsøksfeltene som inkluderte glufosinat-tolerant mais var tettheten av ugras hos de herbicidtolerante sortene høyere gjennom hele sesongen. Mot slutten av vekstsesongen ble det registrert 82 % mer biomasse av ugras på arealer med transgen mais. I både raps, bete og mais ble det med unntak av forbigående effekter i forbindelse med sprøyting, ikke registrert effekter av herbicidbehandling på den botaniske diversiteten på dyrkingsarealene. Det ble heller ikke rapportert om effekter av ulike dyrkingssystemer på vegetasjonen i randsonene til dyrkingsfeltene (Roy *et al.* 2003).

Populasjonene av ulike herbivorer, saprofager, pollinatorer, predatorer og parasitoider som ble studert viste seg å være mer influert av årstid og kultur enn dyrkingsregime (Hawes *et al.* 2003). Individtallet av flere grupper av evertebrater økte 2-5 ganger mellom for- og seinsommer. Tettheten av spretthaler (*Collembola*) var imidlertid gjennomgående høyere i felt med herbicidtolerante sorter sammenlignet med konvensjonelle dyrkingsfelt (Brooks *et al.* 2003; Haugthon *et al.* 2003). Dette ble relatert til større mengde organisk materiale. Som et resultat av færre blomstrende ugras ble det påvist reduksjoner i forekomst av sommerfugler og bier i sukkerbete og raps, mens det i maisfelt ble registrert et større antall evertebrater generelt.

Tetthet av ugras, blomstring og frøsetting var gjennomgående lavere i åkerkanter der det ble dyrket herbicidtolerant sukkerbete og vårraps, men høyere i utkanten av felt med herbicidtolerant mais. Det ble videre påvist redusert forekomst av Lepidoptera-arter i i randsonene av forsøksfelt med herbicidtolerant sukkerbete og raps sammenlignet med konvensjonelle dyrkingsfelt. Tilsvarende forskjeller ble ikke funnet i mais. Forfatterne bak FSE-undersøkelsen konkluderer med at forskjellene som ble avdekket i denne studien ikke er relatert til introduksjon av transgene planter, men til effekter av ulike sprøytestrategier mellom herbicidtolerante sorter og konvensjonell dyrking.

For å predikere langtidseffekter av dyrkingssystemer med herbicidtolerante planter på biodiversitet på og rundt landbruksarealer er det imidlertid nødvendig å undersøke potensielle effekter over flere vekstsesonger og relevante dyrkingspraksis. På bakgrunn av data fra FSE-studien har Heard *et al.* (2005) simulert effekter av herbicidtolerante sorter på populasjoner av ettårige, tofrøbladete ugrasarter. Modellstudien inkluderte transgen bete og vårraps i vekstskifte med høstkorn i 7 fireårige omløp (28 år). Undersøkelsen predikerer en større grad av reduksjon av ugraspopulasjoner og lavere tetthet av tofrøbladete ugras i jordas frøbank i vekstskifter som inkluderer herbicidtolerante sorter sammenlignet med konvensjonell dyrkingspraksis (faktor på 0,70-0,80). I tillegg til å medføre effekter på persistensen av plantepopulasjoner, kan dette føre til nedgang i forekomsten av nøkkelarter av evertebrater som benytter plantene som fôrressurs, og arter på høyere trofinivå som fugler.

Dewar *et al.* (2003) har med utgangspunkt i to forsøksserier med glyfosattolerant sukkerbete, undersøkt om utsatt sprøytetidspunkt gir grunnlag for større biologisk mangfold ved at ugraset får anledning til å vokse over en lengre periode og dermed utgjøre en ressurs for høyere trofiske nivåer (primært insekter og fugler). De konkluderte med at utsatt sprøytetidspunkt, spesielt i kombinasjon med båndsprøyting, ga større biomasse både av ugras og insekter, og dermed potensielt større næringsrunnlag og habitat for fugler etc. For sein ugrassprøyting medførte imidlertid kraftig nedgang i avlingene av sukkerbete. Dette kan imidlertid være forbigående effekter. I en studie av Freckleton *et al.* (2004) ble det konkludert med at få av de ugrasartene som ble favorisert av utsatt sprøytetidspunkt rakk å sette frø. På lang sikt vil dermed jordas frøbank og biodiversiteten på jordbruksarealene bli redusert.

FSE-studien har vært mye kommentert, og det har vært reist flere innvendinger blant annet om valg av herbicider i de konvensjonelle kontrollgruppene og mangel på alternative dyrkingsteknikker, sprøyteteknikker og – tidspunkt (eg Amman 2005; Sanvido *et al.* 2006). I undersøkelsen ble GA-tolerant mais sammenlignet med konvensjonelle sorter som i 75 % av forsøksfeltene ble behandlet med atrazin. Valg av dette herbicidet som kontroll er en av de viktigste årsakene til resultatene som ble funnet i mais (Heard *et al.* 2003). Atrazin er et persistent jordherbicide som ble totalforbudt i EU i 2004. Det hevdes imidlertid i en seinere studie at den komparative fordelene på biodiversitet vil reduseres, men ikke elimineres (Perry *et al.* 2004).

### 10.3.2. Resistensutvikling

Økt bruk av enkelte herbicider som følge av dyrking av herbicidresistente planter kan medføre økt seleksjonsintensitet og økt mulighet for resistensutvikling i ugraspopulasjoner. Utviklingen av herbicidresistens i planter påvirkes primært av seleksjonsintensitet i form av sprøytehyppighet og herbicidets virkemåte, dosering og persistens (Rognli 1994). Andre faktorer av betydning er dyrkingspraksis, vekstskifte, ugrasartenes generasjonstid, genetiske faktorer, samt relativ fitness hos resistente og følsomme genotyper.

Introduksjon av herbicidtolerante kulturplanter har ført til økt bruk av herbicider med glyfosat for bekjemping av ugras, samt en økning av arealer med redusert jordarbeiding og direktesåing (bl.a. Young 2006; Cerdeira & Duke 2006, ref. Stenrød *et al.* 2007). Ugrasfloraen i disse områdene viser en seleksjon av arter som har større toleranse overfor glyfosat og arter med sein oppspiring. Dyrkingssystemer med ensidig vekstskifte og uten bruk av pløying har vist seg å medføre raskere utvikling av glyfosatresistens i ugrasfloraen (Franzén *et al.* 2007). Dette både pga at økt sprøyting gir mer effektiv seleksjon av tolerante arter, samt at en unngår den forstyrrende effekten på seleksjonsprosessen som pløying tilfører ved jevnlig å bringe til overflaten ugraspopulasjoner som har vært utsatt for lite seleksjonspress (Orson 2006).

I følge en oversikt fra på nettstedet [www.weedscience.com](http://www.weedscience.com) er det per april 2010 på verdensbasis konstatert resistens i 345 biotyper av totalt 194 ugrasarter (114 tofrøbladete, 80 enfrøbladete). Antallet tilfeller av resistente ugras har økt eksponentielt siden slutten av 70-tallet (Cerdeira & Duke 2006).

Glyfosat regnes som et lavrisiko-herbicide med hensyn på utvikling av resistens (Franzén *et al.* 2007), og det er vist at ugras i svært liten grad utvikler resistens mot herbicidet ved seleksjon i populasjoner som opprinnelig var følsomme (Netland 2010). Det første tilfellet av glyfosatresistens ble påvist i en populasjon av stivt raigras (*Lolium rigidum* L.) i Australia i 1996, etter over 20 år med omfattende bruk av herbicidet (Powles *et al.* 1998). Fram til nå er det dokumentert resistens mot glyfosat i 18 ulike arter ([www.weedscience.com](http://www.weedscience.com)). Tre av disse tilfellene er knyttet til dyrking av herbicidresistente planter. Glyfosatresistente ugras er hovedsakelig påvist i USA, Sør-Amerika, Sør-Afrika og Australia. I Europa er det konstatert resistens mot glyfosat i populasjoner av stivt raigras, italiensk raigras (*L. multiflorum*), sprikehamp (*Conyza bonariensis*), hestehamp (*C. canadensis*) og pyramidehamp (*C. sumatrensis*) i Spania og/eller Frankrike. I og med at arealene med glyfosattolerante kulturer er sterkt

økende på verdensbasis, forventes det at det vil utvikles glyfosatresistente biotyper av andre sentrale ugrasarter de kommende årene (Powles 2008).

I Norge har det vært diskusjoner rundt mulig utvikling av glyfosatresistens i kveke. I følge Tørresen & Skuterud (2004) er det imidlertid hittil bare påvist forskjeller i følsomhet hos enkelte biotyper ved sprøyting under normaldose. Undersøkelser i Sverige har heller ikke påvist resistens i denne arten (Åkerholm Espeby & Fogelfors 2006).

Med dagens utvalg av ugrasmiddel er det imidlertid et økende problem med resistensutvikling i en rekke ugrasarter overfor herbicid i sulfonyleuregruppen. Denne gruppen omfatter de vanligste herbicidene som benyttes til ugrasbekjempelse i korn og mais i Norge. Glyfosat vil derfor være en nyttig resistensbryter i ensidige kornomløp (Netland 2010).

#### **10.4. Delkonklusjon**

Bruk av det virksomme stoffet glyfosat i herbicidtolerant mais vurderes ikke å medføre høyere risiko for miljø enn for allerede godkjente bruksområder.

Stor variasjon i agro-økologiske miljø, og mangel på relevante langvarige storskala feltforsøk gjør at potensielle effekter på biodiversitet av glyfosattolerant mais i Norge er vanskelig å predikere. Glyfosat vil sannsynligvis bekjempe ugraset mer effektivt enn herbicidene som er tilgjengelige til bruk i konvensjonelle sorter. Dette vil med stor sannsynlighet medføre redusert artsdiversitet på jordbruksarealer og indirekte effekter på fauna ved at næringstilgangen blir snevrere/reduisert. På den andre siden vil ugrasbekjempelsen skje på et seinere tidspunkt i vekstsesongen, og ugraset som da får stå lenger kan være en viktig næringsressurs i en periode hvor det ellers er lite levende plantemateriale tilgjengelig i åkeren.

Under norske forhold vil glyfosat i voksende åker være en resistensbryter i et ensidig kornomløp og dermed redusere faren for resistensutvikling hos ugrasarter.

## 11. Miljøovervåkingsplan

I følge direktiv 2001/18/EF, annekse VII er formålet med overvåkingsplanen å bekrefte at alle antagelser i miljørisikovurderingen som gjelder forekomst og omfang av potensielle skadevirkninger av den genmodifiserte organismen, eller bruken av den er korrekt. Videre skal den identifisere forekomsten av skadevirkninger på menneskers helse eller miljøet som skyldes den genmodifiserte organismen eller bruken av den, og som ikke ble forutsett i miljørisikovurderingen.

Overvåking er relatert til risikohåndtering og en totalvurdering av overvåkingsplanen er derfor utenfor VKMs mandat. I henhold til oppdrag fra DN, skal imidlertid VKM diskutere behovet for særskilt overvåking. Dette gjelder både i de tilfeller hvor søker ikke har foreslått særskilt overvåking og i de tilfeller hvor søkers risikovurdering avdekker behov for en spesiell overvåkingsplan. I sistnevnte tilfelle skal VKM gi en vurdering av kvaliteten på søkers overvåkingsplan, om denne er egnet til å avdekke så vel umiddelbare og direkte virkninger som forsinkede og indirekte virkninger påvist i miljørisikovurderingen. VKM skal ikke vurdere innretningen av den generelle overvåkingen.

I følge Monsanto identifiserer miljørisikovurderingen ingen umiddelbar, forsinket, direkte eller indirekte risiko for human eller dyrehelse eller miljø knyttet til introduksjon av *cry*- eller *cp4 epsp*-genene i maislinjen MON 89034 x NK603, eller til dyrkingsregimet for den herbicidtolerante og insektsresistente maislinjen. Søker vurderer imidlertid at det er en begrenset mulighet for utvikling av resistens hos målsekter for denne transformasjonen. Det anbefales derfor særskilt overvåking av forekomst av resistens mot Cry1A.105 og Cry2Ab2 som uttrykkes i MON 89034 x NK603-plantene. I planen som presenteres av Monsanto er intensjonen å overvåke resistensutvikling i populasjoner av målorganismene *Ostrinia nubilalis* og *Sesamia nonagrioides* i felt, samt minimere og forsinke eventuell resistensutvikling. Ved dyrking av mer enn 5 ha med hybridlinjen MON 89034 x NK603 stilles det krav om refugiearealer med ikke transgen mais i tilknytning til arealene med *Bt*-mais. Søker foreslår her en konservativ strategi der 20 % av dyrkingsarealene består av konvensjonell mais.

I Monsanto's plan for case spesifikk overvåking inngår det ikke planer for overvåking av ikke-målorganismer av Lepidoptera. Faggruppen finner søkers dokumentasjon tilstrekkelig og vurderer ikke at det er behov for særskilt overvåking med hensyn på mulige effekter på ikke-målorganismer.

For at overvåkingsplanen skal være i tråd med gjeldene regelverk er det etter Faggruppens vurdering nødvendig å evaluere kort- og langtidseffekter av dyrkingspraksis som omfatter bruk av relevant herbicid. Dette gjelder både effekter av endret jordarbeiding og av direkte og indirekte effekter av sprøyeregimet. Det er nødvendig å overvåke effekter av herbicidtolerante planter på biodiversiteten i landbrukshabitater og omkringliggende arealer. Dette gjelder både effekter på ugraspopulasjoner og arter av som lever på eller i tilknytning til dyrkingsarealer. Videre må overvåkingsplanen ta i betraktning risiko for resistensutvikling hos ugrasarter som resultat av økt bruk av bredspektrede herbicider. Særskilt overvåking skal utføres over en tidsperiode som er tilstrekkelig lang til at så vel umiddelbare og direkte virkninger som forsinkede og indirekte virkninger kan oppdages.

## 12. Vurdering av søkers dokumentasjon

Det påpekes at det ikke foreligger feltstudier utført i Norge som har kartlagt mulige miljøeffekter av MON 89034 x NK602.

## KONKLUSJON

Dyrkingsomfanget av mais i Norge er svært begrenset, og eventuelle økologiske effekter ved introduksjon av glyfosattolerante maissorter vurderes å være ubetydelige. Bruk av glyfosat på maisarealer vil være marginal i forhold til den totale glyfosatbruken i Norge.

Bruk av det virksomme stoffet glyfosat i herbicidtolerant mais vurderes ikke å medføre høyere risiko for miljø enn for allerede godkjente bruksområder.

Stor variasjon i agro-økologiske miljø, og mangel på relevante langvarige storskala feltforsøk gjør at potensielle effekter på biodiversitet av glyfosattolerant mais i Norge er vanskelig å predikere. Glyfosat vil sannsynligvis bekjempe ugraset mer effektivt enn herbicidene som er tilgjengelige til bruk i konvensjonelle sorter. Dette vil med stor sannsynlighet medføre redusert artsdiversitet på jordbruksarealer og indirekte effekter på fauna ved at næringstilgangen blir redusert. På den andre siden vil ugrasbekjempelsen skje på et seinere tidspunkt i vekstsesongen, og ugraset som da får stå lenger kan være en viktig næringsressurs i en periode hvor det ellers er lite levende plantemateriale tilgjengelig i åkeren.

Under norske forhold vil glyfosat i voksende åker være en resistensbryter i et ensidig kornomløp og dermed redusere faren for resistensutvikling hos ugrasarter.

I Norge er det kun registrert enkeltfunn av målorganismen *Ostrinia nubilalis*, men arten er ikke rapportert som skadegjører. Det er ikke gjort observasjoner av andre målorganismer av Lepidoptera, og det har ikke vært søknader om sertifisering av insekticider mot disse herbivorene.

Publiserte vitenskapelig studier viser små eller ingen negative effekter av Cry1A.105- og Cry2Ab2-proteinene på ikke-måltartropoder som lever på eller i nærheten av maisplanter. Det vurderes ikke å være risiko for rødlistede arter i Norge. Siden det ikke er godkjente *Bt*-produkter til bruk i mais i Norge, og det ikke er registrert Lepidoptera-arter som skadegjørere i mais er problematikken knyttet til resistens i målorganismene ikke relevant i norsk sammenheng.

Det finnes enkeltstudier som viser små, men signifikante effekter av *Bt*-toksin og tiltenkt pesticid på jordlevende organismer og mikrobiell samfunnsstruktur i jord. De fleste studiene konkluderer imidlertid med at disse effektene er små og forbigående sammenlignet med effekter av dyrkingsmessige og miljømessige forhold. Det er kunnskapsmangler med hensyn på effekter av toksinet på vannlevende organismer. Konsentrasjonene av *Bt*-endotoksiner er imidlertid vist å være svært lave i akvatiske systemer og eventuell eksponering på disse organismene vil være marginal i Norge.

Med unntak av insektsresistens og herbicidtoleranse, viser feltforsøk i Europa og USA små eller ingen signifikante forskjeller mellom MON 89034 x NK603 og konvensjonelle linjer med hensyn på agronomiske karakterer. Det vurderes ikke å være økt risiko knyttet til spredning, etablering og invasjon av maislinjen i naturlige habitater, eller utvikling av ugraspopulasjoner av mais i dyrkingsmiljø sammenlignet med konvensjonelle sorter.

Det er ingen stedegne eller introduserte viltvoksende arter i den europeiske flora som mais kan hybridisere med, og vertikal genoverføring vil være knyttet til krysspollinering med konvensjonelle og eventuelle økologiske sorter. I tillegg vil utilsiktet innblanding av genmodifisert materiale i såvare representere en mulig spredningsvei for transgener mellom ulike dyrkingssystemer. En slik spredning vurderes som ubetydelig.

## REFERANSER

- Agbios (2010). Agbios GM Database. Information on GM Approved Products.  
<http://www.agbios.com/dbase.php>
- Al-Deeb, M.A., Wilde, G.E., Blair, J.M. & Todd, T.C. (2003). Effect of *Bt* corn for corn rootworm control on nontarget soil microarthropods and nematodes. *Environmental Entomology*, **32**, 859-865.
- Alvarez-Alfageme, F., Ferry, N., Castanera, P., Ortego, F. & Gatehouse, A.M.R. (2008). Prey mediated effects of *Bt* maize on fitness and digestive physiology of the red spider mite predator *Stethorus punctillum* Weise (Coleoptera: Coccinellidae). *Transgenic Research*, **17**, 943-954.
- Alvarez-Alfageme, F., Ortego, F., Castanera, P. (2009). *Bt* maize fed-prey mediated effect on fitness and digestive physiology of the ground predator *Poecilus cupreus* L. (Coleoptera: Carabidae). *Journal of Insect Physiology*, **55**, 143-149
- Amman, K. (2005). Effects of biotechnology on biodiversity: herbicide-tolerant and insect-resistant GM crops. *Trends in Biotechnology*, **23**, 388-394.
- Aylor, D.E., Schultes, N.P. & Shields, E.J. (2003). An aerobiological framework for assessing crosspollination in maize. *Agriculture and Forest Meteorology*, **119**, 111-129.
- Bailey, J., Scott-Dupree, C., Harris, R., Tolman, J. & Harris, B. (2005). Contact and oral toxicity to honey bees (*Apis mellifera*) of agents registered for use for sweet corn insect control in Ontario, Canada. *Apidologi*, **36**, 623-633.
- Bakken, A.K., Nesheim, L., Harbo, O., Johansen, A. & Wikmark, T. (2005). Potensial for dyrking av fôrmais i Norge. *Grønn kunnskap*, **9**, 1-6.
- BEETLE report (2009). Long term effects of genetically modified (GM) crops on health and the environment (including biodiversity): prioritization of potential risks and delimitation of uncertainties. German Federal Office of Consumer Protection and Food Safety, BLaU-Umweltstudien and Genius GmbH.  
[http://ec.europa.eu/environment/biotechnology/pdf/beetle\\_report.pdf](http://ec.europa.eu/environment/biotechnology/pdf/beetle_report.pdf)
- Bensasson, D., Boore, J.L. & Nielsen, K.M. (2004). Genes without frontiers. *Heredity*, **92**, 483-489.
- Blackwood, C.B. & Buyer, J.S. (2004). Soil microbial communities associated with Bt and non-Bt corn in three soils. *Journal of Environmental Quality*, **33**, 832-836.
- Borgaard, O.K. & Gimsing, A.L. (2008). Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: a review. *Pest Management Science*, **64**, 441-456.
- Bourguet, D., Chaufaux, J., Micoud, A., Delos, M., Nabio, B., Bombarde, F., Marque, G., Eychenne, N. & Pagliari, C. (2002). *Ostrinia nubilalis* parasitism and the field abundance of non-target insects in transgenic *Bacillus thuringiensis* corn (*Zea mays*). *Environmental Biosafety Research*, **1**, 49-60.
- Brookes, G., Barfoot, P., Mele, E., Messeguer, J., Benetrix, D., Foueillassar, X., Fabie, A. & Poeydomenge, C. (2004). *Genetically Modified Maize: Pollen movement and crop coexistence*. Rapport fra PG Economics. 20 s.



- Brookes, G. & Barfoot, P. (2005). GM crops: the global economic and environmental impact- the first nine years 1996-2004. *AgBioForum*, **8**, 187-196.
- Brooks, D.R., Bohan, D.A., Champion, G.T., Haugton, A.J., Hawes, C., Heard, M.S., Clark, S.J., Dewar, A.M., Firbank, L.G., Perry, J.N., Rothery, P., Scott, R.J., Woiwood, I.P., Birchall, C., Skellern, M.P., Walker, J.H., Baker, P., Bell, D., Browne, E.L., Dewar, A.J.G., Fairfax, C.M., Garner, B.H., Haylock, L.A., Horne, S.L., Hulmes, S.E., Mason, N.S., Norton, L.R., Nuttall, P., Randle, Z., Rossall, M.J., Sands, R.J.N., Singer, E.J. & Walker, M.J. (2003). Invertebrate responses to the management of genetically modified herbicide-tolerant and conventional spring crops. I. Soil-surface-active invertebrates. *Phil. Trans. Royal Soc. Lond. Series B- Biolog. Sci.*, **358**, 1847-1862.
- Cerdeira, L.A. & Duke, O.S. (2006). Current status and environmental impacts of glyphosate-resistant crops: A review. *Journal of Environmental Quality*, **35**, 1633-1658.
- Champion, G.T., May, M.J., Brooks, D.R., Clark, S.J., Daniels, R.E., Firbank, L.G., Haugton, A.J., Hawes, C., Heard, M.S., Perry, J.N., Randle, Z., Rossall, M.J., Rothery, P., Skellern, M.P., Scott, R.J., Squire, G.R. & Thomas, M.R. (2003). Crop management and agronomic context of the Farm Scale Evaluations of genetically modified herbicide-tolerant crops. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, **358**, 1801-1818.
- Clark, B.W. & Coats, J.R. (2006). Subacute effects of Cry1Ab Bt corn litter on the earthworm *Eisenia fetida* and the springtail *Folsomia candida*. *Environmental Entomology*, **35**, 1121-1129.
- COGEM (2008). Renewal of authorisation for import and processing of maize Bt11; GOGEM advice CGM/080523-02. Commissie Genetische Modificatie (The Netherlands Commission on Genetic Modification).  
<http://www.cogem.net/ContentFiles/080523-02%20advies%20hernieuwing%20import%20mais%20Bt11%20eng.pdf>
- Cortet, J., Andersen, M.N., Caul, S., Griffiths, B.S., Joffre, R., Lacroix, B., Sausse, C., Thomson, J., Krogh, P.H. (2006). Decomposition processes under Bt (*Bacillus thuringiensis*) maize: Results of a multi-site experiment. *Soil Biology & Biochemistry*, **38**, 195-199.
- Cortet, J., Griffiths, B.S., Bohanec, M., Demsard, D., Andersen, M.N., Caul, A., Birch, N.E., Pernin, C., Tabone, E., Vaufloury, A., de Keh, X. & Krogh, P.H. (2007). Evaluation of effects of transgenic Bt maize on microarthropods in a European multi-site experiment. *Pedobiologia*, **51**, 207-218.
- Cortet, J., Andersen, M.N., Caul, S., Griffiths, B.S., Joffre, R., Lacroix, B., Sausse, C., Thomson, J., Krogh, P.H. (2006). Decomposition processes under Bt (*Bacillus thuringiensis*) maize: Results of a multi-site experiment. *Soil Biology & Biochemistry*, **38**, 195-199.
- de la Poza, M., Pons, X., Farinos, G.P., Lopez, C., Ortego, F., Eizaguirre, M., Castanera, P. & Albajes, R. (2005). Impact of farm-scale Bt maize on abundance of predatory arthropods in Spain. *Crop Protection*, **24**, 677-684.
- De Vaufloury, Kramarz, P.E., Binet, P., Cortet, J., Caul, S., Andersen, M.N., Plumey, E., Coeurdassier, M. & Krogh, P.H. (2007). Exposure and effects assessments of Bt-maize on non-target organisms (gastropods, microarthropods, mycorrhizal fungi) in microcosms. *Pedobiologi*, **51**, 185-194.
- de Vries, J. & Wackernagel, W. (2002). Integration of foreign DNA during natural transformation of *Acinetobacter* sp. by homology-facilitated illegitimate recombination. *The Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **99**, 2094-2099.



- Dewar, A.M., May, M.J., Woiwod, I.P., Haylock, L.A., Champion, G.T., Garner, B.H., Sands, R.J.N., Qi, A. & Pidgeon, J.D. (2003). A novel approach to the use of genetically modified herbicide tolerant crop for environmental benefit. *Proc. R. Soc. B.*, **270**, 335-340.
- Douville, M., Gagne, F., Masson, L., McKay, J. & Blaise, C. (2005). Tracking the source of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab endotoxin in the environment. *Biochemical Systematics and Ecology*, **33**, 219-232.
- Douville, M., Gagne, F., Blaise, C. & André, C. (2007). Occurrence and persistence of *Bacillus thuringiensis* Bt corn *cry1Ab* gene from an aquatic environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **66**, 195-203.
- Devos, Y., Reheul, D. & De Schrijver, A. (2005). The co-existence between transgenic and non-transgenic maize in the European Union: a focus on pollen flow and cross-fertilization. *Environmental Biosafety Research*, **4**, 71-87.
- Devos, Y., Cougnon, M., Thas, O. & Reheul, D. (2008). A method to search for optimal field allocations of transgenic maize in the context of co-existence. *Environmental Biosafety Research*, **7**, 97-104.
- Devos, Y., Demont, M., Dillen, K., Reheul, D., Kaiser, M., & Sanvido, O. (2009). The coexistence of genetically modified (GM) and non-GM crops in the European Union. *Agronomy for Sustainable Development*, **29**, 11-30.
- Dhillon, M.K., & Sharma, H.C. (2009). Effects of *Bacillus thuringiensis* -endotoxins Cry1Ab and Cry1Ac on the coccinellid beetle, *Cheilomenes sexmaculatus* (Coleoptera, Coccinellidae) under direct and indirect exposure conditions. *Biocontrol Science and Technology*, **19**, 407-420.
- Dill, G.M., CaJacob, C.A. & Padgett, S.R. (2008). Glyphosate-resistant crops: adoption, use and future considerations. *Pest Management Science*, **64**, 326-331.
- Ding, J., Li, J.C., Liu, X.X. & Zhang, Q.W. (2009). The life parameters of a parasitoid *Microplitis mediator* (Hymenoptera: Braconidae), reared on cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Hubner) with Cry1Ac diet. *Biocontrol Science and Technology*, **19**, 931-941.
- Dively, G.P. (2005). Impact of transgenic VIP3A x Cry1A(b) lepidopteran-resistant field corn on the nontarget arthropod community. *Environmental Entomology*, **34**, 1267-1291.
- DMU (2009). *Økologisk risikovurdering af genmodificerede planter I 2008. Rapport over behandlede forsøgsudsætninger og markedsføringssager*. Faglig rapport fra DMU nr. 739. 49 s.
- Dutton, A., Klein, H., Romeis, J. & Bigler, F. (2002). Uptake of Bt-toxin by herbivores feeding on transgenic maize and consequences for the predator *Chrysoperla carnea*. *Ecological Entomology*, **27**, 441-447.
- Eastham, K. & Sweet, J. (2002). Genetically modified organisms (GMO): The significance of gene flow through pollen transfer. Environmental issue report. No 28. European Environment Agency (EEA), Copenhagen.  
[http://reports.eea.eu.int/environmental\\_issue\\_report\\_2002\\_28/en](http://reports.eea.eu.int/environmental_issue_report_2002_28/en)
- EC (2009). Report from the Commission to the Council and the European Parliament on the coexistence of genetically modified crops with conventional and organic farming.  
[http://ec.europa.eu/agriculture/coexistence/com2009\\_153\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/agriculture/coexistence/com2009_153_en.pdf)

- EFSA (2004a). Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on a request from the Commission related to the Austrian invoke of Article 23 of Directive 2001/18/EC. *The EFSA Journal*, **78**, 1-13.  
[http://www.efsa.eu.int/science/gmo/gmo\\_opinions/507/opinion\\_gmo\\_safeguard\\_clauses\\_austria\\_en1.pdf](http://www.efsa.eu.int/science/gmo/gmo_opinions/507/opinion_gmo_safeguard_clauses_austria_en1.pdf)
- EFSA (2004b). Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on the use of antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified plants. *The EFSA Journal*, **48**, 1-18. [http://www.efsa.europa.eu/en/science/gmo/gmo\\_opinions/384.html](http://www.efsa.europa.eu/en/science/gmo/gmo_opinions/384.html)
- EFSA (2005). Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glufosinate. *Summary of the EFSA Scientific Report*, **27**, 1-81.
- EFSA (2006). *Guidance document of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed*. 100 s.  
[http://www.efsa.europa.eu/en/science/gmo/gmo\\_guidance/660.html](http://www.efsa.europa.eu/en/science/gmo/gmo_guidance/660.html)
- EFSA (2009a). Scientific Opinion on application (EFSA-GMO-NL-2007-38) for the placing on the market of insect resistant and herbicide tolerant genetically modified maize MON 89034 x NK603 for food and feed uses, import and processing under Regulation (EC) No 1829/2003 from Monsanto. *The EFSA Journal*, **7(9)**, 1320. [http://www.gmo-compass.org/pdf/regulation/maize/MON89034xNK603\\_maize\\_opinion\\_food\\_feed.pdf](http://www.gmo-compass.org/pdf/regulation/maize/MON89034xNK603_maize_opinion_food_feed.pdf)
- EFSA (2009b). Applications (references EFSA-GMO-NL-2005-22, EFSA-GMO-RX-NK603) for the placing on the market of the genetically modified glyphosate tolerant maize NK603 for cultivation, food and feed uses, import and processing and for the renewal of the authorization of maize NK603 as existing products, both under Regulation (EC) No 1829/2003 from Monsanto. *The EFSA Journal*, **1137**, 1-50.  
<http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/scdoc/1137.htm>
- EFSA (2009c). Use of antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified plants. Scientific Opinion of the Panel on Genetically Modified Organisms (GMO) and the Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). *The EFSA Journal*, **1034**, 1-82.  
[http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/Statement/gmo\\_biohaz\\_st\\_ej1108\\_Consolidated\\_ARG\\_en.pdf?ssbinary=true](http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/Statement/gmo_biohaz_st_ej1108_Consolidated_ARG_en.pdf?ssbinary=true)
- Elmegaard, N. & Bruus Pedersen, M. (2001). *Flora and Fauna in Roundup Tolerant Fodder Beet Fields*. National Environmental Research Institute. 40 pp. Technical Report No. 349.
- Emberlin, J, Adams-Groom, B. & Tidmarsh, J. (1999). *The dispersal of maize (Zea mais) pollen*. A report commissioned by the Soil Association: A National Pollen Research Unit, University College Worcester, UK.
- Escher, N., Käch, B. & Nentwig, W. (2000). Decomposition of transgenic *Bacillus thuringiensis* maize by microorganisms and woodlice *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda). *Basic and Applied Ecology*, **1**, 161–169.
- Firbank, L. G., Heard, M. S., Woiwod, I. P., Hawes, C., Haughton, A. J., Champion, G. T., Scott, R. J., Hill, M. O., Dewar, A. M., Squire, G. R., May, M. J., Brooks, D. R., Bohan, D. A., Daniels, R. E., Osborne, J. L., Roy, D. B., Black, H. I. J., Rothery, P. & Perry, J. N. (2003). An introduction to the Farm-Scale Evaluations of genetically modified herbicide-tolerant crops. *Journal of Applied Ecology*, **40**, 2-16.

- Flores, S., Saxena, D. & Stotzky, G. (2005). Transgenic *Bt*-plants decompose less in soil than non-*Bt* plants. *Soil Biology & Biochemistry*, **37**, 1073-1082.
- Franzén, M., Gustafsson, K., Hallqvist, H., Niemi, L., Wallander, J, Thorin, C. & Örn, P. (2007). *The impact of herbicide tolerant crops on some environmental quality objectives. Report from the Swedish Board of Agriculture and the Swedish Environmental Protection Agency.* Jordbruksverket Report 2007:21.
- Freckleton, R.P., Stephens, P.A., Sutherland, W.J. & Watkinson, A.R. (2004). Amelioration of biodiversity impacts of genetically modified crops: predicting transient versus long-term effects. *Proc. R. Soc. B.*, **271**, 325-331.
- Gathmann, A., Wirooks, L., Hothorn, L.A., Bartsch, D. & Schuphan, I. (2006). Impact of *Bt* maize pollen (MON 810) on lepidopteran larvae living on accompanying weeds. *Molecular Ecology*, **15**, 2677-2685.
- Givens, W.A., Shaw, D.R., Kruger, G.R., Johnson, W.G., Weller, S.C., Young, B.G., Wilson, R.G., Owen, M.D.K. & Jordan, D. (2009). Survey of tillage trends following the adoption of glyphosate-resistant crops. *Weed technology*, **23**, 150-155.
- Glare, T.R. & O'Callaghan, D. (2000). *Bacillus thuringiensis: Biology, Ecology and Safety.* Wiley and Sons, Chichester. 350 p.
- Griffiths, B.S., Caul, S., Thompson, J., Birch, A.N.E., Scrimgeour, C., Andersen, M.N., Cortet, J., Messéan, A., Sausse, C., Lacroix, B. & Krogh, P.H. (2005). A comparison of soil microbial community structure, protozoa and nematodes in field plots of conventional and genetically modified maize expressing the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *Plant and Soil*, **275**, 135-146.
- Griffiths, B.S., Caul, S., Thompson, J., Birch, A.N.E., Scrimgeour, C., Cortet, J., Foggo, A., Hackett, C.A. & Krogh, P.H. (2006). Soil microbial and faunal community responses to *Bt*-maize and insecticide in two soils. *Journal of Environmental Quality*, **35**, 734-741.
- Griffiths, B.S., Caul, S., Thompson, J., Birch, A.N.E., Cortet, J., Andersen, M.N. & Krogh, P.H. (2007a). Microbial and microfaunal community structure in cropping systems with genetically modified plants. *Pedobiologia*, **51**, 195-206.
- Griffiths, B.S., Heckmann, L-H., Caul, S., Thompson, J., Scrimgeour, C. & Krogh, P.H. (2007b). Varietal effects of eight paired lines of transgenic *Bt* maize and near-isogenic non-*Bt* maize on soil microbial and nematode community structure. *Plant Biotechnology Journal*, **5**, 60-68.
- Griffiths, B.S., Caul, S., Thompson, J., Hackett, C.A., Cortet, J., Pernin, C. & Krogh, P.H. (2008). Soil microbial and faunal responses to herbicide tolerant maize and herbicide in two soils. *Plant Soil*, **308**, 93-103.
- Gruber, S., Colbach, N., Barbottin, A., & Pekrun, C. (2008). Post-harvest gene escape and approaches for minimizing it. *Cab reviews: Perspective in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 3, No. 015, 17 pp.
- Hallauer, A.R. (2000). Potential for outcrossing and weediness of genetically modified insect protected corn. APHIS-USDA.

- Halsey, M.E., Remund, K.M., Davis, C.A., Qualls, M., Eppard, P.J. & Berberich, S. (2005). Isolation of Maize from Pollen-Mediated gene Flow by Time and Distance. *Crop Science*, **45**, 2172-2185.
- Hanley AV, Huang ZY & Pett WL. (2003). Effects of dietary transgenic Bt corn pollen on larvae of *Apis mellifera* and *Galleria mellonella*. *Journal of Apicultural Research* 42: 77-81
- Haughton, A.J., Champion, G.T., Hawes, C., Heard, M.S., Brooks, D.R., Bohan, D.A., Clark, S.J., Dewar, A.M., Firbank, L.G., Osborne, J.L., Perry, J.N., Rothery, P., Roy, D.B., Scott, R.J., Woiwod, I.P., Birchall, C., Skellern, M.P., Walker, J.H., Baker, P., Browne, E.L., Dewar, A.J.G., Garner, B.H., Haylock, L.A., Horne, S.L., Mason, N.S., Sands, R.J.N. & Walker, M.J. (2003). Invertebrate response to the management of genetically modified herbicide-tolerant and conventional spring crops II. Within-field epigeal and areal arthropods. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B – Biological Sciences*, **358**, 1899-1913
- Hawes, C., Haughton, A.J., Osborne, J.L., Roy, D.B. *et al.* (2003). Responses of plants and invertebrate trophic groups to contrasting herbicide regimes in the Farm Scale Evaluations of genetically modified herbicide-tolerant crops. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B – Biological Sciences*, **358**, 1863-1877.
- Heard, M.S., Hawes, C., Champion, G.T., Clark, S.J., Firbank, L.G., Haughton, A.J., Parish, A.M., Perry, J.N., Rothery, P., Scott, R.J., Skellern, M.P., Squire, G.R. & Hill, M.O. (2003). Weeds in fields with contrasting conventional and genetically modified herbicide-tolerant crops. I. Effects on abundance and diversity. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B – Biological Sciences*, **358**, 1819-1832.
- Heard, M.S., Rothery, P., Perry, J.N. & Firbank, L.G. (2005). Predicting longer-term changes in weed populations under GMHT crop management. *Weed Research*, **45**, 331-338.
- Henriksen, B. (2006). Betydningen av dyrkingstekniske tiltak for utvikling av *Fusarium* og mykotoksiner i korn. *Bioforsk FOKUS*, **1 (3)**, 40-41.
- Hilbeck, A. & Schmidt, J.E.U. (2006). Another view on Bt proteins – How specific are they and what else might they do? *Biopestic. Int.*, **2**, 1-50.
- Holland, J.M. (2004). The environmental consequences of adopting conservation tillage in Europe: reviewing the evidence. *Agriculture, Ecosystem & Environment*, **103**, 1-25.
- Hopkins, D.W. & Gregorich, E.G. (2003). Detection and decay of the *Bt* endotoxin in soil from a field trial with genetically modified maize. *European Journal of Soil Science*, **54**, 793-800.
- Hopkins, D.W. & Gregorich, E.G. (2005). Decomposition of residues and loss of the delta-endotoxin from transgenic (*Bt*) (*Zea mays* L.) in soil. *Canadian Journal of Soil Science*, **85**, 19-26.
- Hönemann, L. & Nentwig, W. (2009). Are survival and reproduction of *Enchytraeus albidus* (Annelida: Enchytraeidae) at risk by feeding on *Bt*-maize litter? *European Journal of Soil Biology*, pre-print published online, DOI: 10.1016/j.ejsobi.2009.03.001.
- Hönemann, L., C. Zurbrugg & Nentwig, W. (2008). Effects of Bt-corn decomposition on the composition of the soil meso- and macrofauna. *Applied Soil Ecology*, **40**, 203-209.
- Hönemann, L., C. & Nentwig, W. (2009). Are survival and reproduction of *Enchytraeus albidus* (Annelida: Enchytraeidae) at risk by feeding on *Bt*-maize litter? *European Journal of Soil Biology*, **45**, 351-355.

- Hüsken, A., Amman, K., Messeguer, J., Papa, R., Robson, P., & Scieman, J., Squire, G., Stamp, P., Sweet, J. & Wilhelm, R. (2007). A major European synthesis of data on pollen and seed mediated gene flow in maize in the SIGMEA project. In: Stein, A. & Rodríguez-Cerezo, E. (Eds.), *Books of abstracts of the third International Conference on Coexistence between Genetically Modified (GM) and non-GM-based Agricultural Supply Chains*, European Commission, pp. 53-56.
- Icoz, I. & Stotzky, G. (2007). Cry3Bb1 protein from *Bacillus thuringiensis* in root exudates and biomass of transgenic corn does not persist in soil. *Transgenic Research*, **17**, 609-620.
- Icoz, I. & Stotzky, G. (2008). Fate and effects of insect-resistant *Bt* crops in soil ecosystems. Review. *Soil Biology & Biochemistry*, **40**, 559-586.
- Icoz, I., Saxena, D., Andow, D., Zwahlem, C. & Stotzky, G. (2008). Microbial populations and enzyme activities in soil in situ under transgenic corn expressing Cry proteins from *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Environmental Quality*, **37**, 647-662.
- Ingram, J. (2000). *Report on the separation distances required to ensure cross-pollination is below specific limits in non-seed crops of sugar beet, maize and oilseed rape*. MAFF Project No RG0123.
- Jarosz, N., Loubet, B., Durand, B., Foueillasser, X. & Huber, L. (2005). Variations in maize pollen emission and deposition in relation to microclimate. *Environmental Science and Technology*, **39**, 4377-4384.
- Jesse, L.C.H. & Obrycki, J.J. (2000). Field deposition of *Bt* transgenic corn pollen: lethal effects on the monarch butterfly. *Oecologia*, **125**, 241-248.
- Jesse, L.C.H. & Obrycki, J.J. (2003). Occurrence of *Danaus plexippus* L. (Lepidoptera : Danaidae) on milkweeds (*Asclepias syriaca*) in transgenic *Bt* corn agroecosystems. *Agriculture Ecosystems and Environment*, **97**, 225-233.
- Jung, H.G. & Sheaffer, C.C. (2004). Influence of *Bt* Transgenes on Cell Wall Lignification and Digestability of Maize Stover for Silage. *Crop Science*, **44**, 1781-1789.
- Kleter, G.A., Harris, C., Stephenson, G & Unsworth, J. (2008). Comparison of herbicide regimes and the associated potential environmental effects of glyphosate-resistant crops versus what they replace in Europe. *Pest Management Science*, **64**: 479-488.
- Koskella, J. & Stotzky, G. (2002). Larvicidal toxins from *Bacillus thuringiensis* subspp, *kurstaki*, *morrisoni* (strain tenebrionis), and *israelensis* have no microbicidal or microbiostatic activity against selected bacteria, fungi, and algae in vitro. *Canadian Journal of Microbiology*, **48**, 262–267.
- Kovach, J., Petzold, C., Degni, J. & Tette, J. (1992). A method to measure the environmental impact of pesticides. *Ny Food Life Sci. Bull.*, **139**, 1-8.
- Kramarz, P., de Vaufléury, Gimberty, F., Cortet, J., Tabone, E., Andersen, M.N. & Krogh, P.H. (2009). Effects of *Bt*-maize material on the life cycle of the land snail *Cantareus asperses*. *Applied Soil Ecology*, **42**, 236-242.
- Krogh, P.H., Griffiths, B., Demsar, D., Bohanec, M., Debeljak, M., Andersen, M.N., Sausse, C., Birch, A.N.E., Caul, S., Holmstrup, M., Heckmann, L.H. & Cortet, J. (2007a). Responses by earthworms to reduced tillage in herbicide tolerant maize and *Bt* maize cropping systems. *Pedobiologia*, **51**, 219-227.

- Krogh, P.H. & Griffiths, B. (2007b). ECOGEN-Soil ecological and economic evaluation of genetically modified crops. *Pedobiologia*, **51**, 171-173.
- Krogh, P.H., Griffiths, B., Cortet, J., Andersen, M.N., Dzeroski, S., Wessler, J., Messéan, A., Sausse, C., Lacroix, B., Caul, S., Scatasta, S., Nillesen, E., Bohanec, M., Debeljak, M., Demsar, D., de Vaufleury, A. & Kramarz, P. (2008). ECOGEN Final Report. Introduction and Summary. [www.ECOGEN.dk](http://www.ECOGEN.dk).
- Kvaløy, K., Klemsdal, S.S., Eklo, O.M., Netland, J., Schanke, T. & Tømmerås, B.Å., (1998). *Konsekvenser ved bruk av herbicidresistente genmodifiserte jordbruksplanter*. NINA Oppdragsmelding 536.
- Laitinen, P., Siimes, K., Eronen, L., Rämö, S., Welling, L., Oinonen, S., Mattsoff, L. & Ruohonen-Lehto, M. (2006). Fate of the herbicides glyphosate, gluphosinate-ammonium, phenmedipham, ethofumesate and metamitron in two Finnish arable soils. *Pest Management Science*, **62**, 473-491.
- Lang, A. & Vojtech, E. (2006). The effects of pollen consumption of transgenic Bt maize on the common swallowtail, *Papilio machaon* L. (Lepidoptera, Papilionidae). *Basic and Applied Ecology*, **7**, 296-306.
- Lid, J. & Lid, D.T. (2005). Norsk flora. Det Norske Samlaget, Oslo. 7. utgave. 1230s.
- Locke, M.A., Zablotowicz, R.M. & Reddy, K.N. (2008). Integrating soil conservation practices and glyphosate-resistant crops: impacts on soil. *Pest Management Science*, **64**, 457-469.
- Losey, J.E., Rayor, L.S. & Carter, M.E. (1999). Transgenic pollen harms monarch larvae. *Nature*, **399**, 214-214.
- Ludy, C. & Lang, A. (2006). A 3-year field-scale monitoring of foliage-dwelling spiders (Araneae) in transgenic Bt maize fields and adjacent field margins. *Biological Control*, **38**, 314-324.
- Malone, L.A. & Pham-Delegue, M.H. (2001). Effects of transgene products on honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees (*Bombus* sp.). *Apidologie*, **32**, 287-304.
- Malone, L.A. & Burgess, E.P.J. (2009). Impact of genetically modified crops on pollinators. In: Ferry, N., Gatehouse, A.M.R. (EDS.). *Environmental Impact of Genetically Modified Crops*, CAB International, pp. 199-122.
- Mattilsynet (1999). Mattilsynets helhetsvurdering av Roundup (99-05-07).
- Mattilsynet (2009). Omsetningsstatistikk for plantevernmidler 2004-2008. Mattilsynet Ås, Seksjon nasjonale godkjenninger. 11s. [http://www.mattilsynet.no/mattilsynet/multimedia/archive/00045/Plantevernmiddel-sta\\_45762a.pdf](http://www.mattilsynet.no/mattilsynet/multimedia/archive/00045/Plantevernmiddel-sta_45762a.pdf)
- Macintosh, S.C., Stone, T.B., Sims, S.R., Hunst, P.L., Greenplate, J.T., Marrone, P.G., Perlak, F.J., Fischhoff, D.A., & Fuchs, R.L. (1990). Specificity and Efficacy of Purified Bacillus-Thuringiensis Proteins against Agronomically Important Insects. *Journal of Invertebrate Pathology*, **56**, 258-266.
- Malone, L.A. & Pham-Delegue, M.H. (2001). Effects of transgene products on honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees (*Bombus* sp.). *Apidologie*, **32**, 287-304

- Meier, M.S. & Hilbeck, A. (2001). Influence of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn-fed prey on prey preference of immature *Chrysoperla carnea* (Neuroptera : Chrysopidae). *Basic and Applied Ecology*, **2**, 35-44.
- Melé, E., Peñas, G., Palaudelmás, M., Serra, J., Salvia, J., Pla, M., Nadal, A. & Messeguer, J. (2007). Effect of volunteers on maize gene flow. In: Stein, A. & Rodríguez-Cerezo, E. (Eds.), *Books of abstracts of the third International Conference on Coexistence between Genetically Modified (GM) and non-GM-based Agricultural Supply Chains*, European Commission, pp. 249-250.
- Mórocz, S., Donn, G., Németh, J. & Dudits, D. (1990). An improved system to obtain fertile regenerants via maize protoplasts isolated from a highly embryogenic suspension culture. *Theoretical Applied Genetics*, **80**, 721-726.
- Nesheim, L. (2008). Fôrmais I Stjørdal 2007: Tilfredstillende avling med plastdekke. Nyhetsmelding. [www.bioforsk.no](http://www.bioforsk.no).
- Netherwood, T., Martín-Orúe, S.M., O'Donnell, A.G., Gockling, S., Graham, J., Mathers, J.C. & Gilbert, H.J. (2004). Assessing the survival of transgenic plant DNA in the human gastrointestinal tract. *Nature Biotechnology*, **22**, 204-209.
- Netland, J. (2010). *Effekter på agronomi og miljø ved dyrking av genmodifisert glyfosattolerant mais*. Bioforsk Rapport, Vol. 5 xx 2010. Utkast. 7 s.
- Nielsen, K.M., van Elsas, J.D. & Smalla, K. (2000). Transformation of *Acinetobacter* sp. 13(pFG4deltanptII) with transgenic plant DNA in soil microcosms and effects of kanamycin on selection of transformants. *Applied Environmental Microbiology*, **66**, 1237-42.
- Nielsen, K.M. (2003). An assessment of factors affecting the likelihood of horizontal transfer of recombinant plant DNA to bacterial recipients in the soil and rhizosphere. *Collection of Biosafety Reviews*, **1**, 96-149.
- Nielsen, K.M. & Townsend, J. P. (2004). Monitoring and modeling horizontal gene transfer. *Nature Biotechnology*, **22**(9):1110-1114.
- OECD (2003). Consensus Document on the biology of *Zea mays* subsp. *Mays* (Maize). *Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology (ENV/JM/MONO, No. 27*, 1-49.
- OECD (2007) Consensus Document on Safety Information on Transgenic Plants Expressing *Bacillus thuringiensis* – Derived Insect Control Proteins. *Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology (ENV/JM/MONO) No. 14*:1-109.
- OGTR (2008). The Biology of *Zea mays* L- ssp. *mays* (maize or corn). Australian Government Office of the Gene Technology Regulator. 80 pp.  
[http://www.health.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/Content/maize-3/\\$FILE/biologymaize08\\_2.pdf](http://www.health.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/Content/maize-3/$FILE/biologymaize08_2.pdf)
- Orson, J. (2006). Weed and pest management. NJF Seminar 378 Tillage systems for the benefit of agriculture and the environment. NJF Report, **2**(4), 46-53.
- Palaudelmás, M., Peñas, G., Melé, E., Serra, J., Salvia, J., Pla, M., Nadal, A. & Messeguer, J. (2009). Effect of volunteers on maize gene flow. *Transgenic Research*, **18**, 583-594.



- Pereira E.J.G, Lang B.A, Storer N.P, & Siegfried BD. (2008). Selection for Cry1F resistance in the European corn borer and cross-resistance to other Cry toxins. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* 126: 115-121
- Perry, J.N., Firbank, L.G., Champion, G.T., Clark, S.J., Heard, M.S., May, M.J., Hawes, C., Squire, G.R., Rothery, P., Wolwod, I.P. & Pidgeon, J.D. (2004). Ban on triazin herbicides likely to reduce but not negate relative benefits of GMHT maize cropping. *Nature*, **428**, 313-316.
- Phipps, R.H. & Park, J.R. (2002). Environmental benefits of genetically modified crops: Global and European perspectives on their ability to reduce pesticide use. *Journal of Animal and Feed Science*, **11**, 1-18.
- Pilcher, C.D., Obrycki, J.J., Rice, M.E. & Lewis, L.C. (1997). Preimaginal development, survival, and field abundance of insect predators on transgenic *Bacillus thuringiensis* corn. *Environmental Entomology*, **26**, 446-454.
- Pokelsek, J.D., Rosi-Marshall, E.J., Chambers, C.P., Griffiths, N.A., Evans-White, M.A., Tank, J.L., Whiles, M.R. & Royer, T.V. (2007). Effects of Bt corn pollen on caddisfly growth rates in Midwestern agricultural streams. NABS Annual Meeting, Columbia, South Carolina 2007.
- Powell, J.R., Levy-Booth, D.J., Gulden, R.H., Asbil, W.L., Campbell, R.G., Dunfield, K.E., Hamill, A.S., Hart, M.M., Lerat, S, Nurse, R.E., Pauls, K.P., Sikkema, P.H., Swanton, C.J., Trevors, J.T. & Klironomos, J.N. (2009). Effects of genetically modified, herbicide-tolerant crops and their management on soil food web properties and crop litter decomposition. *Journal of Applied Ecology*, **46**, 388-396.
- Powles, S.B. (2008). Evolved glyphosate-resistant weeds around the world: lessons to be learnt. *Pest Management Science*, **64**, 360-365.
- Powles, S.B., Lorraine-Colwill, D.F., Dellow, J.J. & Preston, C. (1998). Evolved resistance to glyphosate in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) in Australia. *Weed Science*, **46**, 604-607.
- Qi, A., Perry, J.N., Pidgeon, J.D., Haylock, L.A. & Brooks, D.R. (2008). Cost-efficacy in measuring farmland biodiversity- lessons from the Farm Scale Evaluations of genetically modified herbicide-tolerant crops. *Annals of Applied Biology*, **152**, 93-101.
- Ramirez-Romero, R., Chaufaux, Josette & Pham-Delegue, M.H. (2005). Effects of Cry1AB protoxin, deltamethrin and imidacloprid on the foraging activity and the learning performances of the honeybee *Apis mellifera*, a comparative approach. *Apidologie*, **36**, 601-611.
- Relya, R.A. (2005a). The lethal impacts of Roundup and predatoty stress on six specie dog North American tadpoles. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **48**, 351-357.
- Relya, R.A. (2005b). The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. *Ecological Applications*, **15**, 618-627.
- Rognli, O.A. (1994). Økologisk risiko ved utsetting av genmodifiserte kulturplanter. *Faginfo*, **2 (21)**, 81-197.
- Romeis, J., Dutton, A. & Bigler, F. (2004). *Bacillus thuringiensis* toxin (Cry1A(b)) has no direct effect on larvae of the green lacewing *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae). *Journal of Insect Physiology*, **50**, 175-183.



- Rosie-Marshall, E.J., Tank, J.L., Royer, T.V., Whiles, M.R., Evans-White, M., Chambers, C., Griffiths, N.A., Pokelsek, J. & Stephen, M.L. (2007). Toxins in transgenic crop byproducts may affect headwater stream ecosystems. *PNAS*, **104**, 16204-16208.
- Roy, D.B., Bohan, D.A., Haughton, A.J., Hill, M.O., Osborne, J.L., Clark, S.J., Perry, J.N., Rothery, P., Scott, R.J., Brooks, D.R., Champion, G.T., Hawes, C., Heard, M.S. & Firbank, L.G. (2003). Invertebrates and vegetation of field margins adjacent to crops subjected to contamination herbicide regimes in the Farm Scale Evaluations of genetically modified herbicide-tolerant crops. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B – Biological Sciences*, **358**, 1879-1898.
- Sanders, C.J., Pell, J.K., Poppy, G.M., Raybould, A., Garcia-Alonso, M. & Schuler, T.H. (2007). Host-plant mediated effects of transgenic maize on the insect parasitoid *Campoletis sonorensis* (Hymenoptera : Ichneumonidae). *Biological Control*, **40**, 362-369.
- Sanvido, O., Stark, M. & Bigler, F. (2006). Ecological impacts of genetically modified crops. Experiences from ten years of experimental field research and commercial cultivation. *ART-Schriftenreihe*, **1**, 1-84.
- Sanvido, O., Widmer, F., Winzeler, M., Streit, B., Szerencsits, E. & Bigler, F. (2008). Definition and feasibility of isolation distances for transgenic maize cultivation. *Transgenic Research*, **17**, 317-355.  
<http://www.springerlink.com/content/n561562061873351/>
- Saxena, D. & Stotzky, G. (2001). *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin released from root exudates and biomass of Bt corn has no apparent effect on earthworms, nematodes, protozoa, bacteria, and fungi in soil. *Soil Biology & Biochemistry*, **33**, 1225-1230.
- Schelton, A.M., Zhao, J.Z. & Roush, R.T. (2002). Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants. *Annual Review of Entomology*, **47**, 845-881.
- SCP (1998). *Opinion of the Scientific Committee on Plants Regarding "Submission for Placing on the Market of Glufosinate Tolerant Corns (Zea Mays) Transformation Event MON 88017" by the AgrEvo Company*. [http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scp/out04\\_en.html](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scp/out04_en.html)
- SCP (2001). *Opinion of the Scientific Committee on Plants regarding the submission for placing on the market of glufosinate tolerant maize (Zea mays) transformation event MON 88017 by the AgrEvo Company, now Aventis Crop Science (Notification C/F/95/12/07)*. SCP/GMO/299-Final.
- Schrader, S., Münchenberg, T., Baumgarte, S. & Tebbe, C. (2008). Earthworms of different functional groups affect the fate of the Bt-toxin Cry1Ab from transgenic maize in soil. *European Journal of Soil Biology*, **44**, 283-289.
- Schubert, G.W., Lettmann, C. & Doerfler, W. (1994). Ingested foreign (phage M13) DNA survives transiently in the gastrointestinal tract and enters the bloodstream of mice. *Molecular & general Genetics*, **242**, 495-504.
- SIGMEA (2007). Sustainable Introduction of GM Crops into European Agriculture. Publishable Final Activity Report. [http://www.inra.fr/sigmae/final\\_report](http://www.inra.fr/sigmae/final_report)

- SIGMEA (2009). SIGMEA WP2: conclusions relevant to GM coexistence from research on gene flow by pollen and seed.  
[http://www.scri.ac.uk/scri/file/EPI/SIGMEA\\_WP2\\_species\\_summaries\\_May09.pdf](http://www.scri.ac.uk/scri/file/EPI/SIGMEA_WP2_species_summaries_May09.pdf)
- Sims, S.R. & Martin, J.W. (1997). Effect of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins Cry1A(b), Cry1A(c), CryIIA, and CryIIIA on *Folsoma candida* and *Xenylla grisea* (Insecta: Collembola). *Pedobiologia*, **41**, 412-416.
- Skaland, N. (1993). Grønnsfôrvekster. Forelesningshefte, Institutt for plantekultur, NLH.
- Squire, G.R., Brooks, D.R., Bohan, D.A., Champion, G.T. *et al.* (2003). On the rational and interpretation of the Farm Scale Evaluations of genetically modified herbicide-tolerant crops. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, **358**, 1779-1799.
- SSB (2009). Statistikkbanken - Statistisk sentralbyrå. Avling av ymse hagebruksvekster 2008.  
<http://www.ssb.no/emner/10/04/10/hagebruk/tab-2009-04-14-01.html>
- Stenrød, M., Eklo, O.M., Charnay, M.-P. & Benoit, P. (2005). Effect of freezing and thawing on microbial activity and glyphosate degradation in two Norwegian soils. *Pest Management Science*, **61**, 887-898.
- Stenrød, M., Ludviksen, G.H., Riise, G., Lundekvam, H., Almvik, M., Tørresen, K.S. & Øygarden, L. (2007). *Redusert jordarbeiding og glyfosat. En sammenstilling av norske og internasjonale forsknings- og overvåkingsresultater, samt en småskala feltstudie av avrenning av glyfosat ved ulik jordarbeiding*. Bioforsk Rapport 2 (145) 87 s.
- Strandberg, B. & Bruus Pedersen, M. (2002). *Biodiversity in Glyphosate Tolerant Fodder Beet Fields- Timing of herbicide application*. NERI Technical Report No. 410.
- Strandberg, B., Bruus Pedersen, M., & Elmegaard, N. (2005). Weed and arthropod populations in conventional and genetically modified herbicide tolerant fodder beet fields. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, **105**, 243-253.
- Sweet, J., Simpson, E., Law, J., Lutman, P., Berry, K., Payne, R., *et al.* (2004). *Botanical and Rotational Implications of Genetically Modified Herbicide Tolerance in Winter Oilseed rape and Sugar Beet (BRIGHT Project)*. Project report No. 353. Home Grown Cereals Authority, London.
- Tabaschnik, B.E., Gassmann, A., Crowder, D.W. & Carrière, Y. (2008). Insect resistance to *Bt* crops: evidence versus theory. *Nature Biotechnology*, **26**, 199-208.
- Tolstrup, K., Andersen, S.B., Boelt, B., Buus, M., Gylling, M., Holm, P.B., Kjellson, G., Pedersen, S., Østergård, H. & Mikkelsen, S.A. (2003). Report from the Danish working group on the co-existence of genetically modified crops with conventional and organic crops. DIAS report Plant Production no. 94, Fredriksberg Boktryk, Denmark. 275 p.
- Torres, J.B., & Ruberson, J.R. (2008). Interactions of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in genetically engineered cotton with predatory heteropterans. *Transgenic Research*, **17**, 345-354.
- Treu, R. & Emberlin, J. (2000). *Pollen dispersal in the crops maize (Zea mays), oil seed rape (Brassica napus ssp. oleifera), potatoes (Solanum tuberosum), sugar beet (Beta vulgaris ssp. vulgaris) and wheat (Triticum aestivum)*. Evidence from publications. A report from the Soil Association, January 2000.

- Tørresen, K.S. & Skuterud, R. (2004). Hvorfor virker glyfosat noen ganger dårlig på kveka – er kveka blitt resistant? *Grønn Kunnskap*, **8**, 339-346.
- Van de Wiel, C.C.M. & Lotz, L.A.P. (2006). Outcrossing and coexistence of genetically modified with (genetically) unmodified crops: a case study of the situation in the Netherlands. *Netherlands Journal of Agricultural Science*, **54**, 17-35.
- Vercesi, M.L., Krogh, P.H. & Holmstrup, M. (2006). Can *Bacillus thuringiensis* (Bt) corn residues and Bt-corn plants affect life-history traits in the earthworm *Aporrectodea caliginosa*? *Applied Soil Ecology*, **32**, 180-187.
- Vettori, C., Paffetti, D., Saxena, D., Stotzky, G. & Giannini, R. (2003). Persistence of toxins and cells of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* introduced in sprays to Sardinia soils. *Soil Biology and Biochemistry*, **35**, 1635-1642.
- VKM (2005a). *Report from an Ad Hoc Group appointed by the Norwegian Scientific Panel on Genetically Modified Organisms and Panel on Biological Hazards – An assessment on potentially long-term health effects caused by antibiotic resistance marker genes in genetically modified organisms based on antibiotic usage and resistance patterns in Norway*. Opinion 05/302-1-final. Norwegian Scientific Committee for Food Safety, Oslo, Norway. 62 p.
- VKM (2005b). *Vurdering av bruk av plantevernmidlet Roundup Max med hensyn på risiko for effekter av POEA på amfibier. Uttalelse fra Faggruppe for plantehelse, plantevernmidler og rester av plantevernmidler i Vitenskapskomiteen for mattrygghet 5.07.05*. Vitenskapskomiteen for mattrygghet, Oslo, Norge.
- VKM (2005c). *Helserisikovurdering av genmodifisert mais Roundup Ready NK603 (C/EC/00/01) etter forordning 1829/2003. Uttalelse fra Faggruppe for genmodifiserte organismer 4.03.05 (05/307)*. Vitenskapskomiteen for mattrygghet, Oslo, Norge.  
[http://www.vkm.no/eway/default.aspx?pid=277&trg=Content\\_6508&Main\\_6177=6504:0:31,2365:1:0:0:::0:0&Content\\_6504=6508:0:31,2625:1:0:0:::0:0&Content\\_6508=6187:1669819:::1:6336:48:::0:0](http://www.vkm.no/eway/default.aspx?pid=277&trg=Content_6508&Main_6177=6504:0:31,2365:1:0:0:::0:0&Content_6504=6508:0:31,2625:1:0:0:::0:0&Content_6508=6187:1669819:::1:6336:48:::0:0)
- VKM (2006). *Vurdering av foreslåtte virkemidler for sameksistens mellom genmodifiserte vekster og konvensjonelt/økologisk landbruk, og rangering av spredningsrisiko av transgener fra relevante genmodifiserte planter som kan dyrkes i Norge. Uttalelse fra Faggruppe for genmodifiserte organismer 21.12.06. (06/305)*. Vitenskapskomiteen for mattrygghet, Oslo, Norge.
- VKM (2008a). *Helse- og miljørisikovurdering av genmodifisert maislinje MON 89034 fra Monsanto (EFSA/GMO/NL/2007/37). Uttalelse fra Faggruppe for genmodifiserte organismer 9.05.08. 07/318-endelig*. Vitenskapskomiteen for mattrygghet, Oslo, Norge.  
[http://www.vkm.no/eway/default.aspx?pid=277&trg=Content\\_6301&Main\\_6177=6301:0:31,2365:1:0:0:::0:0&Content\\_6301=6187:1670927:::1:6318:17:::0:0&RiskList\\_6303=6319:0:31,2365:1:0:0:::0:0](http://www.vkm.no/eway/default.aspx?pid=277&trg=Content_6301&Main_6177=6301:0:31,2365:1:0:0:::0:0&Content_6301=6187:1670927:::1:6318:17:::0:0&RiskList_6303=6319:0:31,2365:1:0:0:::0:0)
- VKM (2008b). *Helse- og miljørisikovurdering av Monsanto's genmodifiserte maishybrid MON 89034 x NK603 (EFSA/GMO/NL/2007/38). Uttalelse fra Faggruppe for genmodifiserte organismer 9.05.08. (07/319)*. Vitenskapskomiteen for mattrygghet, Oslo, Norge.  
<http://www.vkm.no/dav/f25f42ecd7.pdf>
- VKM (2009). *Uttalelse om bruk av glyfosat i genmodifisert mais og sukkerbete medfører høyere risiko for helse og/eller miljø enn bruk i allerede godkjente bruksområder. Uttalelse fra*

*Faggruppe for plantevernmidler 23. juni 2009. (09/205). Vitenskapskomiteen for mattrygghet, Oslo, Norge.*  
[http://www.vkm.no/eway/default.aspx?pid=277&trg=Content\\_6482&Main\\_6177=6498:0:31,2304:1:0:0:::0:0&Content\\_6482=6187:1686553::1:6566:3:::0:0](http://www.vkm.no/eway/default.aspx?pid=277&trg=Content_6482&Main_6177=6498:0:31,2304:1:0:0:::0:0&Content_6482=6187:1686553::1:6566:3:::0:0)

- Young, B.G. (2006). Changes in herbicide use patterns and production practices resulting from glyphosate-resistant crops. *Weed Technology*, **20**, 301-307.
- Zablotowicz, R.M. & Reddy, K.N. (2004). Impact of glyphosate on the *Bradyrhizobium japonicum* symbiosis with glyphosate-resistant transgenic soybean: A mini-review. *Journal of Environmental Quality*, **33**, 825-831.
- Zeilinger, A., Andow, D., Zwahlen, C. & Stotzky, G. (2010). Earthworm populations in a northern U.S. Cornbelt soil are not affected by long-term cultivation of Bt maize expressing Cry1Ab and Cry3Bb proteins. *Soil Biology and Biochemistry*. *In press*.
- Zurbrugg, C., Hönemann, L., Meissle, M., Romeis, J. & Nentwig, W. (2010). Decomposition dynamics and structural plant components of genetically modified Bt maize leaves do not differ from leaves of conventional hybrids. *Transgenic Research*, **19**, 257-267.
- Zwahlen C, Nentwig W, Bigler F & Hilbeck A (2000). Tritrophic interactions of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn, *Anaphothrips obscurus* (Thysanoptera : Thripidae), and the predator *Orius majusculus* (Heteroptera : Anthocoridae). *Environmental Entomology* **29**, 846-850.
- Zwahlen, C., Hilbeck, A., Gugerli, P. & Nentwig, W. (2003a). Degradation of the Cry1Ab protein within transgenic *Bacillus thuringiensis* corn tissue in the field. *Molecular Ecology*, **12**, 765-775.
- Zwahlen, C., Hilbeck, A., Howald, R. & Nentwig, W. (2003b). Effects of transgenic Bt corn litter on the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Molecular Ecology*, **12**, 1077-1086.
- Zwahlen, C., Hilbeck, A. & Nentwig, W. (2007). Field decomposition of transgenic Bt maize residue and the impact on non-target soil invertebrates. *Plant Soil*, **300**, 245-257.
- Åkerholm Espeby, L. & Fogelfors, H. (2006). *Utveckling av herbicidresistens ogräs i Sverige – identifiering och omfattning. Slutrapport 2006*. Institutionen för växtproduktions-ekologi vid Sveriges Lantbruksuniversitet, Uppsala.

## **VEDLEGG I**

Uttalelse om bruk av glyfosat i genmodifisert mais og sukkerbete medfører høyere risiko for helse og/eller miljø enn bruk i allerede godkjente bruksområder. Faggruppe for plantevernmidler i Vitenskapskomiteen for mattrygghet 23. juni 2009.