



Vitenskapskomiteen for mattrygghet  
Norwegian Scientific Committee for Food Safety

---

## **Foreløpig helse- og miljørisikovurdering av genmodifisert maislinje Event 5307 fra Syngenta Crop Protection AG (EFSA/GMO/DE/2011/95)**

---

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

**Innspill til EFSA's GMO Extranet**

Dato: 25.11.11  
Dok. nr.: 11-310– endelig  
ISBN: 978-82-8259-034-1

**VKM Report 2011: 20**

## Bidragsyttere

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.

### Takk til:

Arbeidsgruppen for GMO-fôr har vurdert søkers dokumentasjon knyttet til komparative analyser og toksisitetstester. Faggruppe for genmodifiserte organismer ønsker å takke arbeidsgruppen for GMO-fôr for deres verdifulle bidrag til denne risikovurderingen

### Medlemmer av arbeidsgruppe for GMO mat og fôr:

Aksel Bernhoft (leder, Faggruppe for fôr til terrestriske og akvatiske dyr ), Monica Sanden (*ad hoc*-ekspert), Åshild Andreassen og Rose Vikse (Faggruppe for GMO).

### Vurdert av

#### Faggruppe for genmodifiserte organismer:

Audun H. Nerland (leder), Åshild Andreassen, Per Brandtzæg, Askild Holck, Olavi Junttila, Heidi Sjursen Konestabo, Richard Meadow, Kåre M. Nielsen, Hilde-Gunn Hoen-Sorteberg, Rose Vikse

#### Koordinatorer fra sekretariatet:

Arne Mikalsen og Merethe Aasmo Finne

## Sammendrag

Den foreløpige helse- og miljørisikovurderingen av insektresistent maislinje 5307 (EFSA/GMO/DE/2011/95) fra Syngenta Crop Protection AG er utført av Faggruppe for genmodifiserte organismer i Vitenskapskomiteen for mattrygghet (VKM). Vitenskapskomiteen for mattrygghet er bedt av Mattilsynet og Direktoratet for naturforvaltning om å vurdere helse- og miljørisiko ved en eventuell godkjenning av maislinje 5307 til import prosessering, og til bruk i næringsmidler og fôrvarer. Søknaden gjelder ikke dyrking.

Risikovurderingen er basert på uavhengige vitenskapelige publikasjoner og dokumentasjon som er gjort tilgjengelig på EFSAs nettside EFSA GMO Extranet. Vurderingen er gjort i henhold til tiltenkt bruk i EU/EØS-området, og i overensstemmelse med miljø- og helsekravene i matloven og genteknologiloven med forskrifter, først og fremst forskrift om konsekvensutredning etter genteknologiloven. Videre er kravene i EU-forordning 1829/2003/EF, utsettingsdirektiv 2001/18/EF (vedlegg 2,3 og 3B) og veiledende notat til Annex II (2002/623/EF), samt prinsippene i EFSAs retningslinjer for risikovurdering av genmodifiserte planter og avledete næringsmidler (EFSA 2006, 2010, 2011) og Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) konsensusdokument for mais (OECD 2002) lagt til grunn for vurderingen.

Den vitenskapelige vurderingen omfatter transformeringsprosess og vektorkonstruksjon, karakterisering og nedarving av genkonstruksjonen, komparativ analyse av ernæringsmessig kvalitet, mineraler, kritiske toksiner, metabolitter, antinæringsstoffer, allergener og nye proteiner. Videre er agronomiske egenskaper, potensiale for utilsiktede effekter på fitness, genoverføring og effekter på ikke-målorganismer vurdert.

Det presiseres at VKMs mandat ikke omfatter vurderinger av etikk, bærekraft og samfunnsnytte, i henhold til kravene i den norske genteknologiloven og dens konsekvensutredningsforskrift. Disse aspektene blir derfor ikke vurdert av Faggruppe for genmodifiserte organismer.

Maislinjen 5307 har fått innsatt det kimære genet *ecry3.1ab*. Genet er satt sammen av to ulike gener, et modifisert *cry3A* (*mcry3A*) og *cry1Ab*, begge fra bakterien *Bacillus thuringiensis*. *eCry3.1Ab*-genet uttrykker fusjonstoksinet (en kimær) *eCry3.1Ab*, som gir plantene resistens mot skadeinsekter i billeslekten *Diabrotica*.

Den innsatte genkonstruksjonen inneholder videre et *pmi*-gen fra *Escherichia coli*. Genet koder for enzymet fosfomannose isomerase (PMI), som omdanner mannose-6-fosfat til fruktose-6-fosfat. I motsetning til umodifiserte planteceller kan maisceller, som uttrykker *pmi*-genet, benytte mannose som sin primære karbonkilde. I henhold til søker er genet introdusert som seleksjonsmarkør under transformasjonsprosessen. Maislinjen 5307 inneholder derfor ingen markørgener for antibiotikaresistens.

### Molekylær karakterisering

Faggruppen vurderer karakteriseringen av det rekombinante DNA-innskuddet i maislinjen 5307, og de fysiske, kjemiske og funksjonelle karakteriseringen av proteinene til å være tilfredsstillende. Faggruppen har ikke identifisert noen risiko knyttet til det som framkommer av den molekylærbiologiske karakteriseringen av det rekombinante innskuddet i maislinjen.

### Komparative analyser

Analysen av ernæringsmessige komponenter er i hovedsak utført i tråd med OECDs konsensusdokument for mais (OECD 2002). Det er påvist signifikante forskjeller mellom testlinjen 5307 og umodifisert kontroll i enkeltparametere. Verdiene for de analyserte komponentene ligger

imidlertid innenfor typiske verdier for andre maissorter som er rapportert i litteraturen, samt innenfor toleranseintervallene for de umodifiserte referansesortene som er inkludert i søkers dokumentasjon.

Faggruppen påpeker at søker ikke har foretatt analyser av vitamin C. Det understrekes at konsensusdokumentet i størst mulig grad skal følges når det legges fram dokumentasjon på nivåene av næringsstoffer, antinæringsstoffer og metabolitter. Faggruppen vektlegger imidlertid at hoveddelen av maisforbruket i Norge er som dyrefôr og at mais til humant konsum utgjør mindre enn 1 % av energiinntaket både for voksne og barn under ett år. Daglig inntak av sukkermais vil bidra med 0,5 % av daglig anbefaling for vitamin C ved inntak lik medianen (data fra Den Norske mor barn studien). Ved maisinntak på 17,5 g/dag (97,5 % persentilen) vil ca 2,6 % av daglig anbefaling for vitamin C dekkes. Når det gjelder dyrefôr ansees det naturlige vitamininnholdet i mais å være uten betydning da all mais som benyttes som fôr vitaminberikes i henhold til Mattilsynets anbefalinger. Tilsvarende angis krav til ernæringsmessig sammensetning av kornbasert barnemat i vedlegg 1 i Forskrift om bearbeidet kornbasert barnemat og annen barnemat til spedbarn og småbarn (FOR 2002-10-18 nr 1185). Faggruppen vurderer derfor at et eventuelt avvikende nivå av vitamin C i 5307 har liten ernæringsmessig betydning i Norge.

Med unntak av insektsresistens viser feltforsøk over to vekstsesonger i USA små eller ingen signifikante forskjeller mellom den transgene maisen 5307 og umodifisert, nær-isogen kontrollinje med hensyn på agronomiske karakterer.

#### **Toksisitet og allergenitet**

Akutte fôringsstudier (oral sondefôring) på mus med bakterieframstilt PMI- og eCry3.1Ab-protein og 42 dagers fôringsforsøk med broilere viste ingen skadelige helseeffekter på forsøksdyrene. Faggruppen påpeker at det burde ha vært utført foringsforsøk på relevante dyrarter/grupper, eksempelvis fisk, samt nittidagers fôringsforsøk på rotter.

Søker har feilaktig beregnet risiko ut fra enkelt akuttstudium med enkel eksponering og 2 ukers observasjonstid. Risiko skal beregnes ut fra 90-dagers fôringsstudie.

Ingen av proteinene PMI og eCry3.1Ab har likheter med kjente allergener (IgE-bindende epitoper) eller egenskaper som tilsier at de er allergener. Det er imidlertid ikke vurdert om eCry3.1Ab-toksinet kan ha adjuvanseffekter, d.v.s. fremming av immunreaksjon mot andre proteiner.

#### **Miljørisiko**

Søknaden gjelder godkjenning av mais 5307 for import, prosessering og til bruk i næringsmidler og fôrvarer. Faggruppen har derfor ikke vurdert mulige miljøeffekter knyttet til dyrking av maisen. Faggruppen finner ingen indikasjoner på økt sannsynlighet for spredning, etablering og invasjon av maisen i naturlige habitater eller andre arealer utenfor jordbruksområder som resultat av frøspill i forbindelse med transport og prosessering. Norge er i utkanten av dyrkingsområdet for mais, dyrkingsomfanget er svært begrenset og det er ingen stedege eller introduserte viltvoksende arter som mais kan hybridisere med.

Faggruppen har identifisert flere svakheter ved søkers fôringsstudier. Disse er spilt inn til EFSA GMO Extranet.

Risikovurderingen av den genmodifiserte maislinjen vil ferdigstilles og slutføres av Faggruppen for genmodifiserte organismer når endelig dokumentasjon fra søker foreligger.

## Nøkkelord

Mais, *Zea mays* (L.), genmodifisert mais 5307, EFSA/GMO/DE/2011/95, insektsresistens, eCry3.1Ab, PMI, helsemessig trygghet, helse, miljørisiko, forordning 1829/2003/EF, direktiv 2001/18/EF

## Forkortelser og ordforklaringer

ADF	Acid detergent fiber, fiberfraksjon av ufordøyelig plantemateriale i fôr, vanligvis cellulosefiber dekket med lignin og silikat. Plantematerialet fordøyes med en syre-detergentløsning (ADF). Ufordøyd masse betegnes som ADF. Fôr med lavt ADF-innhold er mer fordøyelig og har større energiinnhold.
Allel	Et bestemt gen kan foreligge i ulike varianter (alleler). Allelene kan være dominante (bestemmende for fenotypen) eller recessive (vikende).
ALS	Acetolactatsyntase-enzym
ARMG	Antibiotikaresistensmarkørgen
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 reduserer 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>B.t.</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Codex	FAO/WHO-organ som etablerer globale handelsstandarder for mat.
Cry	Krystall protein fra <i>Bacillus thuringiensis</i>
Cry1Ab	δ-endotoksin isolert fra jordbakterien <i>Bacillus thuringiensis</i> subspecies <i>kurstaki</i> . Toksinet gjør maisplante resistente mot angrep fra enkelte arter i ordenen <i>Lepidoptera</i> .
DG JRC-EURL	Directorate-General Joint Research Centre - European Union Reference Laboratory
DN	Direktoratet for naturforvaltning
DNA	Deoxyribonukleinsyre (DNA)
Dominant allel	Et allel som uttrykker samme fenotype, uavhengig av om allelene i genparet er like (homozygot) eller ulike (heterozygote).
eCry3.1Ab	Modifisert Cry-toksin fra jordbakterien <i>Bacillus thuringiensis</i> . Toksinet gjør maisplante resistente mot angrep fra enkelte arter i billeslekten <i>Diabrotica</i> .
EFSA	European Food Safety Authority
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FAO	Food and Agriculture Organization, FNs 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.
GLP	Good Laboratory Practices, retningslinjer for godt laboratoriearbeid.
GMO	Genmodifisert organisme
GMP	Genmodifisert plante
Konstitutiv	Cellulær produksjon av et molekyl med konstant hastighet og som ikke reguleres av indre og ytre stimuli.
Konstitutivt gen	Et gen hvis aktivitet bare avhenger av hvordan promoteren til genet binder RNA polymerase.
Locus	Spesifikk posisjon på kromosomet der et gen er lokalisert.
MALDITOF	Massespektrometrimetode for å måle molekylvekt til peptider.
Mannose	Monosakkarid

Mendelsk nedarving	Lovmessig nedarvingsmønster ved ulike typer kryssinger.
MT	Mattilsynet
NOAEL	No observed adverse effect level – dosenivå hvor ingen skadelige effekter observeres.
NOEL	No observed effect level - nulleffektnivå
NDF	Neutral detergent fiber, dvs. fiberfraksjon som inneholder hemicellulose og ADF.
Northern blot	Teknikk for overføring av RNA til en membran for påvisning av uttrykte RNA-sekvenser.
Nær-isogen linje	Linjer eller sorter som er genetisk identiske, med unntak av ett lokus eller kromosomsegment.
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
ORF	Open Reading Frame (åpen leseramme)
OSWP	Overseason whole plant
PCR	Polymerase chain reaction. Polymerase kjedereaksjon. Metode for å syntetisere et stort antall kopier av en DNA-sekvens vha primere.
RNA	Ribonukleinsyre
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat (SDS)-polyakrylamidelektroforese. Elektroforesemetode 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 som er i 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) flankesequenser, og begrenser derfor den delen av Ti-plasmidet som overføres og gjør at resten av vektoren ikke blir satt inn i plantekromosomene.
USDA	United States Department of Agriculture
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: melkemosning
	R4: deigmosning
	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

## Innholdsfortegnelse

<b>Bidragstyttere</b> .....	<b>2</b>
<b>Sammendrag</b> .....	<b>3</b>
<b>Nøkkelord</b> .....	<b>5</b>
<b>Forkortelser og ordforklaringer</b> .....	<b>6</b>
<b>Innholdsfortegnelse</b> .....	<b>8</b>
<b>Bakgrunn</b> .....	<b>9</b>
<b>Oppdrag fra Direktoratet for naturforvaltning og Mattilsynet</b> .....	<b>9</b>
<b>Risikovurdering</b> .....	<b>11</b>
<b>1 Innledning</b> .....	<b>11</b>
1.1 Beskrivelse av egenskaper og virkningsmekanismer .....	11
<b>2 Molekylær karakterisering</b> .....	<b>11</b>
2.1 Transformasjon og vektorkonstruksjon.....	11
2.2 Karakterisering av geninnsettingen/genkonstruksjonen.....	13
2.3 Informasjon vedrørende uttrykk av innsatte gener og åpne leserammer (ORF) .....	14
2.4 Nedarving og stabilitet av innsatt DNA .....	16
2.5 Vurdering basert på tilgjengelig datagrunnlag .....	16
<b>3 Komparative analyser</b> .....	<b>18</b>
3.1 Valg av komparator og produksjon av plantemateriale for komparative analyser .....	18
3.2 Analyser av ernæringsmessige komponenter .....	19
3.3 Agronomiske karakterer.....	28
3.4 Vurdering basert på tilgjengelig datagrunnlag .....	29
<b>4 Dokumentasjon av toksisitet og allergenisitet</b> .....	<b>31</b>
4.1 Toksisitet.....	31
4.1.1 Temperaturstabilitetstesting av eCry3.1Ab og PMI, samt bioassay-testing av eCry3.1Ab. ....	31
4.1.2 Akutt oral fôringsstudie på mus .....	32
4.1.3 Fôringsstudier på rotter er ikke utført .....	34
4.1.4 Fôringsstudie på broiler .....	34
4.2 Allergenisitet .....	35
4.3 Vurdering basert på tilgjengelig datagrunnlag .....	35
<b>5 Miljøriskovurdering</b> .....	<b>36</b>
5.1 Potensiale for utilsiktede effekter på fitness relatert til genmodifiseringen .....	36
5.2 Potensiale for genoverføring .....	36
5.3 Potensiale for samspill mellom GMP og målorganismer.....	38
5.4 Potensiale for samspill mellom GMP og ikke-målorganismer .....	38
5.4 Overvåking.....	38
5.5 Vurdering basert på tilgjengelig datagrunnlag .....	39
<b>6 Vurdering av søkers dokumentasjon, kunnskapshull</b> .....	<b>40</b>
<b>7 Innspill til EFSA GMO Extranet søknad EFSA/GMO/DE/2011/95</b> .....	<b>43</b>
<b>Vurdering basert på tilgjengelig datagrunnlag</b> .....	<b>44</b>
<b>Vedlegg</b> .....	<b>50</b>



## Bakgrunn

Vitenskapskomiteen for mattrygghet (VKM) er bedt av Mattilsynet og Direktoratet for naturforvaltning om å utføre en vitenskapelig risikovurdering av den genmodifiserte maislinjen 5307 fra Syngenta Crop Protection AG (EFSA/GMO/DE/2011/95) med hensyn på mulig helse- og miljørisiko. Event 5307 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 omfatter bruksområdene import, prosessering, næringsmidler og fôrvarer, men gjelder ikke dyrking.

Søknaden ble fremmet og anbefalt av tyske myndigheter i april 2011. Dokumentasjonen knyttet til søknaden ble lagt ut på EFSA-nett 21. juni 2011, med frist på 90-dager for innspill fra EU- og EØS/EFTA-landene.

Maislinjen 5307 er foreløpig ikke godkjent i noen land (CERA 2011), men i henhold til Syngenta er 5307 søkt godkjent for kommersiell dyrking og omsetning som mat og/eller fôr i Australia, Canada, Japan og Korea (EFSA/GMO/DE/2011/95).

## Oppdrag fra Direktoratet for naturforvaltning og Mattilsynet

### Mattilsynet

Mattilsynet har i brev datert 15.10.2010 (ref. 2010/195445) gitt Vitenskapskomiteen for mattrygghet i oppdrag å foreta løpende vitenskapelige vurderinger av helserisiko av genmodifiserte organismer til bruk som mat og fôr, samt avledete, prosesserte ikke-spirodyktige næringsmidler og fôrvarer som søkes godkjent under EUs forordning 1829/2003/EF. Videre er VKM bedt om å vurdere landbruksrelatert miljørisiko for genmodifiserte planter som søkes godkjent under samme forordning, og som er relevant for dyrking i Norge. Avhengig av hvilket bruksområde de genmodifiserte plantene søkes godkjent for, gjelder oppdraget miljørisiko knyttet til import, transport, videreføring/prosessering og dyrking. Ved dyrkingssøknader skal VKM vurdere miljørisiko som følge av introduserte egenskaper i den genmodifiserte planten i forhold til dagens sortsmateriale, og miljørisiko som følge av endret dyrkingspraksis ved dyrking av den genmodifiserte planten (bla plantevernbruk og jordarbeiding) i forhold til ordinært driftsopplegg. Oppdraget omfatter både direkte og sekundære effekter av endret dyrkingspraksis.

I forbindelse med søknader som omfatter dyrking skal VKM også vurdere risiko knyttet til sameksistens. Vurderingen skal omfatte potensiale for spredning av genmodifisert materiale til arealer og avlinger fra arealer der det ikke dyrkes genmodifiserte planter, utvikling av ugraspopulasjoner, samt spredning til ville populasjoner av samme art eller nærstående arter utenfor dyrking. Vurdering av søkers miljøovervåkingsplan (generell og spesifikk) inngår ikke i Mattilsynets oppdrag.

### Direktoratet for naturforvaltning

Direktoratet for naturforvaltning (DN) har i brev datert 15.6.2011 (ref. 2008/4367 ART-BI-BRH) gitt VKM i oppdrag å foreta vurderinger av miljørisiko for søknader om utsetting under EU-direktiv 2001/18 og søknader under EUs forordning 1829/2003, og som er relevante i forhold til den norske genteknologiloven. Oppdraget fra DN til VKM omfatter utarbeidelse av vitenskapelige spørsmål og

kommentarer, samt foreløpige miljørisikovurderinger for disse søknadene. VKM er også bedt om å utarbeide endelige miljørisikovurderinger i forbindelse med nasjonal slutføring av søknadene.

Grunnlaget for vurdering av søkers miljørisikovurdering er nedfelt i lov om fremstilling og bruk av genmodifiserte organismer (genteknologiloven), forskrift om konsekvensutredning etter genteknologiloven, EUs utsetningsdirektiv 2001/18/EF, veiledende notat til Annex II til direktiv 2001/18 (2002/623/EC) og EU-forordning 1829/2003. Videre vil EFSAs veiledningsdokumenter for risikovurdering av genmodifiserte planter og avledete produkter (EFSA 2006, 2010, 2011), og OECDs veiledningsdokumenter være nyttige i utarbeidelsen av en norsk risikovurdering.

I henhold til oppdragsbrev fra DN skal VKM 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 bruksmønster av plantevernmidler.

VKMs foreløpige miljørisikovurdering skal også ta hensyn til søkers 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, som forsinkede og indirekte virkninger påvist i miljørisikovurderingen.

I henhold til oppdragene fra Mattilsynet og DN skal VKM, for nevnte søknader uten særskilt oppdrag, gi innspill til EFSA GMO Extranet (første innspillsrunde). Kopi av innspill sendes Mattilsynet og DN. Dersom det ikke gis innspill til søknadene orienterer også VKM Mattilsynet og DN om dette. Mattilsynet ber også om at det synliggjøres i risikovurderingen om søker har fulgt EFSAs retningslinjer for risikovurdering av genmodifiserte planter og avledete næringsmidler og fôrvarer (EFSA 2006, 2010, 2011).

VKM skal videre følge opp EFSAs behandling av innspillene og vurdere hvorvidt VKMs innspill til EFSA GMO Extranet er tilfredsstillende ivarettatt i EFSAs vurdering.

Søknad EFSA/GMO/DE/2011/95, genmodifisert maislinje 5307, ble lagt ut på EFSAs GMO Extranet 21. juni 2011. Faggruppe for genmodifiserte organismer skal i tråd med oppdragsbrevene utarbeide helse- og miljørisikovurdering av maislinjen til import og industriell prosessering, samt til bruk som næringsmiddel og fôrvare. Søknaden omfatter ikke dyrking. Vurderingen skal utføres i henhold til tiltenkt bruk og i overensstemmelse med prinsippene som er nedfelt i EFSAs retningslinjer for risikovurdering av genmodifiserte planter og avledete næringsmidler og fôrvarer (EFSA 2006, 2010, 2011).

*Produktet som ønskes vurdert*

Genmodifisert mais, EFSA/GMO/DE/2011/95 (5307).

Unik kode: SYN-Ø53Ø7-1.

Status i EU: Søknad under forordning 1829/2003/EF. Frist for innspill til EFSA-net: 21.09.11.

Ønsket svarfrist til Mattilsynet og Direktoratet for naturforvaltning: 19.09.11.

# Risikovurdering

## 1 Innledning

Helse- og miljørisikovurderingen av den genmodifiserte maisen Event 5307 er basert på dokumentasjon som er gjort tilgjengelig på EFSAAs nettside EFSA GMO Extranet. I tillegg er det benyttet uavhengige vitenskapelige publikasjoner med referee i vurderingen. Maislinjen 5307 er risikovurdert i henhold til tiltenkt bruk i EU/EØS-området, og i overensstemmelse med miljø- og helsekravene i matloven og genteknologiloven med forskrifter, først og fremst forskrift om konsekvensutredning etter genteknologiloven. Videre er kravene i EUs forordning 1829/2003/EF og utsetningsdirektiv 2001/18/EF med annekser, lagt til grunn for vurderingen.

Faggruppen har vedtatt å benytte EFSAAs retningslinjer som retningslinjer for vurdering av genmodifiserte planter. Prinsippene som er lagt til grunn for vurderingen er derfor hentet fra EFSAAs veiledningsdokumenter for risikovurdering av genmodifiserte planter og avledete næringsmidler og fôrvarer (EFSA 2006, 2010, 2011). Ved vurdering av vesentlig likhet har faggruppen lagt vekt på OECDs konsensusdokument for mais (OECD 2002), som gir anbefalinger over hvilke parametere som bør undersøkes.

### 1.1 Beskrivelse av egenskaper og virkningsmekanismer

Den genmodifiserte maislinjen 5307 er fremkommet ved *Agrobacterium*-mediert transformasjon av embryo fra den konvensjonelle maishybriden NP2171 x NP2460. Linjen har fått innsatt det kimære genet *ecry3.1Ab*, en kombinasjon av *cry3A*-genet fra bakterien *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* og *cry1Ab* fra *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1. *eCry3.1Ab*-genet uttrykker toksinet eCry3.1Ab, som gir maisplantene resistens mot angrep fra larver i billeslekten *Diabrotica*.

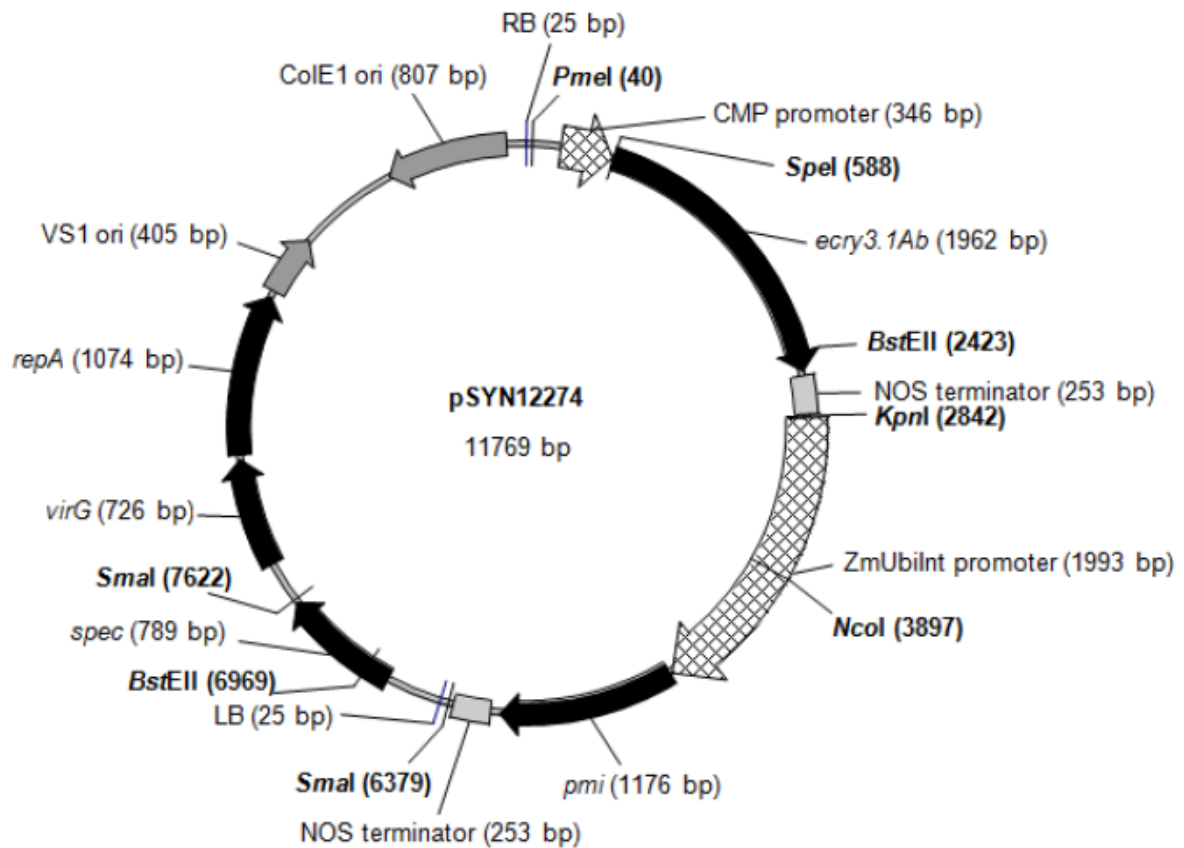
Den innsatte genkonstruksjonen inneholder også genet *pmi/manA* fra *Escherichia coli*. Genet koder for enzymet fosfomannose isomerase (PMI), som omdanner mannose-6-fosfat til fruktose-6-fosfat. I motsetning til umodifiserte planteceller kan maisceller, som uttrykker *pmi*-genet, benytte mannose som sin eneste karbonkilde. I henhold til søker er genet introdusert som seleksjonsmarkør under transformasjonsprosessen. Maislinjen 5307 inneholder derfor ingen markørgener for antibiotikaresistens.

## 2 Molekylær karakterisering

### 2.1 Transformasjon og vektorkonstruksjon

Maishybriden 5307 ble utviklet med *Agrobacterium*-transformering av embryo fra tidlige utviklingsstadier (unge/umodne). Metoden er beskrevet av Negrotto *et al.* 2000, og den aktuelle *Agrobacterium*-stammen og Ti-plasmidet er beskrevet av Hoekema *et al.* 1983 og Ooms *et al.* 1982.

Transformeringen ble gjort med plasmidet pSYN12274 (figur 1). Nøyaktig beskrivelse av innsatte gener og genelementer er vist i tabell 1. DNAet som er overført, dvs. T-DNAet (transfer DNA) er plassert mellom venstre og høyre grense (left og right border; LB og RB). Dette er imidlertid satt mellom RB og LB på vedlagte figur og tabell. Siden det enkelttrådede T-DNAet kuttet ved RB, og avleses derfra, kan dette forklare plassering og rekkefølge i konstruktet.



**Figur 1. Plasmidet pSYN12274 benyttet i transformeringen av maislinjen 5307.**

Det kimære *ecry3.1Ab*-genet består av henholdsvis *mcry3A* (maisoptimalisert *cry3A*) og *cry1Ab*. Begge genene er opprinnelig kodon optimalisert for tilpassning til mais (Koziel et al. 1997; Murray et al. 1989). I *mcry3A* er det gjort en ytterligere modifisering d.v.s. innsatt en konsensus cathepsin-G protease gjenkjenningssete i proteinet fra aminosyre 155 i den opprinnelige aminosyrekjeden. Alanin – alanin – prolin – phenylalanin har erstattet den opprinnelige valine – serine – serine sekvensen fra plass 155 til og med 157 (Chen & Stacy 2007).

**Tabell 1. T-DNA- innskudd med donorgener og regulatoriske sekvenser i plasmidet pSYN12274.**

Genetisk element	Beskrivelse
<i>CMP</i> -promoter	<i>Cestrum Yellow Leaf Curling Virus</i> promoter (346 bp), som gir konstitutivt uttrykk i mais (Hohn <i>et al.</i> 2007).
<i>ecry3.1Ab</i>	Et modifisert <i>cry</i> -gen (1962 bp), som gir resistens mot flere <i>Diabrotica</i> -arter. Entrez Accession No. GU327680. Sekvensen er en kombinasjon av de opprinnelige genene <i>cry3A</i> fra <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>tenebrionis</i> og <i>cry1Ab</i> fra <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> HD-1 (Sekar <i>et al.</i> 1987, Geiser <i>et al.</i> 1986).
<i>nospA</i>	NOS terminator fra <i>A. tumefaciens</i> (Entrez Accession No. V00087) som gir polyadenylering (Depicker <i>et al.</i> 1982).
<i>ZmUbiInt</i> -promoter	Promoter fra maisgenet <i>polyubicutin</i> inkludert første intron (1993 bp), som gir konstitutivt uttrykk i enfrøbladete arter (Christensen <i>et al.</i> 1992). Entrez Accession No. S94464.
<i>pmi/manA</i>	Enzymet PMI fra <i>E. coli</i> (Entrez Accession No. M15380) katalyserer isomerisering av mannose-6-fosfat til fruktose-6-fosfat (Negrotto <i>et al.</i> 2000).
<i>nospA</i>	NOS-terminator (Entrez Accession No. V00087), som gir polyadenylering (Depicker <i>et al.</i> 1982).

## 2.2 Karakterisering av geninnsettingen/genkonstruksjonen

### eCry3.1Ab

Det kimære Cry-proteinet (totalt 653 residuer langt og omtrent 73,7 kDa stort), består av deler av mCry3A i N-terminal enden og Cry1Ab i C-terminal enden (se fig D.1.-1 fra Technical Dossier i vedlegg). Det består av en 22 enheter lang variabel N terminal ende (MTSNGRQCAGIRPYDGRQHRG), mens de neste 459 aminosyrene er identiske med mCry3A og de siste 172 aminosyrene er fra Cry1Ab.

### PMI

PMI-proteinet kodes av et gen med samme gensekvens som hos verten *E. coli*, og som er benyttet i maislinje MIR162 fra samme selskap. I Event 5307 har det skjedd en endring i to aminosyrer fra vertens opprinnelige protein, og det som dannes i MIR 162 og Event 3272 fra Syngenta. Proteinet virker spesifikt på mannose-6-fosfat og fruktose-6-fosfat-reaksjonen, og er derfor en god seleksjonsmarkør for transgene celler (Freeze 2002).

Southern analyser viser at det er overført en enkelt kopi av plasmidet pSYN12274; dvs en enkel kopi av hver av de to promoterene og genene på T-DNAet og to NOS terminatorer som avslutter transkripsjonen av genene. Hybridiseringsresultatene indikerer videre at det ikke er overført deler av resten av vektoren d.v.s. utenfor LB og RB av plasmidet til planten, og at det heller ikke er flere integreringsplasser i maislinjens genom.

Hele det integrerte T-DNAet er videre sekvensert, og resultatene bekrefter at alle genelementene er overført intakte uten vesentlige endringer. Sekvenseringsanalysene viser at RB ikke er overført til 5307. Det er også vist at noen ikke-kodende baser i begge endene er deleterte, samt at åtte baser av LB er deletert. Ingen av disse endringene har betydning for funksjonen av de overførte genelementene i T-DNAet til Event 5307.

Sekvenseringen av det overførte T-DNAet gir mer detaljert informasjon om overført DNA enn Southern analyser gir. Små endringer skjer spontant ved vanlig replikasjon (kopiering av DNAet fra morceller til datterceller i mitosen) ved PCR-oppformering av DNA, og dermed også ved *Agrobacterium* overføring av T-DNA. I tillegg er 3'enden av T-DNAet mer utsatt for deleasjoner eller ikke overføring til plantecellene. Derfor plasseres generelt det viktige genet for overføringen oppstrøms altså i 5'enden nærmest RB-enden og seleksjonsgenet nedstrøms mot LB. Med plassering av seleksjonemarkøren her, sikrer en at genet av interesse er med i alle GMOer som regenereres. Dette sikres så lenge de overlever på seleksjonsmediet, dvs. har seleksjonsgenet overført.

Integreringsplassen i maisens genom ble bestemt med qRT-PCR. Dette er en teknikk som blir benyttet til å bestemme hvor høyt et gen uttrykkes, siden det gir et antatt kopitall av mRNA-molekylene til enhver tid. Det finnes ulike måter å utføre denne teknikken på. Søker har utviklet en egen type, real-time kvantitativ TaqMan metode. Syngenta har søkt DG JRC-EURL for validering av TaqMan metoden samtidig med søknaden til EFSA for denne GMOen. Valg av primere gjør at en kan utføre ulike tester med denne PCRen, som f.eks. å lese DNA-sekvensen fra innsatt T-DNA inn i maisens genom på hver side av det innsatte DNAet. På denne måten finner en hvor i maisens genom DNAet er integrert, og dermed også eventuelle endringer i maisens opprinnelige genomsekvens. Testen viste at 33 baser fra maisens genom ble deletert ved innsettingen av T-DNAet. Sekvensering og blast-sammenligninger i databaser, viste at T-DNAet er integrert i et repetitivt DNA område i genomet, som videre finnes på flere kromosomer. Det tyder derfor på at DNAet ikke er satt inn i uttrykte gener. Dette bekreftes av bioinformatiske analyser av både DNA-sekvensen og stipulerte mulige proteinsekvenser (BLASTN, BLASTP & BLASTX).

### **2.3 Informasjon vedrørende uttrykk av innsatte gener og åpne leserammer (ORF)**

Dokumentasjonen fra søker inkluderer resultater fra en proteinkspresjonsstudie med testlinjen 5307 og en umodifisert, nær-isogen kontrollhybrid (NP2171 x NP2460). I henhold til Syngenta var testlinjen en hybridlinje av 5307, som er hemizygot for begge transgenene.

Feltforsøkene ble gjennomført på fire lokaliteter i USA (Illinois og Minnesota) vekstsesongen 2008. Forsøkene ble lagt ut som fullstendig randomiserte blokkdesign med to gjentak.

Konsentrasjonen av eCry3.1Ab og PMI ble målt i blad, røtter og hel plante på fire ulike vekststadier (rosett, blomstring, fysiologisk moden og visning) (tabell 2). I tillegg ble uttrykket av begge proteinene målt i frø når plantene var henholdsvis fysiologisk modne og visne, samt i pollen ved blomstring. Det ble tatt prøver fra henholdsvis 10 planter av testlinjen og to planter av umodifisert kontroll fra hvert forsøkssted på hvert av de fire ulike utviklingsstadiene. Ekspresjonen av eCry3.1Ab- og PMI-proteinene ble målt ved hjelp av enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Resultatene fra studien viser gjennomgående høyere konsentrasjon av Cry-proteinet enn av seleksjonemarkøren PMI. Videre varierer innholdet mellom ulike typer celler som er analysert. Dette er som forventet siden også konstitutive promoterer vil variere i effektivitet mhp transkripsjon av

gensekvensene de regulerer, og også være noe ulikt aktivert i ulike celletyper og på ulike utviklingsstadier. Nivåene av begge proteinene ble betydelig redusert utover vekstsesongen.

I henhold til søkers dokumentasjon var konsentrasjonen av eCry3.1Ab detekterbar eller kvantifiserbar i alle undersøkte vev (tabell 2). De gjennomsnittlige nivåene av proteinet varierte imidlertid betydelig fra under deteksjonsgrensen i pollen til 143 µg/g t.v. i unge blad. I gjennomsnitt over forsøkssteder varierte uttrykket av cry-proteinet i blad fra henholdsvis <LOQ hos visne planter til 279,79 µg/g t.v. på utviklingsstadium V2-V5. Tilvarende varierte konsentrasjonen av proteinet i røtter mellom 1,40 µg/g t.v i visne planter til 42,72 µg/g t.v. tidlig i vekstsesongen. I prøver av hel plante varierte nivået av eCry3.1Ab mellom 3,41 og 178,22 µg/g t.v. og mellom 2,37 og 9,64 µg/g t.v. i frø. I pollen varierte konsentrasjonen av proteinet mellom <LOQ og 0,10 µg/g t.v.

Konsentrasjonen av PMI var detekterbar eller kvantifiserbar i de fleste undersøkte vev. I blad og røtter varierte nivået på tørrvekstbasis mellom <LOQ-8,33 i blad og <LOQ-3,75 i røtter. Tilsvarende variasjonsområde for hel plante og frø oppgis til henholdsvis 0,39-8,83 µg/g t.v. og 0,70-3,82 µg/g t.v. I pollen varierte uttrykket av PMI mellom 5,79 og 7,23 µg/g t.v.

**Tabell 2. Nivå av eCry3.1Ab- og PMI-protein i blad, hel plante, og frø maislinjen 5307 på ulike utviklingsstadier. Resultater fra feltforsøk i USA i 2008 (FZANZ 2011; EFSA/GMO/DE/2011/95).**

Utviklingsstadium	Organ/vev	eCry3.1Ab (µg/g tørrvekt)		PMI (µg/g tørrvekt)	
		Gj.snitt <sup>1</sup> ± SD	Variasjonsområde	Gj.snitt ± SD	Variasjonsområde
Rosettstad. V2-V5	Blad	142,96 ± 53,44	88,65 – 279,79	4,83 ± 1,47	2,97-8,33
	Røtter	42,72 ± 4,67	30,47-69,66	2,11 ± 0,60	1,30-3,75
	Hel plante	111,08 ± 38,36	75,16-178,22	4,23 ± 1,38	2,59-7,69
Blomstring R1	Blad	84,34 ± 9,85	61,37-112,62	2,91 ± 0,33	1,74 -5,20
	Røtter	18,20 ± 5,12	12,39 – 29,59	1,69 ± 0,63	0,97-3,13
	Hel plante	38,14 ± 8,72	14,18–55,67	4,38 ± 2,43	2,00-8,83
	Pollen	-	<LOQ-0,10	6,51 ± 0,72	6,52-7,23
Modning R6	Blad	49,04 ± 31,79	1,46-105,60	-	<LOQ-3,50
	Røtter	11,96 ± 3,96	3,18-22,25	1,85 ± 0,19	0,92-2,88
	Hel plante	16,03 ± 5,45	6,37-38,94	1,83 ± 0,51	0,68-2,56
	Frø	6,19 ± 1,87	2,37-9,64	2,08 ± 0,49	1,04-3,82
Visning	Blad	-	<LOQ-26,50	-	<LOD-0,54
	Røtter	9,13 ± 6,38	1,40-21,74	-	<LOQ-3,02
	Hel plante	8,27 ± 2,90	3,41-25,46	0,97 ± 0,37	0,39-2,02
	Frø	4,45 ± 0,82	2,92-6,76	1,11 ± 0,05	0,70-1,62

<sup>1</sup> Gjennomsnitt representerer data fra 4 lokaliteter. 5 planter ble analysert for hvert prøveuttak. Alle data korrigert for ekstraksjonseffektivitet.

<sup>2</sup> LOQ =Limit of quantification, eCry3.1Ab: LOQ=0,10 µg/g t.v., PMI: LOQ=0,05 µg/g t.v.

<sup>3</sup> LOD= Limit of detection, PMI: LOD=0,01µg/g t.v.

Samtlige seks leserammer på hver side av innskuddet i det genomiske DNAet er analysert, og det ble ikke funnet likhet med kjente gener/proteiner i disse overgangene. Det betyr at det er lite sannsynlig at introdusert DNA, som sammen med maisens opprinnelige DNA kode, kan transkriberes eller translateres til utilsiktede proteiner med biologisk funksjon i den genmodifiserte planten.

## 2.4 Nedarving og stabilitet av innsatt DNA

I henhold til dokumentasjonen fra søker er genetisk stabilitet undersøkt ved å studere nedarvingsmønsteret til de innsatte genene *ecry3.1Ab* og *pmi* over fire generasjoner (F1, BC6, BC7 og NP2171xBC5F<sub>3</sub>) (figur 2). Studien ble utført ved hjelp av real-time PCR. Resultatene viste identisk hybridiseringsmønster over alle undersøkte generasjoner, og viser at det rekombinante DNA-innskuddet er integrert i genomet og nedarves stabilt over generasjoner.

Fenotypisk stabilitet er undersøkt ved å sammenligne uttrykk av proteinene eCry3.1Ab og PMI i ulike plantevev over generasjonene F1, BC6, BC7 og NP2171xBC5F<sub>3</sub>. Planter fra disse generasjonene ble dyrket i veksthus under kontrollerte betingelser, og det ble tatt prøver av blad, røtter og pollen under ulike vekststadier (VT-R1). Søker oppgir at det ble tatt prøver av 5 hemizygoter planter fra hver generasjon. Konsentrasjonen av begge proteinene i alle undersøkte vev og vekststadier ble vist å være sammenlignbare og indikerer konsistent uttrykk av de innsatte genene over generasjoner.

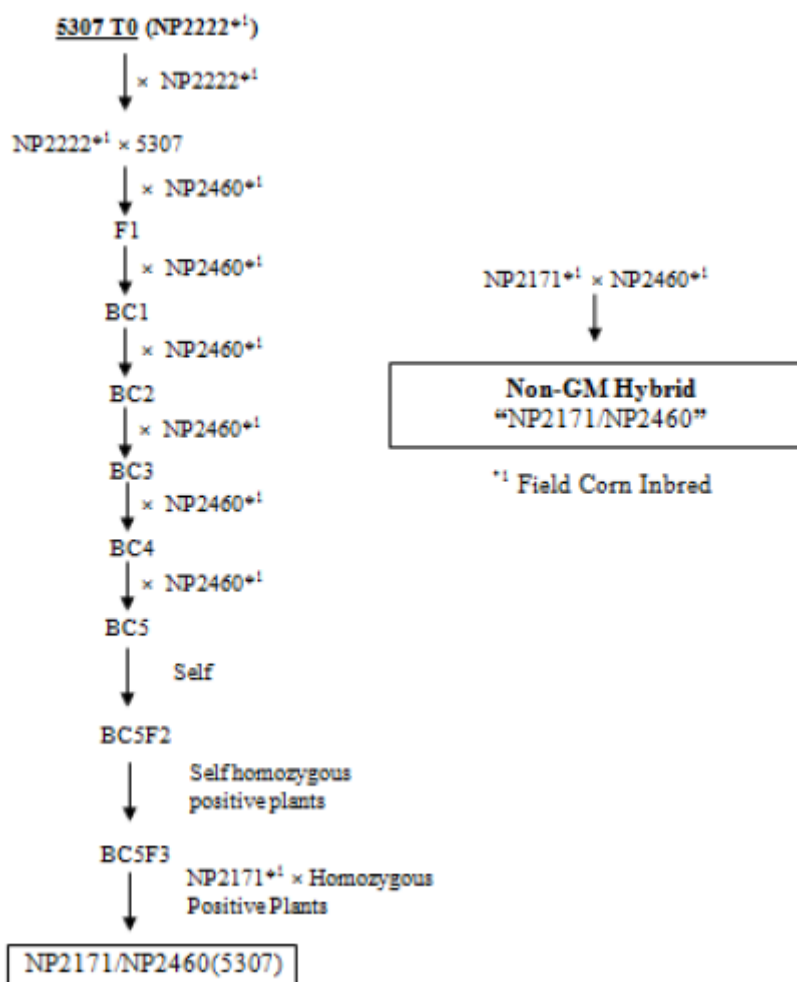
Det konkluderes med at det rekombinante DNA-fragmentet følger mønsteret for mendelsk nedarving av et enkelt, dominant lokus (forventet hemizygot nedarving).

## 2.5 Vurdering basert på tilgjengelig datagrunnlag

Den transgene maislinjen 5307 har fått tilført genene *ecry3.1Ab* og *pmi*. I henhold til søkers informasjon vedrørende integreringsplass og flankesekvenser til de integrerte transgenene, samt analyser ved hjelp av Southern blot er det grunn til å tro at transgenene sitter i et lokus i genomet. Det konkluderes med at nedarvingen av *ecry3.1Ab*- og *pmi*-genet i 5307 følger mønsteret for mendelsk nedarving av ett dominant lokus (hemizygot nedarving), og at fusjonsproteiner ikke uttrykkes i Event 5307.

Faggruppen vurderer karakteriseringen av det rekombinante DNA-innskuddet i maislinjen 5307, og de fysiske, kjemiske og funksjonelle karakteriseringen av proteinene til å være tilfredsstillende. Faggruppen har ikke identifisert noen risiko knyttet til det som framkommer av den molekylærbiologiske karakteriseringen av det rekombinante innskuddet i maislinjen.





Figur 2. Kryssingsskjema for genmodifisert maislinje 5307 (FSANZ 2011). Generasjoner som har inngått i analyse av genetisk stabilitet er uthevet.

## 3 Komparative analyser

### 3.1 Valg av komparator og produksjon av plantemateriale for komparative analyser

Dokumentasjonen som er levert fra Syngenta i tilknytning til søknad om godkjenning av maislinjen 5307 inkluderer komparative analyser av ernæringsmessige, fenotypiske og agronomiske karakterer fra feltforsøk i USA over to vekstsesonger.

#### Ernæringsmessige karakterer

Komparative vurderinger av ernæringsmessige komponenter er basert på feltforsøk på henholdsvis seks steder i statene Illinois, Indiana, Minnesota, Missouri og Wisconsin vekstsesongen 2008 og åtte lokaliteter i Illinois, Iowa, Michigan, Nebraska og Ohio i 2009. I henhold til søker var forsøksstedene lokaliserte i typiske områder for kommersiell maisdyrking i USA og representative for områder som vil være aktuelle for framtidig dyrking av maislinjen 5307.

Feltforsøkene inkluderte testhybriden 5307 (NP2171 x NP2460 (5307)) og en korresponderende, umodifisert, nær-isogen hybridlinje (NP2171 x NP2460) som kontroll (se fig 2). Kontrollinjen har tilnærmet samme genetiske bakgrunn som den transgene hybridene, men inneholder ikke det rekombinante DNA-fragmentet og uttrykker ikke eCry3.1Ab- og PMI-proteiner. Vekstsesongen 2009 ble det også inkludert umodifiserte, kommersielt tilgjengelige maissorter som referansmateriale i forsøkene, åtte sorter på hvert forsøkssted. Referansesortene ble valgt ut på bakgrunn av stivelse-, protein- og fettsyresammensetning, og representerer ulike tidlighetsklasser.

Testlinje, komparator og referansesorter ble plantet i fullstendig randomiserte blokkdesign med tre-fire gjentak per lokalitet. Hver forsøksrute var 8 m<sup>2</sup> og bestod av 68 planter. Søker viser ellers til at dyrkingsregimet var i henhold til vanlig praksis i den enkelte region der forsøkene var lokaliserte.

I henhold til dokumentasjonen fra søker ble det tatt ut prøver fra alle forsøkslokalitetene. Det ble tatt fôrprøver fra samtlige tre blokker, 5 planter fra hver genotype. Prøvetakingen ble foretatt på normalt høstetidspunkt for fôrmais, d.v.s. deigmodningsstadiet (R4). Ved utviklingsstadium R6 ble det høstet kolber fra 15 planter fra hvert gjentak for videre frøanalyser.

Ved sammenligning med normalt variasjonsområde hos konvensjonelle sorter har søker benyttet ILSI Crop Composition Database (ILSI 2007), samt OECDs (2002) konsensusdokument for mais. I tillegg henviser søker til variasjonsområdet for de konvensjonelle referansesortene som var inkludert i feltforsøket vekstsesongen 2009.

#### Agronomiske karakterer

I henhold til søkers dokumentasjon ble registreringer av fenotypiske og agronomiske karakterer foretatt på henholdsvis fem lokaliteter i USA i 2007 og 12 lokaliteter i USA i 2008. Tilsvarende forsøksdesign og testmateriale som ble benyttet i feltforsøkene for komparative analyser av ernæringsmessige komponenter.

#### Statistiske analyser

I henhold til søkers dokumentasjon er det utført variansanalyse over og innen lokaliteter for de enkelte karakterer. For analyser over lokaliteter ble det benyttet følgende blandede variansanalysemodell;

$$Y_{ijk} = U + T_i + L_j + B(L)_{jk} + LT_{ij} + e_{ijk}$$

der  $Y_{ijk}$  er observert respons for genotype  $i$  på lokalitet  $j$  og blokk  $k$ . Genotype ( $T_i$ ) ble betraktet som fast effekt, mens effekter av sted ( $L_j$ ), blokk innen lokalitet ( $B(L)_{jk}$ ) og samspill lokalitet x genotype ( $LT_{ij}$ ) ble betraktet som tilfeldige effekter. For hver parameter ble det benyttet en F-test for å vurdere effekter av genotype (signifikansnivå 0,05).

I tillegg er det kjørt deskriptiv statistikk (gj.snitt, standardfeil, min.- og maks.verdi) for henholdsvis testlinje og umodifisert kontroll. Det er ikke foretatt statistiske sammenligninger mellom testlinje og referansesorter (data fra 2009), men det er beregnet referanseområde for hver karakter basert på minimums- og maksimumsverdier for de kommersielle sortene.

I Nordisk ministerråds rapport "Safety Assessment of Novel Food Plants: Chemical Analytical Approaches to the Determination of Substantial Equivalence" (TemaNord 1998), anbefales det at tilstrekkelig antall prøver må analyseres for å få adekvat sensitivitet for statistisk analyse. Spredning i enkeltparametre skal være sammenlignbare for genetisk modifisert plante og umodifisert plante. I rapporten er det anbefalt at spredningen i enkeltverdier bør ligge innenfor  $\pm 20\%$ . Faggruppe for genmodifiserte organismer benytter denne anbefalingen som grunnlag for vurdering av forsøksresultatene.

## 3.2 Analyser av ernæringsmessige komponenter

OECDs konsensusdokument for mais er fulgt med hensyn på valg av analyseparametre for maishybriden 5307 og kontrollhybrid.

### Analyser av fôrfraksjon

Fôrfraksjonen er analysert for innhold av aske, fett, protein, vann, ADF (acid detergent fibre), NDF (neutral detergent fibre), fosfor, kalsium og karbohydrater.

Det ble ikke funnet signifikante forskjeller mellom testlinje og umodifisert kontroll for noen av de analyserte komponentene i fôrfraksjon (tabell 3). Verdiene ligger innenfor toleranseintervallene for de åtte referansesortene som inngikk i studien for 2009 og innenfor typiske verdier for andre maissorter som er rapportert i ILSI Crop Composition Database (ILSI 2007).

**Tabell 3. Resultater fra variansanalyse over steder av fôrfraksjon fra umodifisert kontroll og testlinjen 5307. Fra feltforsøk i USA 2008 og 2009.**

Komponenter analysert	2008 Gjennomsnitt ± S.E.M. [Variasjonsområde]		2009 Gjennomsnitt ± S.E.M. [Variasjonsområde]	
	Nær-isogen kontroll	5307	Nær-isogen kontroll	5307
Vann (% råvekt) ( $p^1=0,126$ ), ( $p^2=0,149$ )	72,3 ± 1,49 [66,7–78,0]	73,0 ± 1,49 [66,5–79,5]	72,70 ± 0,854 [66,8–77,2]	73,28 ± 0,854 [69,4–77,5]
Aske ( $p^1=0,076$ ), ( $p^2=0,234$ )	4,34 ± 0,295 [3,43–6,18]	4,12 ± 0,295 [2,89–5,35]	4,56 ± 0,27 [3,21 – 6,89]	4,39 ± 0,27 [2,42 – 6,17]
Fett ( $p^1=0,893$ ), ( $p^2=0,060$ )	1,89 ± 0,118 [0,83 – 2,63]	1,90 ± 0,118 [0,893 – 2,81]	2,46 ± 0,105 [1,21 – 3,44]	2,26 ± 0,105 [1,37 – 3,45]
Protein ( $p^1=0,525$ ), ( $p^2=0,298$ )	7,57 ± 0,449 [6,27–10,0]	7,72 ± 0,449 [5,91–10,3]	7,32 ± 0,461 [4,22–10,7]	7,56 ± 0,461 [5,62–10,4]
Karbohydrater ( $p^1=0,895$ ), ( $p^2=0,736$ )	86,3 ± 0,64 [82,3 - 89,0]	86,2 ± 0,64 [82,9 - 88,9]	85,68 ± 0,584 [81,6 - 90,0]	85,79 ± 0,584 [82,0 - 88,9]
ADF ( $p^1=0,696$ ), ( $p^2=0,572$ )	28,6 ± 1,33 [19,0 – 41,5]	29,1 ± 1,33 [22,3 – 40,1]	25,52 ± 0,642 [17,9 - 33,3]	24,99 ± 0,8 [19,2 – 31,5]
NDF ( $p^1=0,785$ ), ( $p^2=0,511$ )	45,4 ± 1,91 [32,3 – 57,4]	44,9 ± 1,91 [35,5 - 56,1]	41,33 ± 0,886 [30,5 - 51,1]	40,59 ± 0,886 [36,4 - 58,4]
Kalsium mg/100 g tv ( $p^1=0,886$ ), ( $p^2=0,883$ )	235,4 ± 20,93 [166 - 335]	234,6 ± 20,93 [145 - 347]	224,4 ± 24,29 [120 - 371]	223,2 ± 24,29 [106 - 403]
Fosfor mg/100 g tv ( $p^1=0,491$ ), ( $p^2=0,726$ )	195,3 ± 16,39 [139 - 289]	109,6 ± 16,39 [142 - 287]	170 ± 9,44 [114 - 233]	171,7 ± 9,44 [110 - 233]

$P^1$ -verdi for 2008-forsøket,  $p^2$ -verdi for 2009-forsøket

### Analysen av maiskorn

I maiskorn ble følgende parametere analysert; protein, fett, aske, vann, karbohydrater, ADF, NDF, aminosyrer, fettsyrer (arakin (20:0)-, behen (22:0)-, gadolin (20:1)-, linol (18:2)-, linolen (18:3)-, olje (18:1)-, palmitin (16:0)-, palimitol (16:1)- og stearinsyre (18:0)), fosfor, jern, kalium, kalsium, kobber, magnesium, mangan, natrium, selen, sink, vitaminene B1, B2, B3, B6, E, folinsyre og  $\beta$ -karoten, de sekundære metabolittene furfural, ferulsyre og p-kumarinsyre, og anti-næringsstoffene fytinsyre, inositol, trypsinhemmer og raffinose. Analysene ble utført under god laboratoriepraksis (GLP).

#### Hovedkomponenter

Følgende hovedkomponenter i maiskorn er analysert: vann, protein, fett, aske, ADF, NDF, råfiber (TDF), stivelse og karbohydrater (tabell 4). Analysene ble utførte under god laboratoriepraksis (GLP). Med unntak for fett viser kombinerte analyser over lokaliteter ingen statistisk signifikante forskjeller

mellom den transgene linjen og kontroll for de analyserte komponentene. Verdiene for samtlige komponenter ligger innenfor toleranseintervallene for de åtte referansesortene som inngikk i studien i 2009 og innenfor typiske verdier som er rapportert i ILSI Crop Composition Database (ILSI 2007) og OECDs konsensusdokument for mais (2002).

**Tabell 4. Resultater fra analyser over steder av hovedkomponenter i maisfrø fra umodifisert kontroll og testlinjen 5307. Fra feltforsøk i USA 2008 og 2009.**

Komponenter analysert	2008 Gjennomsnitt ± S.E.M. [Variasjonsområde]		2009 Gjennomsnitt ± S.E.M. [Variasjonsområde]	
	Nær-isogen kontroll	5307	Nær-isogen kontroll	5307
Vann (% råvekt)	10,18 [9,21–12,2]	10,13 [9,54–11,4]	13,60 [10,4–17,7]	13,92 [10,6–18,8]
Aske (p <sup>1</sup> =0,138), (p <sup>2</sup> =0,072)	1,40 ± 0,044 [1,09–1,67]	1,46 ± 0,044 [1,22–1,60]	1,43 ± 0,029 [1,14 – 1,65]	1,36 ± 0,029 [1,03 – 1,63]
Fett (p <sup>1</sup> =0,053), (p <sup>2</sup> =0,006)	4,72 ± 0,067 [4,43 – 5,09]	4,54 ± 0,067 [3,85 – 4,93]	4,58 ± 0,089 [3,67 – 5,27]	4,26 ± 0,089 [3,45 – 4,82]
Protein (p <sup>1</sup> =0,737), (p <sup>2</sup> = 0,590)	10,92 ± 0,375 [9,20–13,0]	10,86 ± 0,375 [9,12–12,6]	10,59 ± 0,411 [7,49–13,0]	10,68 ± 0,411 [7,83–12,2]
Karbohydrater (p <sup>1</sup> =0,515); (p <sup>2</sup> =0,154)	83,0 ± 0,44 [80,7 - 84,7]	83,1 ± 0,44 [81,0 - 85,3]	83,41 ± 0,416 [81,1 – 86,8]	83,71 ± 0,416 [81,9 – 86,3]
ADF (p <sup>1</sup> =0,281), (p <sup>2</sup> =0,464)	2,85 ± 0,069 [2,47 – 3,48]	2,74 ± 0,069 [2,23 – 3,34]	2,96 ± 0,105 [2,22 - 4,50]	3,07 ± 0,105 [1,92 – 4,06]
NDF (p <sup>1</sup> =0,930), (p <sup>2</sup> =0,142)	8,83 ± 0,128 [7,79 – 10,2]	8,85 ± 0,128 [7,68 – 9,52]	9,47 ± 0,209 [7,58 - 11,1]	9,82 ± 0,209 [8,15 - 11,4]
TDF (p <sup>1</sup> =0,700), (p <sup>2</sup> =0,401)	11,7 ± 0,19 [10,6 – 13,5]	11,8 ± 0,19 [10,8 – 13,4]	13,58 ± 0,324 [11,3 – 16,3]	13,82 ± 0,324 [11,8 – 15,8]
Stivelse (p <sup>1</sup> =0,589), (p <sup>2</sup> =0,409)	70,3 ± 1,21 [63,1 – 77,3]	69,4 ± 1,21 [62,0 – 73,7]	70,02 ± 0,825 [60,9 – 80,4]	69,39 ± 0,825 [62,8 – 78,4]

<sup>1</sup>p-verdi for 2008-forsøket, <sup>2</sup>p-verdi for 2009-forsøket

#### Fettsyresammensetning

Fettsyresammensetningen i Event 5307 er målt i henhold til OECDs konsensusdokument for mais. Det ble analysert for innhold av 9 ulike fettsyrer. Resultatene av variansanalysen viser signifikante forskjeller mellom transgen mais og kontroll for fettsyrene gadolen (20:1)-, linolen (18:3)-, palmitolen (16:1)- og stearinsyre (18:0) i både 2008 og 2009 (tabell 5). Forskjellene som er målt er mindre enn 20 %. Verdiene for alle komponentene ligger innenfor toleranseintervallene for de åtte referansesortene som inngikk i studien i 2009 og innenfor typiske verdier som er rapportert i ILSI Crop Composition Database (ILSI 2007) og OECDs konsensusdokument for mais (2002).

**Tabell 5. Resultater fra analyser over steder av fettsyrer i maisfrø fra umodifisert kontroll og testlinjen 5307. Fra feltforsøk i USA 2008 og 2009.**

Komponenter analysert (% av totalt fettsyreinnhold)	2008 Gjennomsnitt ± S.E.M. [Variasjonsområde]		2009 Gjennomsnitt ± S.E.M. [Variasjonsområde]	
	Nær-isogen kontroll	5307	Nær-isogen kontroll	5307
16:0 Palmitinsyre (p <sup>1</sup> <0,001), (p <sup>2</sup> =0,007)	15,2 ± 0,07 [14,6–15,9]	15,7 ± 0,07 [15,1–16,1]	14,90 ± 0,103 [13,7–15,6]	15,23 ± 0,103 [14,4–16,2]
16:1 Palmitolsyre	<LOQ <sup>3</sup> -0,450	<LOQ-0,137	<LOQ-0,131	<LOQ-0,127
18:0 Stearinsyre (p <sup>1</sup> =0,038), (p <sup>2</sup> =0,007)	1,81 ± 0,059 [1,54 – 2,17]	1,74 ± 0,059 [1,50 – 2,04]	1,61 ± 0,023 [1,46 – 1,85]	1,65 ± 0,023 [1,40 – 1,71]
18:1 Oljesyre (p <sup>1</sup> =0,108), (p <sup>2</sup> =0,204)	24,9 ± 0,54 [22,6–26,4]	24,5 ± 0,54 [22,0–27,0]	23,41 ± 0,204 [21,7–24,8]	23,20 ± 0,204 [21,8–24,9]
18:2 Linolsyre (p <sup>1</sup> =0,599), (p <sup>2</sup> =0,464)	55,7 ± 0,60 [53,8 – 58,4]	55,6 ± 0,60 [53,2 – 58,1]	57,69 ± 0,298 [55,9 – 59,8]	57,57 ± 0,298 [55,9 – 59,1]
18:3 Linolensyre (p <sup>1</sup> <0,001), (p <sup>2</sup> <0,001)	1,50 ± 0,017 [1,40 – 1,57]	1,60 ± 0,017 [1,48 – 1,71]	1,55 ± 0,013 [1,45 – 1,65]	1,64 ± 0,013 [1,53 – 1,75]
20:0 Arkinsyre (p <sup>1</sup> =0,186), (p <sup>2</sup> =0,018)	0,387 ± 0,0098 [0,361 – 0,437]	0,392 ± 0,0098 [0,353 – 0,453]	0,369 ± 0,0049 [0,335 – 0,426]	0,363 ± 0,0049 [0,336 – 0,391]
20:1 Gadolinsyre (p <sup>1</sup> <0,001), (p <sup>2</sup> =0,016)	0,242 ± 0,0029 [0,232 – 0,261]	0,250 ± 0,0029 [0,238 – 0,265]	0,243 ± 0,0024 [0,225 – 0,262]	0,249 ± 0,0024 [0,238 – 0,267]
22:0 Behensyre (p <sup>1</sup> =0,243), (p <sup>2</sup> =0,204)	0,213 ± 0,0056 [0,194 – 0,247]	0,220 ± 0,0056 [0,186 – 0,252]	0,160 ± 0,0032 [0,119 – 0,191]	0,165 ± 0,0032 [0,133 – 0,193]

p<sup>1</sup>-verdi for 2008-forsøket, <sup>2</sup>p-verdi for 2009-forsøket

<sup>3</sup>LOQ = lavere enn kvantifiseringsgrensen

### Aminosyrer

I henhold til søkers dokumentasjon er det analysert for totalt 18 essensielle og ikke-essensielle aminosyrer. Valget av analyseparametere er gjort i henhold til OECDs konsensusdokument. Resultatene av variansanalysen viser ingen signifikante forskjeller mellom test- og kontrollinje med hensyn aminosyrer (se tabell 6). Verdiene for alle komponentene ligger innenfor toleranseintervallene for de åtte referansesortene som inngikk i studien fra 2009 og innenfor typiske verdier som er rapportert i ILSI Crop Composition Database (ILSI 2007) og OECDs konsensusdokument for mais (2002).

**Tabell 6. Resultater fra analyser over steder av aminosyrer i maisfrø fra umodifisert kontroll og testlinjen 5307. Fra feltforsøk i USA 2008 og 2009.**

Komponenter analysert (% av tørrvekt)	2008 Gjennomsnitt ± S.E.M. [Variasjonsområde]		2009 Gjennomsnitt ± S.E.M. [Variasjonsområde]	
	Nær-isogen kontroll	5307	Nær-isogen kontroll	5307
Alanin ( $p^1=0,846$ ), ( $p^2=0,564$ )	8,24 ± 0,345 [7,06–10,0]	8,21 ± 0,345 [6,64–9,97]	8,24 ± 0,357 [5,64–10,5]	8,35 ± 0,357 [5,97–10,0]
Arginin ( $p^1=0,892$ ), ( $p^2=0,915$ )	4,82 ± 0,144 [4,20–5,32]	4,81 ± 0,144 [3,72–5,56]	4,98 ± 0,117 [4,13–5,74]	4,99 ± 0,117 [4,12–5,51]
Asperginsyre ( $p^1=0,625$ ), ( $p^2=0,283$ )	6,88 ± 0,236 [6,00–8,20]	6,93 ± 0,236 [5,82–8,15]	7,32 ± 0,230 [5,65–8,95]	7,45 ± 0,230 [5,79–8,71]
Cystin ( $p=0,284$ ), ( $p^2=0,233$ )	2,36 ± 0,043 [2,14–2,59]	2,33 ± 0,043 [2,07–2,50]	2,13 ± 0,057 [1,60–2,48]	2,11 ± 0,057 [1,64–2,34]
Glutaminsyre ( $p^1=0,715$ ), ( $p^2=0,666$ )	20,6 ± 0,90 [17,4–25,3]	20,4 ± 0,90 [16,4–24,9]	20,3 ± 0,91 [13,0–25,9]	20,5 ± 0,91 [14,3–24,6]
Glycin ( $p^1=0,761$ ), ( $p^2=0,338$ )	3,97 ± 0,087 [3,61–4,35]	3,95 ± 0,087 [3,52–4,39]	4,03 ± 0,096 [3,42–4,68]	4,07 ± 0,096 [3,31–4,49]
Histidin ( $p^1=0,684$ ), ( $p^2=0,528$ )	3,01 ± 0,088 [2,57–3,43]	2,99 ± 0,088 [2,57–3,44]	2,91 ± 0,093 [2,16–3,54]	2,94 ± 0,093 [2,23–3,28]
Isoleucin ( $p^1=0,947$ ), ( $p^2=0,363$ )	3,91 ± 0,153 [3,23–4,71]	3,92 ± 0,153 [3,19–4,77]	4,03 ± 0,165 [2,72–5,13]	4,10 ± 0,165 [3,00–4,83]
Leucin ( $p^1=0,789$ ), ( $p^2=0,506$ )	13,8 ± 0,66 [11,5–17,3]	13,8 ± 0,66 [10,8–17,1]	13,5 ± 0,69 [8,38–17,9]	13,8 ± 0,69 [9,32–16,9]
Lysin ( $p^1=0,902$ ), ( $p^2=0,494$ )	3,09 ± 0,059 [2,74–3,38]	3,10 ± 0,059 [2,76–3,36]	2,94 ± 0,059 [2,38–3,36]	2,91 ± 0,059 [2,44–3,36]
Metionin ( $p^1=0,102$ ), ( $p^2=0,374$ )	2,36 ± 0,049 [2,08–2,56]	2,29 ± 0,049 [1,97–2,51]	2,06 ± 0,085 [1,47–2,44]	2,03 ± 0,085 [1,38–2,37]
Fenylalanin ( $p^1=0,883$ ), ( $p^2=0,511$ )	5,52 ± 0,239 [4,73–6,70]	5,50 ± 0,239 [4,34–6,68]	5,56 ± 0,249 [3,71–7,16]	5,65 ± 0,249 [3,99–6,67]
Prolin ( $p^1=0,973$ ), ( $p^2=0,768$ )	9,24 ± 0,375 [7,84–10,9]	9,23 ± 0,375 [7,55–11,0]	9,79 ± 0,433 [6,17–11,8]	9,85 ± 0,433 [6,52–11,8]

Serin (p <sup>1</sup> =0,736), (p <sup>2</sup> =0,701)	5,17 ± 0,203 [4,44–6,28]	5,14 ± 0,203 [4,10–6,10]	4,79 ± 0,185 [3,36–6,08]	4,83 ± 0,185 [3,66–5,86]
Treonin (p <sup>1</sup> =0,908), (p <sup>2</sup> =0,423)	3,79 ± 0,236 [3,36–4,47]	3,80 ± 0,236 [3,19–4,39]	3,83 ± 0,129 [2,90–4,68]	3,88 ± 0,129 [3,04–4,40]
Tryptofan (p <sup>1</sup> =0,722), (p <sup>2</sup> =0,237)	0,557 ± 0,0298 [0,380–0,700]	0,570 ± 0,0298 [0,381–0,704]	0,861 ± 0,0196 [0,726–1,000]	0,881 ± 0,196 [0,747–1,030]
Tyrosin (p <sup>1</sup> =0,711), (p <sup>2</sup> =0,655)	3,26 ± 0,153 [1,67–3,98]	3,18 ± 0,153 [1,57–4,18]	4,43 ± 0,164 [3,02–5,32]	4,39 ± 0,164 [3,38–5,23]
Valin (p <sup>1</sup> =0,877), (p <sup>2</sup> =0,440)	5,13 ± 0,179 [4,28–6,01]	5,12 ± 0,179 [4,33–6,08]	5,21 ± 0,176 [3,90–6,35]	5,28 ± 0,176 [4,10–6,01]

<sup>1</sup>p-verdi for 2008-forsøket, <sup>2</sup>p-verdi for 2009-forsøket

### Vitaminer

I henhold til OECDs konsensusdokument for mais bør følgende vitaminer analyseres: A, B1, B2, B6, C, E, folat (B9) og niacin. I følge dokumentasjonen fra søker er ikke innholdet av vitamin C målt, mens vitamin A er målt som β-karoten. Det er funnet statistisk signifikante forskjeller mellom test- og kontrollinje med hensyn på innhold av vitamin A, B6 og folat i feltforsøket i 2008 (tabell 7), og vitamin A, B2 og vitamin E i 2009. Verdiene for alle komponentene ligger innenfor toleranseintervallene for de åtte referansesortene som inngikk i studien fra 2009, og innenfor typiske verdier som er rapportert i ILSI Crop Composition Database (ILSI 2007) og OECDs konsensusdokument for mais (2002). Sukkermais er ansett som en god C-vitaminkilde (Warman & Havard 1998).



**Tabell 7. Resultater fra analyser over steder av vitaminer i maisfrø fra umodifisert kontroll og testlinjen 5307. Fra feltforsøk i USA 2008 og 2009.**

Komponenter analysert (mg/100 g tørrvekt)	2008 Gjennomsnitt ± S.E.M. [Variasjonsområde]		2009 Gjennomsnitt ± S.E.M. [Variasjonsområde]	
	Nær-isogen kontroll	5307	Nær-isogen kontroll	5307
Vitamin A (β-karoten) (p <sup>1</sup> <0,001), (p <sup>2</sup> <0,001)	0,176 ± 0,0049 [0,155–0,216]	0,155 ± 0,0049 [0,133–0,185]	0,168 ± 0,0074 [0,110–0,222]	0,151 ± 0,0074 [0,099–0,198]
Vitamin B1 (p <sup>1</sup> =0,146), (p <sup>2</sup> =0,673)	0,458 ± 0,0126 [0,408–0,518]	0,449 ± 0,0126 [0,399–0,511]	0,437 ± 0,0084 [0,342–0,502]	0,432 ± 0,0084 [0,339–0,495]
Vitamin B2 (p <sup>1</sup> =0,941), (p <sup>2</sup> =0,004)	0,198 ± 0,0096 [0,152–0,318]	0,198 ± 0,0096 [0,156–0,264]	0,208 ± 0,0066 [0,123–0,299]	0,232 ± 0,0066 [0,174–0,310]
Vitamin B6 (p <sup>1</sup> =0,005), (p <sup>2</sup> =0,351)	0,737 ± 0,0167 [0,621–0,815]	0,692 ± 0,0167 [0,587–0,769]	0,569 ± 0,0131 [0,479–0,705]	0,558 ± 0,0131 [0,464–0,682]
Vitamin E (mg/g tv) (p=0,074), (p <sup>2</sup> =0,004)	0,0090 ± 0,00055 [0,00607–	0,0093 ± 0,00055 [0,00719–0,0111]	0,0080 ± 0,000021 [0,0068–0,0123]	0,0085 ± 0,00021 [0,0072–0,0114]
Folinsyre (p <sup>1</sup> =0,031), (p <sup>2</sup> =0,119)	0,0382 ± 0,00199 [0,0289–0,0463]	0,0397 ± 0,00199 [0,0305–0,0460]	0,0435 ± 0,00233 [0,0259–0,0665]	0,0411 ± 0,00233 [0,0284–0,0519]
Niacin (p <sup>1</sup> =0,674), (p <sup>2</sup> =0,145)	3,18 ± 0,104 [2,51–3,70]	3,13 ± 0,104 [2,53–4,11]	2,76 ± 0,123 [2,09–3,92]	2,64 ± 0,123 [2,02–3,66]

<sup>1</sup>p-verdi for 2008-forsøket, <sup>2</sup>p-verdi for 2009-forsøket

#### Mineraler

Innholdet av mineraler er målt i henhold til OECDs konsensusdokument for mais. Innholdet av natrium og selen var lavere enn påvisningsgrensen både i umodifisert og modifisert mais. Når det gjelder kobber ble det funnet signifikante forskjeller mellom testlinje og kontroll vekstsesongen 2009 (tabell 8), men ikke i 2008. Forskjellene som er påvist er imidlertid lavere enn 20 %, og verdiene for alle komponentene ligger innenfor toleranseintervallene for de åtte referansesortene som inngikk i studien fra 2009 og innenfor typiske verdier som er rapportert i ILSI Crop Composition Database (ILSI 2007) og OECDs konsensusdokument for mais (2002).

**Tabell 8. Resultater fra analyser over steder av mineraler i maisfrø fra umodifisert kontroll og testlinjen 5307. Fra feltforsøk i USA 2008 og 2009.**

Komponenter analysert (mg/kg tørrvekt)	2008 Gjennomsnitt ± S.E.M. [Variasjonsområde]		2009 Gjennomsnitt ± S.E.M. [Variasjonsområde]	
	Nær-isogen kontroll	5307	Nær-isogen kontroll	5307
Fosfat (p <sup>1</sup> =0,110), (p <sup>2</sup> =0,828)	3307 ± 94,7 [2650–3600]	3228 ± 94,7 [2620–3520]	3224 ± 83,5 [2530–3500]	3214 ± 83,5 [2290–3610]
Jern (p <sup>1</sup> =0,308), (p <sup>2</sup> =0,125)	23,3 ± 0,85 [20,3–28,1]	23,7 ± 0,85 [21,2–28,0]	22,6 ± 0,71 [16,9–27,0]	23,2 ± 0,71 [18,0–29,3]
Kalium (p <sup>1</sup> =0,707), (p <sup>2</sup> =0,065)	3776 ± 81,0 [3240–4150]	3758 ± 81,0 [3400–4010]	3652 ± 43,9 [3220–4120]	3741 ± 43,9 [3330–4120]
Kalsium (p <sup>1</sup> =0,891), (p <sup>2</sup> =0,934)	44,0 ± 1,28 [40,3–50,1]	43,9 ± 1,28 [38,6–49,3]	46,6 ± 2,12 [35,0–60,0]	46,5 ± 2,12 [34,8–62,7]
Kobber (p <sup>1</sup> =0,058), (p <sup>2</sup> =0,017)	1,89 ± 0,253 [1,02–4,36]	1,52 ± 0,253 [0,89–4,20]	1,43 ± 0,062 [1,02–2,34]	1,25 ± 0,062 [0,89–1,70]
Magnesium (p <sup>1</sup> =0,401), (p <sup>2</sup> =0,526)	1336 ± 21,2 [1220–1450]	1323 ± 21,2 [1150–1430]	1370 ± 27,3 [1210–1560]	1380 ± 27,3 [1100–1520]
Mangan (p <sup>1</sup> =0,131), (p <sup>2</sup> =0,251)	5,43 ± 0,249 [4,43–6,38]	5,65 ± 0,249 [4,69–6,38]	5,46 ± 0,251 [3,65–6,83]	5,58 ± 0,251 [3,76–7,02]
Sink (p <sup>1</sup> =0,355), (p <sup>2</sup> =0,057)	23,4 ± 0,78 [20,5–27,9]	23,0 ± 0,78 [19,5–26,9]	25,7 ± 0,70 [20,3 – 29,0]	24,8 ± 0,70 [20,1 – 30,8]

<sup>1</sup>p-verdi for 2008-forsøket, <sup>2</sup>p-verdi for 2009-forsøket

#### *Sekundære metabolitter og antiernæringsstoffer*

Sekundære metabolitter og antiernæringskomponenter er målt i henhold til OECDs konsensudokument for mais. Det ble ikke påvist statistisk signifikante forskjeller mellom testlinje og kontroll (tabell 9). Mengdene av furfural var lavere enn påvisningsgrensen. Verdiene for alle komponentene ligger innenfor toleranseintervallene for de åtte referansesortene som inngikk i studien fra 2009 og innenfor typiske verdier som er rapportert i ILSI Crop Composition Database (ILSI 2007) og OECDs konsensudokument for mais (2002).

**Tabell 9. Resultater fra analyser over steder av sekundære metabolitter og antinæringsstoffer i maisfrø fra umodifisert kontroll og testlinjen 5307. Fra feltforsøk i USA 2008 og 2009.**

Komponenter analysert	2008 Gjennomsnitt ± S.E.M. [Variasjonsområde]		2009 Gjennomsnitt ± S.E.M. [Variasjonsområde]	
	Nær-isogen kontroll	5307	Nær-isogen kontroll	5307
Ferulsyre (mg/kg tv) (p <sup>1</sup> =0,691), (p <sup>2</sup> =0,701)	1889 ± 52,4 [1620–2090]	1906 ± 52,4 [1670–2190]	1947 ± 39,1 [1530–2150]	1958 ± 39,1 [1540–2200]
p-kumarsyre (mg/kg tv) (p <sup>1</sup> =0,926), (p <sup>2</sup> =0,110)	186 ± 9,1 [148–226]	186 ± 9,1 [153–229]	202 ± 10 [153–267]	194 ± 10 [141–254]
Fytinsyre (% tv) (p <sup>1</sup> =0,216), (p <sup>2</sup> =0,812)	0,942 ± 0,0261 [0,729–1,06]	0,910 ± 0,0261 [0,671–1,03]	0,917 ± 0,0262 [0,673–1,10]	0,922 ± 0,0262 [0,684–1,07]
Raffinose (% tv) (p <sup>1</sup> =0,066)	0,163 ± 0,0087 [0,119–0,188]	0,156 ± 0,0087 [0,115–0,199]	<LOQ-0,240	<LOQ-0,254
Inositol (mg/kg tv) (p <sup>1</sup> =0,951), (p <sup>2</sup> =0,256)	2504 ± 86,1 [1980–3060]	2510 ± 86,1 [2120–3160]	2841 ± 78,5 [2170–3440]	2725 ± 78,5 [1960–3550]
Furfural (mg/kg tv)	<LOQ <sup>3</sup>	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Trypsinhemmer (TIU/mgtv), (p <sup>1</sup> =0,393), (p <sup>2</sup> =0,231)	3,46 ± 0,118 [2,22–3,94]	3,34 ± 0,118 [2,39–4,42]	4,23 ± 0,167 [2,75–5,95]	3,93 ± 0,167 [2,20–6,24]

<sup>1</sup>p-verdi for 2008-forsøket, <sup>2</sup>p-verdi for 2009-forsøket

<sup>3</sup>LOQ = lavere enn kvantifiseringsgrensen

### 3.3 Agronomiske karakterer

I henhold til søkers dokumentasjon ble det foretatt registreringer av henholdsvis 17 og 20 agronomiske karakterer og to karakterer knyttet til sjukdomsresistens vekstsesongen 2007 og 2008. Antall observerte karakterer varierte imidlertid mellom forsøkssteder begge forsøksårene. Dette relateres både til begrensninger i ressurser og at enkelte variable kun var mulig å registrere på noen av lokalitetene. Se tabell 1 og 2 i vedlegg for oversikt og beskrivelse av registrerte parametre.

Med unntak av vanninnhold, tidlighet (varmesum til 50 % pollenslipp) og plantehøyde, viste kombinerte analyser over lokaliteter ingen signifikante forskjeller mellom testlinjen 5307 og umodifisert kontroll ( $p > 0,05$ ) i 2007 (tabell 10). Tilsvarende resultater fra vekstsesongen 2008 viste, med unntak av frøavling, ingen signifikante forskjeller mellom 5307 og kontrollinjen (tabell 11). Variansanalyser innen steder (2008) viser signifikante forskjeller i avling mellom linjene på ett av forsøksstedene (data ikke vist).

**Tabell 10. Resultater fra variansanalyse over steder for agronomiske karakterer for testlinje 5307 og umodifisert, nærisonogen kontroll. Fra feltforsøk i USA vekstsesongen 2007.**

Karakterer	N	Testlinje 5307	Nærisonogen kontroll	SE	Signifikans <sup>1</sup>
# spirte planter	12	59	58	0,57	NS
Plantevitalitet vår	6	1,8	1,8	0,23	NS
Avstand fra plantebasis til kolbefeste	14	94	94	1,27	NS
% vanninnh.	14	17,9	16,9	0,21	*
Plantepop. ved høsting	14	27927	28524	1022,25	NS
Varmesum til 50 % blomstring	12	1251	1265	7,92	NS
Varmesum til 50 % pollenslipp	12	1230	1247	0,89	*
Plantehøyde	14	216	210	1,42	*
Testvekt	14	53,8	53,4	0,24	NS
Frøavling	14	149,5	154	2,52	NS

<sup>1</sup> \*  $p < 0,05$

**Tabell 11. Resultater fra variansanalyse over steder for agronomiske karakterer for testlinje 5307 og umodifisert, nær-isogen kontroll. Fra feltforsøk i USA vekstsesongen 2008.**

Karakterer	Testlinje 5307			Nær-isogen kontroll			Signifikans <sup>1</sup>
	N	Gjennomsnitt	SE	N	Gjennomsnitt	SE	
# spirte planter	44	62	0,71	43	61	0,73	NS
Plantevitalitet vår	32	2,5	0,17	31	2,5	0,18	NS
Avstand fra plantebasis til kolbefeste	40	113	1,81	39	117	1,87	NS
% vanninnh.	48	20,8	0,14	47	20,3	0,14	NS
Plantepop. ved høsting	48	29040	192,29	47	29092	197,56	NS
Varmesum til 50 % blomstring	29	1327	3,24	28	1325	3,34	NS
Varmesum til 50 % pollenslipp	29	1330	2,28	28	1325	2,35	NS
Plantehøyde	40	247	2,25	39	239	2,32	NS
Testvekt	48	57,0	0,12	47	57,0	0,12	NS
Frøavling	48	151,6	2,34	47	138,6	2,40	*

<sup>1</sup> \* p<0,05

### 3.4 Vurdering basert på tilgjengelig datagrunnlag

Analyser av ernæringsmessige komponenter er i hovedsak utført i tråd med OECDs konsensusdokument for mais (OECD 2002). Det er påvist signifikante forskjeller mellom testlinjen 5307 og umodifisert kontroll i enkeltparametere. Verdiene for de analyserte komponentene ligger imidlertid innenfor typiske verdier for andre maissorter som er rapportert i litteraturen, samt innenfor toleranseintervallene for de åtte umodifiserte referansesortene som er inkludert i søkers dokumentasjon for 2009.

Faggruppen påpeker at søker ikke har foretatt analyser av vitamin C. Det understrekes at konsensusdokumentet i størst mulig grad skal følges når det legges fram dokumentasjon på nivåene av næringsstoffer, antinæringsstoffer og metabolitter. Faggruppen vektlegger imidlertid at hoveddelen av maisforbruket i Norge er som dyrefôr og at mais til human konsum utgjør mindre enn 1 % av energiinntaket både for voksne og barn under ett år. Daglig inntak av suktermais vil bidra med 0,5 % av daglig anbefaling for vitamin C ved inntak lik medianen (data fra Den Norske mor barn studien). Ved maisinntak på 17,5 g/dag (97,5 % persentilen) vil ca 2,6 % av daglig anbefaling for vitamin C

dekkes. Når det gjelder dyrefôr ansees det naturlige vitamininnholdet i mais å være uten betydning da all mais som benyttes som fôr vitaminberikes i henhold til Mattilsynets anbefalinger. Tilsvarende angis krav til ernæringsmessig sammensetning av kornbasert barnemat i vedlegg 1 i Forskrift om bearbeidet kornbasert barnemat og annen barnemat til spedbarn og småbarn (FOR 2002-10-18 nr 1185). Faggruppen vurderer derfor at et eventuelt avvikende nivå av vitamin C i 5307 har liten ernæringsmessig betydning i Norge.

Med unntak av insektsresistens viser feltforsøk over to vekstsesonger i USA små eller ingen signifikante forskjeller mellom den transgene maisen 5307 og umodifisert, nær-isogen kontrollinje med hensyn på agronomiske karakterer.

## 4 Dokumentasjon av toksisitet og allergenisitet

### 4.1 Toksisitet

#### 4.1.1 Temperaturstabilitetstesting av eCry3.1Ab og PMI, samt bioassay-testing av eCry3.1Ab.

Syngenta har foretatt temperaturtesting av *E. coli*-produsert PMI-enzym og eCry3.1Ab-toksin. Enzymet og toksinet ble inkubert i 30 min ved temperaturene 25, 37, 65 og 95 °C. Enzymaktiviteten til PMI-enzymet var stabilt fra 4 til 35 °C. Inkubering av enzymet ved temperaturene 65 og 95 °C førte til fullstendig tap av enzymaktiviteten.

eCry3.1Ab-proteinet ble vist å være toksisk overfor larver av *Leptinotarsa decemlineata* ("Colorado potato beetle") etter inkubasjon ved 4, 25, 37 og 65 °C, men inaktivt etter inkubasjon ved 95 °C. Mengde eCry3.1Ab-toksin som ble benyttet ved 4, 25 - 37 °C var ca. 0,1953 – 25 µg/ml før, og ved 65 og 95 °C 0,7813-100 µg/ml (tabell 13). Det ble benyttet 48 larver ved hvert av forsøkene.

LC<sub>50</sub> (letal konsentrasjon) ble beregnet for hvert av forsøkene, og disse er gjengitt i tabell 12. Effekter av toksinet og temperatur ved de forskjellige toksinkonsentrasjonene er gjengitt i tabell 13.

**Tabell 12. Effekt av temperatur på insektisidaktivitet hos eCry3.1Ab fra rekombinant *E.coli* (testsubstans ECRY3.1AB-0208) i bioassay med larver av *Leptinotarsa decemlineata*:LC<sub>50</sub>-verdier og 95 % konfidensintervall.**

Temperatur [°C]	LC <sub>50</sub> [µg eCry3.1Ab/ml]	90 % konfidensintervall [µg eCry3.1Ab/ml]
4	0,918	0,419 – 1,617
25	1,802	1066 – 2,714
37	1,814	0,411 - 4,714
65	4,682	1,321-10,092
95	>100	Ikke estimert

**Tabell 13. Effekt av temperatur på insektisidaktivitet hos eCry3.1Ab fra rekombinant *E.coli* (testsubstans ECRY3.1AB-0208) i bioassay med larver av *Leptinotarsa decemlineata* (% mortalitet).**

Konsentrasjon [µg eCry3.1Ab/ml diett]	Mortalitet etter 144 timer [%]				
	4 °C	25 °C	37 °C	65 °C	95 °C
0,1953	43,8	33,3	27,1	Ikke testet	Ikke testet
0,3906	45,8	33,3	43,8	Ikke testet	Ikke testet
0,7813	52,1	37,5	50,0	38,3	10,4
1,5625	52,1	47,9	45,8	42,6	4,2
3,125	68,8	58,3	54,2	45,8	12,5
6,25	68,8	72,9	60,4	43,8	6,3
12,5	81,3	89,6	75,0	70,8	19,1
25	93,8	97,9	97,9	72,9	8,3
50	Ikke testet	Ikke testet	Ikke testet	95,8	8,30
100	Ikke testet	Ikke testet	Ikke testet	95,8	4,2
Vann	14,6				
Buffer	8,3				

#### 4.1.2 Akutt oral fôringsstudie på mus

Syngenta har utført akutt oral fôringsstudier på mus med renfremstilt PMI- og eCry3.1Ab-protein produsert av *E. coli*.

##### PMI

Forsøket med PMI er utført i henhold til god laboratoriepraksis (GLP) (OECD, EPA-FIFRA-40 CFR Part 160), i henhold til OECDs retningslinjer 420 Acute oral Toxicity, samt EPAs retningslinjer for testing av pesticider (EPA Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision F, Hazard Evaluation: Human and Domestic animals, Series 81-1, og OPPTS No. 870.1100). Tetssubstansen (PMI-0105) inneholder 89,5 % PMI-protein. PMI (89,5 % renhet) ble løst i deionisert vann til en konsentrasjon på 223,4 mg/ml, tilsvarende 200 mg/ml aktiv substans.. To grupper CrI:CD-1(ICR), 5 hann- og 5 hunnmus i hver gruppe ble eksponert for henholdsvis 0 mg PMI/kg kroppsvekt (kontrollmus) og 2000 mg PMI/kg kroppsvekt. Kontrollmus ble eksponert for deionisert vann (negativ kontroll). Alle dyrene ble observert hver 4.-5. time for kliniske tegn på forgiftning første dose-dag, og en gang daglig over en periode på 14 dager. Detaljerte kliniske undersøkelser ble utført ukentlig, og individuell vekt og fôrinntak ble registrert daglig.

Ved avslutning av forsøket ble alle dyrene avlivet, og bukhule, brysthule, samt en rekke organer og vev ble undersøkt makroskopisk. Lever, milt, hjerne, binyrer hjerte, nyrer og testikler eller ovarier ble veid. Det ble ikke påvist økt mortalitet eller toksiske effekter på dyrene som ble eksponert for PMI og deionisert vann. Det ble påvist signifikante økt mengde serum urea nitrogen og alkalisk fosfatase, samt lavere testisvekt hos hanner sammenlignet med kontrollgruppen. Hos hunner ble det påvist økt mengde alaninaminotransferase og økt vekt av binyrer sammenlignet med kontrollmus. Det ble konkludert med at siden det ikke var påvist histo-patologiske endringene hos dyrene og at



gruppemiddelet for disse endringene var innenfor WIL historiske kontrollområder, er en dose på 2000 mg PMI/kg kroppsvekt for mus ikke akutt toksisk.

#### eCry3.1Ab

Forsøket med eCry3.1Ab er utført i henhold til god laboratoriepraksis (GLP) (EPA-FIFRA-40 CFR Part 160) og i henhold til OECDs retningslinjer 420 Acute oral Toxicity samt EPAs retningslinjer for testing av pesticider (EPA Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision F, Hazard Evaluation: Human and Domestic animals, Series 81-1, og OPPTS No. 870.1100).

Testsubstansen (ECRY3.1AB-0208) inneholdt 89,6 % (vekt/vekt) eCry3.1Ab-protein. På grunn av lav vannløslighet ble testsubstansen løst i vandig karboksिमetylcellulose (0,5 % vekt/volum). To grupper Crl:CD-1(ICR) hann- og hunnmus, 5 i hver gruppe, ble eksponert for henholdsvis 0 og 2232 mg testsubstans/kg kroppsvekt, ekvivalent til 2000 mg rent eCry3.1Ab/kg kroppsvekt. Kontrollmus (0 mg testsubstans/kg kroppsvekt) ble eksponert for 10 ml vandig karboksımetylcellulose/kg kroppsvekt (negativ kontroll).

Alle dyrene ble observert hver 4-5 time for kliniske tegn på forgiftning 1. dose-dagen, og en gang daglig over en periode på 14 dager. Fôrinntak ble målt daglig. Detaljerte kliniske undersøkelser ble utført ukentlig, og individuell vekt og fôrinntak ble registrert daglig. Ved avslutning av forsøket ble alle dyrene avlivet, og bukhole, brysthule, samt en rekke organer og vev ble undersøkt makroskopisk. Det ble ikke påvist økt mortalitet eller toksiske effekter på dyrene som ble eksponert for eCry3.1Ab og vandig karboksımetylcellulose.

Med unntak av benmarg, testikler, bitestikler, øye, melkekjertler, skjoldbruskkjertel, ble vevene fiksert i formalin. Det ble utført histologiske undersøkelser av samtlige forsøksdyr ved mikroskopering på følgende organvev: cøcum (første del av tykktarmen), kolon, spiserør, magesekk, endetarm, tolvfingertarm (første del av tynntarm), jejunum (midtre del av tynntarm), ileum (siste del av tynntarm), Peyerpletter, lymfeknuter (cervical & mesenteric), milt, thymus (brissel).

Det ble utført makroskopisk undersøkelser av følgende vev: binyrer (2), aorta, ben og benmarg, lårben med ledd, brystben, utstryk av benmarg, hjerne: storhjerne (2 nivåer) og lillehjerne med medulla/pons, livmorhals, bitestikler (2), øye med synsnerve (2), galleblære, fordøyelseskanal (med: spiserør, mage, duodenum, jejunum, Peyerpletter, ileum, cøcum, tykktarm, rektum) hjerte, nyrer (2), lever, lunge (fixed by inflation with fixative), lymfeknuter (med mandibular og mesenterisk), ovarier (2) med eggledere, pankreas, perifer nerve (sciatic), hypofyse, prostata, spyttkjertler [mandibular (2)], testikler (2), skjelettmuskel (rectus femoris), hud med melkekjertel, ryggmarg (cervical, thoracic, lumbar), milt, thymus, tyroidkjertel [med parathyroidea, dersom den er tilstede (2)], brysthule, urinblære, livmor, vagina, samt store lesjoner.

Faggruppen og arbeidsgruppen påpeker at søker ikke har veid lever, milt, hjerne, hjerte, nyrer, testikler, bitestikler, ovarier og binyrer. Det er heller ikke undersøkt for blodkjemi og hematologi.

Det ble ikke påvist økt mortalitet eller toksiske effekter på dyrene som ble eksponert for eCry3.1Ab og karboksımetylcellulose. Det ble konkludert med at en dose på 2000 mg eCry3.1Ab/kg kroppsvekt for mus ikke er akutt toksisk.

#### **Kommentarer fra arbeidsgruppen:**

I PMI-studien har søker undersøkt en rekke parametre som blodanalyser og organvekter, mens og makro- og mikroskopiske undersøkelser er foretatt i studien av eCry3.1Ab. Det er påvist noen få forandringer i klinisk-kjemiske parametre og organvekter i PMI-studien, og enkelte vekt og histopatologiske endringer i eCry3.1Ab-studien. Søker konkluderer med at endringene ikke er toksikologisk relevante fordi de ligger innenfor variasjonen for historiske kontroller, eller antas å være tilfeldige funn. Faggruppen reagerer på at omfanget av analyser i PMI-studien er mye mer omfattende

(blodanalyser, organvekter) sammenlignet med eCry3.1Ab-studien. Faggruppen mener at disse undersøkelsene er unødvendig omfattende i akuttstudier, men burde ha vært fulgt opp med en 90-dagers studie av proteinene og maisproduktet.

Videre har søker feilaktig brukt data fra akuttstudiene til å fastsette en NOEL, og på grunnlag av denne samt et gjennomsnittlig inntak av mais hos mennesker beregnet en MOE (eksponeringsmargin) (tabell 12). Faggruppen har via innspill til EFSA's GMO Extranet påpekt at beregninger av MOE skal baseres på 90 dagers sub-kroniske studier.

**Tabell 14. Estimert inntak av eCry3.1Ab- og PMI protein fra konsum av 5307 i Europa (forutsatt at 100 % av maisinntaket i dietten er fra maislinjen 5307).**

Protein	Maksimum uttrykk i maiskorn (µg/g råvekt)	Inntak (mg/kg kroppsvekt/dag)	Akutt oral NOEL mg/kg kroppsvekt/dag	Margin of exposure
eCry3.1Ab	7,29	0,0182	2000	109890
PMI	2,38	0,0058	2000	344828

Kilde: Syngenta, søknad EFSA/GMO/DE/2011/95.

#### 4.1.3 Føringstudier på rotter er ikke utført

#### 4.1.4 Føringstudie på broiler

Søknaden inneholder dokumentasjon fra 49-dagers føringforsøk på broilere med 5307 (NP2171 x NP2460(5307)). Det ble foretatt føringstudier på hann- og hunnfugl, Ross x Ross. Forsøket ble satt opp med 6 grupper à 90 hann- og hunnfugler per gruppe, totalt 540 dyr. Studien ble utført i henhold til prinsippene for U.S. EPA FIFRA (40 CFR part 160) Good Laboratory Practice Standards. Dyrene ble føret med maismel fra 5307, ikke-transgen nær-isogen kontroll (NP2171 x NP2460) og den kommersielt tilgjengelige umodifiserte sorten NCSU 2007. Føret ble undersøkt for en rekke ernæringsmessige komponenter, mykotoksiner, mineraler, samt konsentrasjon av PMI- og eCry3.1Ab-protein. Startføret (dag 0-21) inneholdt ca. 54 % mais, vekstfasefôr (dag 22-35) inneholdt ca. 58 % mais, og føret i sluttføringsfasen (dag 36-42) inneholdt 62 % mais (likt for alle gruppene). Gjennomsnittlig eksponering av eCry3.1Ab-protein fra 5307 var 2,13 -, 0,34 og 0,38 µg/g fôr i henholdsvis startfôr, vekstfasefôr og sluttfôr.

Følgende parameter ble undersøkt: mortalitet, vektøkning, føreffektivitet, vekt av skrott, bryst, lår, vinger og abdominalt fett. Hos hunndyr ble det funnet statistisk signifikant lavere vekt (som % av total kroppsvekt) av lår og brystmuskel (*pectoralis minor*) sammenlignet med ikke-transgen nær-isogenetisk kontroll og den umodifiserte sorten NCSU 2007. Når det gjelder hanner ble det funnet signifikant lavere vekt (som % av total kroppsvekt) av lår sammenlignet nær-isogen kontroll. Det ble ikke påvist signifikante forskjeller mellom hanner føret med henholdsvis 5307 og kontrollmais NCSU 2007. Det ble heller ikke påvist andre statistisk signifikante endringer i de målte parametrene ved føring med mais fra 5307.

#### Arbeidsgruppens kommentarer til føringforsøket:

Det er påvist høyere kroppsvekt hos hanner som ble føret med mais 5307, og lavere vekt av lårmuskel hos hunner og hanner, sammenlignet med kontrollbroilere. Faggruppen har i sitt innspill til EFSA påpekt at en 90-dagers studie ville ha avdekket mulige toksiske effekter av den transgene maislinjen 5307.

## 4.2 Allergenisistet

Undersøkelser av allergent potensiale av er utført i henhold til anbefalinger fra Codex (2003) og FAO/WHO (2000, 2001). Sammenligning av et proteins aminosyresekvens med aminosyresekvensen til et kjent allergent protein er en nyttig indikator på allergent potensiale. Aminosyresekvensen til de fleste viktige allergener, deriblant matallergener, er kjent. De viktige IgE-bindingsepitopene, dvs. aminosyresekvenser på 8-12 aminosyrer (noen ganger færre) der IgE binder seg, er kartlagt for mange allergener. Eksakt konservering av epitopsekvenser er påvist mellom homologe allergener i forskjellige arter. For proteinene eCry3.1Ab og PMI ble det ikke funnet noen signifikant sekvenshomologi på 8 eller større aminosyresekvenser til slike allergene proteiner.

Allergene proteiner i mat er ofte varme- og syrestabile. Matallergenene er oftest, men ikke alltid, stabile overfor mage- og tarmsafter. Allergene matproteiner er ofte de proteinene som forekommer i størst mengde i matvarer. Typiske mengder er fra 1-80 % av proteininnholdet. Konsentrasjonen av proteinene eCry3.1Ab og PMI i korn er ca 0,01 % av totalt protein mengde, og utgjør således en svært liten del av det totale proteininnholdet. eCry3.1Ab- og PMI-proteinene er testet i simulert magesaft, og proteinene brytes ned i løpet av ca. 30 sekunder. Det antas derfor at proteinene også brytes raskt ned i menneskets mage.

Basert på de testene som er omtalt, dvs. at eCry3.1Ab- og PMI-proteinene ikke har noen aminosyresekvenser som har likhet med proteiner med IgE-bindende epitoper, at proteinene brytes raskt ned av magesaft og at andel av totalt proteininnhold er ca 0,01 % anser faggruppen det som lite sannsynlig at disse proteinene vil forårsake IgE-mediert allergi.

## 4.3 Vurdering basert på tilgjengelig datagrunnlag

Akutte 14 dagers føringsstudier (oral sondeføring) på mus med bakterieframstilt PMI- og eCry3.1Ab-protein og 42-dagers føringsforsøk med broilere viste ingen skadelige helseeffekter. Arbeidsgruppen påpeker imidlertid at det burde ha vært utført føringsforsøk på relevante dyrearter, eksempelvis fisk, samt 90-dagers føringsforsøk på rotter.

Søker har feilaktig fastsatt NOAEL fra en akutt toksistetsstudie med enkel eksponering og 14-dagers observasjonstid. Faggruppen og arbeidsgruppen påpeker, via innspill til EFSA-net, at 90-dagers repeterte dosestudier bør benyttes ved fastsettelse av NOAEL. I sub-kroniske studier benyttes det minst to doser av både test- og kontrollfôr, og forsøksdyrene blir eksponert over et så langt tidsrom at eventuelle uheldige helseeffekter ville blitt oppdaget.

Ingen av proteinene PMI eller eCry3.1Ab, som uttrykkes som følge av genmodifiseringen, har likheter med kjente allergener eller egenskaper som tilsier at de kan virke som allergener. Basert på testene som er omtalt i søkers dokumentasjon, dvs. at det i proteinet ikke er påvist aminosyresekvenser som er lik allergene proteiner med IgE-bindende epitoper, at proteinene brytes raskt ned av mage-tarmsaft, samt at konsentrasjonene av proteinene er svært lave (mindre enn 0,01 % av total proteinmengde), anser faggruppen det som lite trolig at tilstedeværelse at disse proteinene i maislinje 5307 medfører et større potensiale for utvikling av matallergi hos mennesker sammenlignet med umodifisert mais. Det er imidlertid ikke vurdert om eCry3.1Ab-toksinet kan ha adjuvanseffekter, d.v.s. fremming av immunreaksjon mot andre proteiner.

## 5 Miljørisikovurdering

Søknad om godkjenning av maislinjen 5307 under EU forordning 1829/2003/EF omfatter bruksområdene fôrvarer, næringsmidler, import og prosessering. Søknaden gjelder ikke dyrking. Miljørisikovurderingen av den transgene maislinjen er derfor avgrenset til mulige effekter av utilsiktet frøspredning i forbindelse med transport og prosessering til mat, fôr og ulike industrielle formål. I tillegg vil indirekte eksponering gjennom gjødsel fra husdyr fôret med genmodifisert mais representere en mulig kilde til uønsket genspredning.

### 5.1 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 og overlevelse 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 derfor primært knyttet til høsting, transport og prosessering.

Maisfrø stiller store krav til spiretemperatur og har ingen frøkvile. Frøplantene er svært sensitive for lave temperaturer. Under våre dyrkingsforhold er det derfor små muligheter for oppspiring og vekst av eventuelle spillfrø. I milde vintre i sørlige områder av Europa kan maisfrø overleve og spire påfølgende vekstsesong, men arten er ikke persistent og etablerer ikke ugraspopulasjoner (Hallauer 2000).

Enkeltplanter av mais finnes av og til forvillet på avfallsplasser, vegkanter og annen brakkmark, men arten etablerer ikke populasjoner utenfor dyrkingsområder (Lid & Lid 2005). 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. Det er ingen stedeagne eller introduserte viltvoksende arter i den europeiske flora som mais kan hybridisere med (OECD 2003).

Insektresistens kan bare betraktes å være en selektiv fordel for den transgene planten i områder med målorganismen tilstede. Overlevelse og spredning av mais til andre habitater i Europa er imidlertid hovedsakelig begrenset av dårlig konkurransevne, manglende frøkvile, mottagelighet for sjukdom og liten toleranse for lave temperaturer. Undersøkelsene av fenotypiske karakterer som er foretatt av søker viser ingen forskjeller mellom den insektresistente maislinjen og konvensjonelle sorter med tilsvarende genetisk bakgrunn for disse karakterene. Det er ingen indikasjoner på at de introduserte egenskapene hos 5307 vil medføre økt fitness, og økt evne til overvintring eller etablering av ugraspopulasjoner utenfor dyrkingsmiljø i forhold til konvensjonelle maissorter.

### 5.2 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 transgene sorter. Dette medfører at mikroorganismer i fordøyelseskanalen hos mennesker og dyr kan eksponeres for

rekombinant DNA. Mais har ikke viltvoksende populasjoner eller nærstående arter utenfor dyrking i Europa, og vertikal genoverføring vil være knyttet til krysspollinering med konvensjonelle og eventuelle økologiske sorter.

### 5.2.1 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 2004, 2009; VKM 2005).

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 5307 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 laboratorieforsøkene 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 lite sannsynlig at gener fra 5307 vil etableres stabilt i genomet til mikroorganismer i miljøet eller i fordøyelseskanaalen hos mennesker eller dyr, men ut fra tilgjengelig kunnskap og begrensninger i metodikk (Nielsen & Townsend 2004) kan det likevel ikke helt utelukkes at horisontal genoverføring vil skje.

### 5.2.2 Vertikal genoverføring

Potensialet for krysspollinering mellom maislinjen 5307 og konvensjonelt foredlete maissorter vil avhenge av omfanget av utilsiktet frøspredning i forbindelse med transport, håndtering og prosessering. Det er imidlertid lite sannsynlig at sporadiske enkeltplanter vil spre signifikante mengder pollen til konvensjonelle dyrkingsfelt. Dyrkingsomfanget av mais i Norge er dessuten svært begrenset. Risiko for utkryssing med dyrkede sorter vurderes derfor til å være ubetydelig.

Insektresistens kan bare betraktes å være en selektiv fordel på arealer der målorganismene er til stede under dyrking. Denne egenskapen vil imidlertid ikke representere økt sannsynlighet for spredning av mais i Europa. Overlevelse hos mais er i hovedsak begrenset av dårlig konkurranseevne, manglende frøkvile, mottagelighet for soppsjukdommer og liten frosttoleranse. Som for konvensjonelle sorter er

det ingenting som tilsier at eventuelle spillplanter vil overleve til neste vekstsesong eller etablere uønskede populasjoner i Norge.

Tatt i betraktning tiltenkt bruksområde for maislinjen, vil miljøeksponeringen være begrenset til sporadiske enkeltplanter fra frøspill i forbindelse med transport og prosessering.

### 5.3 Potensiale for samspill mellom GMP og målorganismer

Den transgene maishybriden 5307 uttrykker eCry3.1A-proteinet, som gir plantene resistens mot angrep fra skadegjørere i billeslekten *Diabrotica*, eksempelvis *D. virgifera virgifera* ('Western Corn Rootworm'), *D. longicornis barberi* ('Northern Corn Rootworm') og *D. virgifera zea* ('Mexican Corn Rootworm').

*D. virgifera virgifera* er det eneste målinsektet for mais 5307 som er påvist i Europa (Crop Protection Compendium 2007). Arten er en betydelig skadegjører i mais på det amerikanske kontinent, men ble først påvist i Europa (Serbia) i 1992. Den siste 15-årsperioden har arten etablert seg i flere land i Sentral-Europa, og det er også rapportert om funn av *D. virgifera virgifera* i Frankrike, Italia, Nederland og Storbritannia (Crop Protection Compendium 2007). Planteskadegjøreren har allerede medført betydelige avlingstap i enkelte regioner, og spredningen skjer svært raskt, spesielt i områder med intensiv maisdyrking. Insektet overvintrer i planterøttene, og områder med monokulturer av mais og arealer der det ikke praktiseres vekstskifte er spesielt utsatte. Det har ikke vært rapportert om funn av *D. virgifera virgifera* i Norge (<http://www.faunaeur.org/distribution.php>).

Tatt i betraktning tiltenkt bruksområde for maislinjen, vil miljøeksponeringen være begrenset til sporadiske enkeltplanter fra frøspill i forbindelse med transport og prosessering. Nivået av eksponering av *Bt*-toksin for eventuelle målorganismer vil derfor være svært lav, og ikke ha noen økologisk betydning i Norge.

### 5.4 Potensiale for samspill mellom GMP og ikke-målorganismer

Sporadiske spillplanter av maislinjen 5307 med opphav i utilsiktet frøspredning under ulike omsetningsledd antas ikke å medføre risiko for ikke-målorganismer.

Når det gjelder indirekte eksponering gjennom gjødsel fra husdyr føret med genmodifisert mais vil mesteparten av Cry-proteinene denatureres av enzymaktivitet (proteaser) i fordøyelseskanalen, og mikrobielle prosesser vil føre til en ytterligere nedbryting av proteinet i gjødsla. Dette medfører at svært lite Cry-proteiner blir spredt med husdyrgjødsel på dyrket mark, noe som igjen minimerer faren for eksponering av potensielt sensitive ikke-målorganismer. Spredning av Cry-toksinet via gjødsel antas derfor ikke å gi signifikante miljøeffekter.

### 5.4 Overvåking

I følge direktiv 2001/18/EF, annekset 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.

Søknad EFSA/GMO/DE/2011/95 omfatter ikke dyrking, og potensiell miljøeksponering av den transgene maislinjen er derfor avgrenset til mulige effekter av utilsiktet frøspredning i forbindelse med transport og prosessering til mat, fôr og industrielle formål. I tillegg vil indirekte eksponering gjennom gjødsel fra husdyr fôret med genmodifisert mais representere en mulig kilde til uønsket genspredning. Miljørisikovurderingen som er presentert av søker identifiserer ingen endret risiko for miljø i forhold til annen mais. Syngenta har derfor ikke utarbeidet spesifikke strategier for risikohandtering eller en særskilt plan for overvåking av 5307.

Tatt i betraktning tiltenkt bruksområde for maislinjen 5307 anser VKMs faggruppe for genmodifiserte organismer at det ikke er behov for å iverksette særskilt program for overvåking av maislinjen.

## **5.5 Vurdering basert på tilgjengelig datagrunnlag**

Søknaden gjelder godkjenning av maislinjen 5307 for import, prosessering og til bruk i næringsmidler og fôrvarer. Faggruppen har derfor ikke vurdert mulige miljøeffekter knyttet til dyrking av maislinjen. Med bakgrunn i tiltenkt bruksområde er miljørisikovurderingen avgrenset til mulige effekter av utilsiktet frøspredning i forbindelse med transport og prosessering, samt indirekte eksponering gjennom gjødsel fra husdyr fôret med genmodifisert mais.

Det er ingen indikasjoner på økt sannsynlighet for spredning, etablering og invasjon av maislinjen i naturlige habitater eller andre arealer utenfor jordbruksområder som resultat av frøspill i forbindelse med transport og prosessering. Norge er i utkanten av dyrkingsområdet for mais, dyrkingsomfanget er svært begrenset og det er ingen stedegne eller introduserte viltvoksende arter som mais kan hybridisere med.

## 6 Vurdering av søkers dokumentasjon, kunnskapshull

Helse- og miljørisikovurderingen av den genmodifiserte maislinjen 5307 er basert på søkers dokumentasjon som er gjort tilgjengelig på EFSA's nettside GMO Extranet. I tillegg er det benyttet uavhengige faglig ekspertise og andre vitenskapelige publikasjoner i vurderingen.

Faggruppen finner at dokumentasjonen er tilstrekkelig for å foreta en foreløpig risikovurdering av den genmodifiserte maislinjen i henhold til tiltenkt bruk i EU/EØS-området, og i overensstemmelse med miljø- og helsekravene i matloven og genteknologiloven med forskrifter, først og fremst forskrift om konsekvensutredning etter genteknologiloven, samt i henhold til kravene i EUs forordning 1829/2003/EF og utsetningsdirektiv 2001/18/EF.

Faggruppen og arbeidsgruppen har, via innspill til EFSA's GMO Extranet, etterspurt mer informasjon om blodanalyser og organvekter i eCry3.1Ab-studien, fordi slike studier har blitt utført i akutt-toksisitetsanalyser i PMI-studien. Faggruppen mener imidlertid at disse undersøkelsene er unødvendig omfattende i akuttstudier, men burde ha vært fulgt opp med en 90-dagers studie av proteinene og maisproduktet.

Videre har søker feilaktig brukt data fra akuttstudiene til å fastsette en NOEL, og på grunnlag av denne samt et gjennomsnittlig inntak av mais hos mennesker beregnet en MOE (eksponeringsmargin). Faggruppen har via innspill til EFSA's GMO Extranet påpekt at beregninger av MOE skal baseres på 90 dagers sub-kroniske studier.

### Adjuvans (fremming av immunreaksjon mot andre proteiner)

Ingen av proteinene PMI og eCry3.1Ab har likheter med kjente allergener eller egenskaper som tilsier at de er allergener med IgE-bindende epitoper. Faggruppen og arbeidsgruppen påpeker imidlertid at søker ikke har vurdert om eCry3.1Ab-toksinet kan ha adjuvanseffekter. d.v.s. fremming av immunreaksjon mot andre proteiner.

Det har ikke vært utført immunologiske studier med de transgene produktene. Det er vist at Cry1Ac-proteinet binder seg til musetarmoverflaten (Vazquez-Padron et al. 2000a) og induserer immunologiske reaksjoner mot seg selv og mot proteiner gitt samtidig (Vazquez et al. 1999). Immunologisk kartlegging av systemisk og mukosal immunreaksjon på Cry1Ac har videre påvist at mus lager både systemisk IgM, IgG og sekretorisk IgA etter intraperitoneal og intragastrisk immunisering (Vazquez-Padron et al. 2000b). I en annen studie er det vist at Cry1Ac hadde utpreget mukosal adjuvanseffekt ved å potensere IgM-, IgG- og IgA-responsen mot hepatittvirusantigen og bovint serumalbumin som ble gitt med sondeføring samtidig med Cry1Ac (Vazquez et al. 1999). Produksjonen av IgE-antistoff, som er knyttet til allergisk reaksjon, ble ikke målt. Også i tidligere studier (Prasad & Shetna 1975) er det påvist adjuvanseffekt av krystallprotein fra *Bacillus thuringiensis*. Adjuvanseffekten av Cry1Ac er bekreftet ved intranasal og intraperitoneal immunisering i to senere publikasjoner med henholdsvis pneumokokk-antigen (Moreno-Fierros et al. 2003) og amøbe-lysat (Rojas-Hernández et al. 2004). Adjuvanseffekten av Cry1Ac ble funnet å være like sterk som adjuvanseffekten av koleratoksin (Vazquez-Padron et al. 1999), som er et mye brukt slimhinneadjuvans i eksperimentelle studier av vaksinasjon og av allergi, og som regnes for å være det sterkeste slimhinneadjuvans vi kjenner.

I en senere studie av Guimaraes et al. 2008 (Guimaraes et al. 2008) undersøkte man adjuvanseffekter av Cry1Ab i forbindelse med allergisk sensibilisering overfor peanøttekstrakt (PE). Koleratoksin (CT), som er en kjent Th2 adjuvant, ble benyttet for sammenligning. I disse forsøkene ble det ikke induert spesifikk IgE ved bruk av Cry1Ab som adjuvant, mens induksjon av spesifikk IgE ble påvist ved bruk av CT som adjuvant. Imidlertid viste den samme undersøkelsen at når PE ble gitt sammen med



Cry1Ab så medførte dette at når musene på et senere tidspunkt ble provosert med PE så økte produksjon av leukotriener (CTC4 og CTE4) i bronkiene umiddelbart. I tillegg ble det 36 timer etter provokasjonen målt økt produksjon av Th2- og Th17 cytokiner og økt influks av neutrofiler og eosinofiler. Det ble dermed konkludert med at Cry1Ab har en adjuvant effekt i forhold til allergi.

Det gjennomsnittlige inntaket av maismel, sukkermais og popkorn i Nord-Europa er beregnet av Dow AgroSciences, se tabell 15. Totalinntaket av disse matvarene i Europa er beregnet til 9,3 g/person/dag, mens totalinntak på verdensbasis er ikke beregnet av søker. Søker har for maismel, sukkermais og popkorn beregnet høyt inntak på verdensbasis (97,5 persentilen) som g/kg kroppsvekt/dag. Inntaket av maismel, sukkermais og popkorn er vist i tabell 15.

**Tabell 15. Estimerer over maisinntak fra GEMS/Food Programme**

	Daglig inntak i Europa (g/person/dag)			Høyt inntak på verdensbasis (g/kg kroppsvekt/dag)	
	Gjennomsnittlig inntak per capita i EU			Høyest 97,5 persentil	
Cluster-diett (region)	Cluster B (Sør-Europa)	Cluster E (Sentral- Europa)	Cluster F (Nord- Europa)	Generell befolkning	Barn ≤ 6 år
Maismel	15,4	14,7	2,0	2,04	3,16
Sukkermais	2,0	6,5	7,2	7,16	11,52
Popkorn	0,2	0,1	0,1	3,33	3,33
Totalt	17,6	21,3	9,3	NA	NA

Kilde: Dow AgroSciences, søknad EFSA/GMO/CZ/2008/62.

Spesielle målgrupper, som barn, har et større inntak av mais enn det beregnede gjennomsnittlige inntaket på verdensbasis (se tabell 15). I henhold til tabellen er det estimerte inntaket for store porsjoner, 97,5 persentil, for barn under 6 år for henholdsvis maismel, sukkermais og popkorn 3,16, 11,52 og 3,33 g/kg kroppsvekt/dag, og for den generell befolkningen er inntaket henholdsvis 2,04, 7,16 og 3,33 g/kg kroppsvekt/dag. De estimerte inntaksmengdene for 97,5 persentilen kommer fra ulike geografiske områder, som Frankrike, Australia, Thailand og Japan. I henhold til søker kan samlet mengde eCry3.1Ab i maiskorn være ca. 7,29 µg/g våtvekt, se tabell 14. Teoretiske beregninger fra faggruppen viser at dersom inntaket av sukkermais i Europa kommer fra 5307 vil dette kunne medføre et inntak for den generelle befolkningen på ca 50 µg Cry-protein/kg kroppsvekt/dag og for barn som er lik eller yngre enn 6 år på ca. 84 µg/kg kroppsvekt/dag., se tabell 15. Den totale inntaksmengden av eCry3.1Ab for voksent individ som veier 60 kg og et barn på 6 års som veier 21 kg, vil bli henholdsvis ca. 3000 - og 1700 µg/dag. For de estimerte inntaksmengdene av Cry-protein som er presentert her er det ikke tatt hensyn til eventuelle nedbrytning av proteinet ved prosessering. De estimerte inntaksmengdene av Cry-proteinet antas å representere den høyest tenkelige mengden. Tilsvarende konsentrasjoner av Cry1Ac som er vist å gi mukosal adjuvanseffekt ved sondeføring av mus er fra 0,1 µg til 100 µg per mus (Vazquez et al. 1999).

Adjuvansdosene som benyttes for immunisering av mus og mennesker i andre sammenhenger (ved injeksjoner) er ofte av samme størrelsesorden, det vil si at om lag samme dose (ca. 10 µg) brukes til mus og menneske. Det er tvilsomt om denne sammenligningen kan overføres til tarmimmunisering siden den effektive konsentrasjonen av Cry-protein/tarmareal vil bli langt lavere hos menneske enn mus. Teoretisk sett kan konsentrasjonen av eCry3.1Ab i mais føre til økt utvikling av allergi mot matvarer spist sammen med maisen, foruten mot mais i seg selv. Man ville vente at adjuvanseffekten

kom til syne først og fremst som økt forekomst av allergi mot de matvarene der matallergi fra før er vanligst. IgE ble ikke målt i de refererte studiene av adjuvanseffekt av Cry1Ac-proteinet.

Et realistisk inntak av Cry-protein vil være vesentlig lavere enn de mengdene som er angitt ovenfor. Mais er en bulkvare hvor flere typer mais fra mange åkre samles i felles siloer før videre prosessering. Man vil således aldri spise 100 % 5307-mais. Vi spiser stort sett prosessert mais hvor, i mange tilfeller, proteinene er helt eller delvis degradert eller er fjernet. Søker oppgir at eCry3.1Ab brytes raskt ned i magesaft. Eksponering av tarmepitel for eCry3.1Ab- protein forventes dermed å være marginal.

Cry proteiner er ikke varmemestabile. I maisgrøt er det for eksempel vist at konsentrasjonen av Cry1Ab ble redusert med 90 % etter 3 minutters oppvarming ved 75 °C. Proteinet kunne ikke påvises etter steking av tortillas ved 190 °C i 10 s (de Luis et al. 2009). Dette innebærer igjen at eksponering av tarmepitel for Cry proteiner vil være marginal hvis maten er kokt eller stekt.

Induksjon av IgE er ikke vist for eCry3.1Ab. Det finnes lite litteratur på området omkring betydning av adjuvanter for induksjon av IgE-mediert allergisk respons. Den foreliggende litteratur tyder i flere tilfeller på at betydningen er liten. I en musemodell for allergiutvikling mot lupin ga bruk av koleratoksin (CT) økt immunrespons for andre klasser av immunglobuliner, men ingen IgE respons. Forfatterne antyder at IgE-respons er mer avhengig av indre egenskaper ved allergenene, og ikke relatert til CT-adjuvans (Foss et al. 2006). I en lignende rottemodell viste CT også kun en begrenset effekt på utvikling av peanøttallergi (de Jonge et al. 2007). De Jonge et al. viste også at det var krevende å klare å indusere allergi i rottene. Rotter som gikk på streng diett i 3 generasjoner ga IgE respons, mens rotter som gikk på allergenfri diett i én generasjon ga ikke IgE respons etter indusering. Disse forsøkene indikerer en begrenset betydning av adjuvans for utvikling av IgE-mediert allergi. Utvikling av matallergi skyldes et komplekst samspill av faktorer som genetisk predisposisjon, alder ved introduksjon av allergenet, amming, sammensetning av ernæring, sammensetning av tarmfloraen og infeksjonsstatus i mage-tarmsystemet (van Wijk & Knippels 2007).

Maten vi spiser inneholder en lang rekke stoffer som virker som adjuvanter (Berin & Schreffler 2008). Eksempler på disse stoffene er glukaner og lectiner som er vanlige i alt plantemateriale, proteinaser og chitin, en hovedbestanddel i cellevegg hos sopp. Det kan derfor reises tvil om tilstedeværelsen av små mengder av et adjuvant protein vil bidra til noen økt risiko for induksjon av IgE dannelse. Det anføres i tillegg at Cry-proteinene har en 50 år lang historie med trygg bruk. Det er tillatt å sprøyte mais med *Bt* helt frem til høsting. Maislinjen MON810, som inneholder Cry1Ab-proteinet, har vært dyrket og konsumert siden 1996.

## 7 Innspill til EFSA GMO Extranet søknad EFSA/GMO/DE/2011/95

**Reference: D, 07 Information on any toxic, allergenic or other harmful effects on human or animal health arising from the GM food/feed.**

**Comment: D.07.08**

### **Toxicology**

*Comments from the GMO Panel of the Norwegian Scientific Committee for Food Safety:*

The Technical Dossier includes two acute toxicity studies (OECD guidelines 420) with GM-maize 5307. In the PMI study the applicant has measured organ weights, several parameters in blood, and performed clinical pathology. In the eCry3.1Ab study, macroscopic and microscopic analyses have been performed, but organ weights are not measured.

Several changes in clinical- and chemical parameters have been shown in the PMI study and histopathological changes in the eCry3.1Ab study. The acute study is only based on one single exposure and the animals are observed for 2 weeks. The data gives only a hint that there might be some problems with such a high dose of the substances. A NOEL is determined based on the acute studies. These studies are designed for determination of LD50. According to OECD guidelines it is not recommended to determine NOEL based on acute oral toxicity studies since they are limited to 14 days observation period and a single exposure. NOAEL should be determined based on the 90 days sub-chronic study (OECD 408). A study according to the OECD 408 guideline would have answered whether there are toxic effects of these proteins.

Further on, the applicant has used data from the acute study (OECD 420 guideline) to calculate a NOEL of 2000 mg/kg bw/day for both eCry3.1Ab and PMI (page 47 in the Tech Dossier). The applicant has estimated a MOE (Margin of exposure) based on an average daily intake of maize of 148.4 g/person/day and on the NOELs. Estimating MOE on acute toxicity studies does not give a reliable MOE. The Margin of exposure should be estimated based on a NOAEL calculated from a 90 days sub-chronic study.

In the broiler study increased bw were detected in males exposed to GM-maize compared to isogenic control. Reduced thigh/drum weights were detected both in males and females when fed GM-maize compared to the isogenic control. The applicant has explained these differences to be within the variation of historical controls, although these differences were significantly different compared to the isogenic control. If a 90-day oral toxicity study had been performed, a possible toxic effect of the transgenic maize 5307 compared to the isogenic control could have been excluded.

## Vurdering basert på tilgjengelig datagrunnlag

### Molekylær karakterisering

Faggruppen vurderer karakteriseringen av det rekombinante DNA-innskuddet i maislinjen 5307, og de fysiske, kjemiske og funksjonelle karakteriseringen av proteinene til å være tilfredsstillende. Faggruppen har ikke identifisert noen risiko knyttet til det som framkommer av den molekylærbiologiske karakteriseringen av det rekombinante innskuddet i maislinjen.

### Komparative analyser

Analysen av ernæringsmessige komponenter er i hovedsak utført i tråd med OECDs konsensusdokument for mais (OECD 2002). Det er påvist signifikante forskjeller mellom testlinjen 5307 og umodifisert kontroll i enkeltparametere. Verdiene for de analyserte komponentene ligger imidlertid innenfor typiske verdier for andre maissorter som er rapportert i litteraturen, samt innenfor toleranseintervallene for de umodifiserte referansesortene som er inkludert i søkers dokumentasjon.

Faggruppen påpeker at søker ikke har foretatt analyser av vitamin C. Det understrekes at konsensusdokumentet i størst mulig grad skal følges når det legges fram dokumentasjon på nivåene av næringsstoffer, antinæringsstoffer og metabolitter. Faggruppen vektlegger imidlertid at hoveddelen av maisforbruket i Norge er som dyrefôr og at mais til humant konsum utgjør mindre enn 1 % av energiinntaket både for voksne og barn under ett år. Daglig inntak av sukkermais vil bidra med 0,5 % av daglig anbefaling for vitamin C ved inntak lik medianen (data fra Den Norske mor barn studien). Ved maisinntak på 17,5 g/dag (97,5 % persentilen) vil ca 2,6 % av daglig anbefaling for vitamin C dekkes. Når det gjelder dyrefôr ansees det naturlige vitamininnholdet i mais å være uten betydning da all mais som benyttes som fôr vitaminberikes i henhold til Mattilsynets anbefalinger. Tilsvarende angis krav til ernæringsmessig sammensetning av kornbasert barnemat i vedlegg 1 i Forskrift om bearbeidet kornbasert barnemat og annen barnemat til spedbarn og småbarn (FOR 2002-10-18 nr 1185). Faggruppen vurderer derfor at et eventuelt avvikende nivå av vitamin C i 5307 har liten ernæringsmessig betydning i Norge.

Med unntak av insektsresistens viser feltforsøk i USA over to vekstsesonger små eller ingen signifikante forskjeller mellom den transgene maisen 5307 og umodifisert, nær-isogen kontrollinje med hensyn på agronomiske karakterer.

### Toksisitet og allergenitet

Akutte føringstudier (oral sondeføring) på mus med bakterieframstilt PMI- og eCry3.1Ab-protein og 42 dagers føringforsøk med broilere viste ingen skadelige helseeffekter på forsøksdyrene. Faggruppen påpeker at det burde ha vært utført føringforsøk på relevante dyrarter/grupper, eksempelvis fisk, samt nittidagers føringforsøk på rotter.

Søker har feilaktig beregnet risiko ut fra enkelt akuttstudium med enkel eksponering og 2 ukers observasjonstid. Risiko skal beregnes ut fra 90-dagers føringstudie.

Ingen av proteinene PMI og eCry3.1Ab har likheter med kjente allergener eller egenskaper som tilsier at de er allergener. Det er imidlertid ikke vurdert om eCry3.1Ab-toksinet kan ha adjuvanseffekter, d.v.s. fremming av immunreaksjon mot andre stoffer.

### Miljørisiko

Søknaden gjelder godkjenning av maislinjen 5307 for import, prosessering og til bruk i næringsmidler og fôrvarer. Faggruppen har derfor ikke vurdert mulige miljøeffekter knyttet til dyrking av maislinjen. Med bakgrunn i tiltenkt bruksområde er miljørisikovurderingen avgrenset til mulige effekter av utilsiktet frøspredning i forbindelse med transport og prosessering, samt indirekte eksponering

gjennom gjødsel fra husdyr fôret med genmodifisert mais. Faggruppe for genmodifiserte organismer finner ingen indikasjoner på økt sannsynlighet for spredning, etablering og invasjon av maislinjen i naturlige habitater eller andre arealer utenfor jordbruksområder som resultat av frøspill i forbindelse med transport og prosessering. Norge er i utkanten av dyrkingsområdet for mais, dyrkingsomfanget er svært begrenset og det er ingen stedegne eller introduserte viltvoksende arter som mais kan hybridisere med.

Faggruppen har identifisert flere svakheter ved søkers fôringsstudier. Disse er spilt inn til EFSA GMO Extranet. Risikovurdering av den genmodifiserte maislinjen vil bli ferdigstilt av faggruppen når endelig dokumentasjon fra søker foreligger.

## Referanser

- Bensasson D, Boore JL, Nielsen KM (2004) Genes without frontiers. *Heredity* 92: 483-489.
- CERA (2011) Center for Environmental Risk Assessment. GM Database for safety information. [http://cera-gmc.org/index.php?action=gm\\_crop\\_database](http://cera-gmc.org/index.php?action=gm_crop_database)
- Chen E, Stacy C (2007) Modified Cry3A toxins and nucleic acid sequences coding therefore. US patent No 7,276,583. Washington DC: US Patent Office.
- Christensen AH, Sharrock RA, Quail PH (1992) Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Molecular Biology* 18: 675-689.
- Codex (2003) Codex Alimentarius Commission, Alinorm 03/34: Joint FAO/WHO Food Standard Programme, Codex Alimentarius Commission, Twenty-Fifth Session, Rome, Italy, 30 June-5 July, 2003.
- Crop Protection Compendium (2007) <http://www.cabicompendium.org/cpc/home.asp>
- 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.
- Depicker A, Stachel S, Dhaese P, Zambryski P, Goodman HM (1982) Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. *Journal of Molecular Applied Genetics* 1: 561-573.
- EFSA (2004) 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 (2006) Guidance document of the scientific panel on genetically modified organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed. ISBN: 92-9199-019-1. European Food Safety Authority, Parma, Italy. 100 p. [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 (2009) 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\\_ConsolidatedARG\\_en.pdf?ssbinary=true](http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/Statement/gmo_biohaz_st_ej1108_ConsolidatedARG_en.pdf?ssbinary=true)
- EFSA (2010) Guidance on the environmental risk assessment of genetically modified plants. Scientific opinion from the EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO). *EFSA Journal* 8 (11):1-111. <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/1879.pdf>
- EFSA (2011) Guidance for risk assessment of food and feed from genetically modified plants. Scientific opinion from the EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO). *The EFSA Journal* 9(5): 2150. <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2150.pdf>

- FAO/WHO (2000). Safety aspects of genetically modified foods of plant origin. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- FAO/WHO (2001) Evaluation of allergenicity of genetically modified foods. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on foods derived from biotechnology. 22-25 January 2001. Rome: Food and Agriculture Organisation of the United Nations (<http://www.fao.org/es/esn/gm/allergygm.pdf>)
- Freeze HH (2002) Phosphomannose isomerase. I: Taniguchi N, Honke K, Fukada M red. Handbook of glycosyltransferases and related genes. Edition 1. Springer-Verlag, Tokyo and New York. S. 595-599.
- FSANZ (2008) APPLICATION A1001. Food derived from insect-protected corn line 5307. Approval Report. Food Standards Australia New Zealand. [http://www.foodstandards.gov.au/\\_srcfiles/A1001%20GM%20Corn%20AppR%20FINAL.pdf](http://www.foodstandards.gov.au/_srcfiles/A1001%20GM%20Corn%20AppR%20FINAL.pdf)
- Geiser M, Schweizer S, Grimm C (1986) The hypervariable region in the genes coding for entomopathogenic crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*: nucleotide sequence of the *kurhd1* gene of subsp. *kurstaki* HD. Gene 48: 109-118.
- Guimaraes VD, Drumare MF, Ah-Leung S, Lereclus D, Bernard H, Creminon C, Wal JM, Adel-Patient K (2008) Comparative study of the adjuvanticity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab protein and cholera toxin on allergic sensitisation and elicitation to peanut. Food and Agricultural Immunology, 19, DOI 10.1080/09540100802495651|PII 09540100906477739.
- Hallauer AR (2000) Potential for outcrossing and weediness of genetically modified insect protected corn. APHIS-USDA.
- Hoeckema A, Hirsch P, Hooykaas P, Schilperoort R (1983) A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. Nature 303 : 179-180.
- Hohn T, Stavolone L, De Haan P et al. (2007) Cestrum yellow leaf curling virus promoters. US Patent No7, 166,770. Washington DC : US Patent Office.
- ILSI (2007) International Life sciences Institute Crop Composition Database Version 3.0. URL: <http://www.cropcomposition.org>
- Koziel MG, Desai NM, Lewis KS et al. (1997) Synthetic DNA sequence having enhanced insecticidal activity in maize. Ciba-Geigy, assignee. US Patent No. 5,625,136. Washington, DC: US Patent Office.
- Lid J, Lid DT (2005) Norsk flora. Det Norske Samlaget, Oslo. 7. utgave. ISBN: 82-521-6029-8. 1230s.
- Moreno-Fierros, L., Ruiz-Medina, E.J., Esquivel, R., López-Revilla, R., Piña-Cruz, S. (2003). Intranasal Cry1Ac protoxin is an effective mucosal and systemic carrier and adjuvant of *Streptococcus pneumoniae* polysaccharides in mice. Scand. J. Immunol. 57: 45-55.
- Murray EE, Lotzer J, Eberle M (1989) Codon usage in plant genes. Nucleic Acids Research 17: 477-498.

- Negretto D, Jolley M, Beer S et al. (2000) The use of phosphomannose-isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plants (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium* transformation. *Plant Cell Reports* 19: 798-803.
- Netherwood T, Martín-Orúe SM, O'Donnell AG, Gockling S, Graham J, Mathers JC, Gilbert HJ. (2004) Assessing the survival of transgenic plant DNA in the human gastrointestinal tract. *Nature Biotechnology* 22: 204-209.
- Nielsen KM, van Elsas JD, Smalla K (2000) Transformation of *Acinetobacter* sp. BD413 (pFG4deltanptII) with transgenic plant DNA in soil microcosms and effects of kanamycin on selection of transformants. *Applied Environmental Microbiology* 66: 1237-1242.
- Nielsen K (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 (Italy)* 1: 96-149.
- Nielsen KM, Townsend JP. (2004) Monitoring and modeling horizontal gene transfer. *Nature Biotechnology* 22(9): 1110-1114.
- OECD (1998) OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring. Number 1. ENV/MC/CHEM (98)17.  
[http://www.olis.oecd.org/olis/1998doc.nsf/LinkTo/NT00000C5A/\\$FILE/01E88455.PDF](http://www.olis.oecd.org/olis/1998doc.nsf/LinkTo/NT00000C5A/$FILE/01E88455.PDF)
- OECD (2002) Consensus Document on Compositional Consideration for New Varieties of Maize (*Zea Mays*): key Food and Feed Nutrients, Anti-nutrients and Secondary Plant Metabolites, No. 6, series on Safety of Novel Foods and Feeds.
- 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.
- Ooms G, Hooykaas PJJ, van Veen RM, et al. (1982) Octopine Ti-Plasmid Deletion Mutants of *Agrobacterium tumefaciens* with Emphasis on the Ruight Side of the T-Region. *Plasmid* 7: 15-29.
- Prasad SSSV, Shethna YI (1975) Enhancement of immune response by the proteinaceous crystal of *Bacillus thuringiensis* var *thuringiensis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 62: 517-521.
- Rojas-Hernández S, Rodríguez-Monroy MA, López-Revilla R, Reséndiz-Albor AA, Moreno-Fierros L (2004) Intranasal coadministration of the Cry1Ac protoxin with amoebal lysates increases protection against *Naegleria fowleri* meningoencephalitis. *Infect. Immun.*72: 4368-4375.
- Schubbert GW, 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.
- Sekar V, Thompson DV, Maroney MJ et al. (1987) Molecular cloning and characterization of the insecticidal crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 84: 7036-7040.
- TemaNord (1998) Safety Assessment of Novel Food Plants: Chemical Analytical Approaches to the Determination of Substantial Equivalence. TemaNord 1998:591. ISBN 92-893-0263-1.
- US EPA 40 CFR PART 160. USA Environmental Protection Agency Good Laboratory Practices -



40 CFR Part 160

<http://www.epa.gov/compliance/monitoring/programs/fifra/glp.html>

- van Frankenhuyzen K, Nystrom C (2002) The *Bacillus thuringiensis* toxin specificity database. [http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/)
- van Wijk F, Knippels L (2007) Initiating mechanisms of food allergy: oral tolerance versus allergic sensitization. *Biomed. Pharmacother* 61: 8–20.
- Vazquez-Padron RI, Martinez-Gil AF, Ayra-Pardo C, Gonzalez-Cabrera J, Prieto-Samsonov DL, De la Riva GA (1998) Biochemical characterization of the third domain from *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins. *Biochem. Mol. Biol Int.* 45(5): 1011-20.
- Vazquez, R.I., Moreno-Fierros, L., Neri-Bazan, L., De La Riva GA. Lopez-Revilla, R. (1999). *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protoxin is a potent systemic and mucosal adjuvant. *Scand. J. Immunol.* 49: 578-84.
- Vazquez-Padron RI, Gonzales-Cabrera J, Garcia-Tovar C, Neri-Bazan L, Lopez-Revilla R, Hernandez M, Moreno-Fierro L, De la Riva GA (2000a) Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* sp. *kurstaki* HD73 binds to surface proteins in the mouse small intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271: 54-8.
- Vazquez-Padron RI, Moreno-Fierros L, Neri-Bazan L, Martinez-Gil AF, De La-Riva GA, Lopez-Revilla R, (2000b) Characterization of the mucosal and systemic immune response induced by Cry1Ac protein from *Bacillus thuringiensis* HD 73 in mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 33: 147-55.
- VKM (2005) 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.
- Warman PR, Havard KA (1998) Yield, vitamin and mineral contents of organically and conventionally grown potatoes and sweet corn. *Agric, Ecosyst Environment* 68: 207–216.

## Vedlegg

**Tabell 1 Oversikt over agronomiske karakterer og sjudomskarakterer registrert i feltforsøk i USA i 2007.**

Trait	Abbreviation	Timing	Description
# Barren Plants	BRRNN	Harvest	Number of plants per plot that do not develop an ear.
# Plants with Dropped Ears	DROPN	Harvest	Number of plants per plot that have dropped a developed ear prior to harvest.
# Emerged Plants	EMRGN	V3	Number of emerged plants per plot prior to thinning
Early Emergence Vigor	EMRGR	Before V3	Early emergence vigor rating recorded before 14 days after planting on a scale of 1-9, 1 being most vigorous.
Early Growth Vigor	ERGRR	At or After V6	Early growth vigor rating recorded at or after V6 stage on a scale of 1-9, 1 being most vigorous.
Ear Height	ERHTN	After Anthesis	Ear height (cm) from base of plant to node where ear connects to plant. Data collected when plant is between R2 and R6.
% Grain Moisture	GMSTP	Harvest	% grain moisture measured at harvest
Grey Leaf Spot	GRLSR	When or if it occurs	A 1-9 rating (1=no disease present, 9=plant completely susceptible) of the plants in the 2-row plot for Gray Leaf Spot resistance
Plant Population at Harvest	HAVPN	Harvest	Harvest population (plants per acre)
Heat Units to 50% Silking	HU5SN	Flowering	Heat units to 50% of plants extruding silks
Heat Units to 50% Pollen Shed	HUPSN	Flowering	Heat units to 50% of plants shedding pollen
Late Season Intactness	INTLR	Harvest	Rating of late-season integrity of the plant above the ear; 1=all plant parts intact at harvest. 9 = 100% of plants in the plot are broken at the ear node prior to harvest.
Leaf Color rating	LFCLR	After Anthesis	Leaf color rating collected between R4 and R6 stage of corn development. 5=same as commercial check. 1=darker 9=severely chlorotic.
Late Root Lodging	LRTLTP	Harvest	% plants per plot leaning greater than 30 degrees from vertical at the root after anthesis.
Northern Corn Leaf Blight	NCLMR	When or if it occurs	A 1-9 rating (1=no disease present, 9=plant completely susceptible) of the plants in the 2-row plot for Northern Corn Leaf Blight resistance
Plant Height	PLHTN	After Anthesis	Plant height (cm) from base of plant to collar of flag leaf. Data collected when plant is between R2 and R6.
Stalk lodging	STKLN	Harvest	Number of plants per plot with broken stalks below the ear at harvest.
Test Weight	TWSMN	Harvest	Grain test weight (pounds/bushel) converted to standard 15.5% moisture.
Grain Yield	YGSMN	Harvest	Grain yield (bushels/acre) converted to standard 15.5% grain moisture.

**Tabell 2 Oversikt over agronomiske karakterer og sjudomskarakterer registrert i feltforsøk i USA i 2008.**

Trait	Timing	Description
# Barren Plants	Harvest	Number of plants per plot that do not develop an ear.
# Plants with Dropped Ears	Harvest	Number of plants per plot that have dropped a developed ear prior to harvest.
# Emerged Plants	V3	Number of emerged plants per plot prior to thinning.
Early Emergence Vigor	Before V3	Early emergence vigor rating recorded before 14 days after planting on a scale of 1-9, 1 being most vigorous.
Early Growth Vigor	At or After V6	Early growth vigor rating recorded at or after V6 stage on a scale of 1-9, 1 being most vigorous.
Ear Height	After Anthesis	Ear height (cm) from base of plant to node where ear connects to plant. Data collected when plant is between R2 and R6.
Early Root Lodging	Before Anthesis	% plants per plot leaning greater than 30 degrees from vertical at the root prior to anthesis.
% Grain Moisture	Harvest	% grain moisture measured at harvest
% Snapped Plants	Before Anthesis	Percent of plants per plot broken prior to anthesis due to adverse environmental conditions, such as high wind speeds.
Plant Population at Harvest	Harvest	Harvest population (plants per acre)
Heat Units to 50% Silking	Flowering	Heat units to 50% of plants extruding silks
Heat Units to 50% Pollen Shed	Flowering	Heat units to 50% of plants shedding pollen
Late Season Intactness	Harvest	Rating of late-season integrity of the plant above the ear; 1=all plant parts intact at harvest. 9 = 100% of plants in the plot are broken at the ear node prior to harvest.
Leaf Color rating	After Anthesis	Leaf color rating collected between R4 and R6 stage of corn development. 5=same as commercial check. 1=darker 9=severely chlorotic.
Late Root Lodging	Harvest	% plants per plot leaning greater than 30 degrees from vertical at the root after anthesis.
Plant Height	After Anthesis	Plant height (cm) from base of plant to collar of flag leaf. Data collected when plant is between R2 and R6.
Push Test	Harvest	Number of plants out of 10 plants tested that break the stalk or has root failure after pushing to 45 degrees from vertical..
Stalk lodging	Harvest	Number of plants per plot with broken stalks below the ear at harvest.
Test Weight	Harvest	Grain test weight (pounds/bushel) converted to standard 15.5% moisture.
Grain Yield	Harvest	Grain yield (bushels/acre) converted to standard 15.5% grain moisture.