



Consiglio dei Diritti Genetici



Rapporto di valutazione della notifica EFSA-GMO-NL-2005-12

**Richiesta per l'immissione in commercio del
mais GM 59122, resistente agli insetti e tollerante il
glufosinato, per uso alimentare e produzione di mangimi,
importazione e trasformazione**



**Presentata dalla Pioneer Hi-Bred/Mycogen Seeds
ai sensi del regolamento (CE) 1829/2003**

Rapporto numero 13/2006

PREMESSA

Il 18 ottobre 2003 è stato emanato il regolamento (CE) 1829/2003 riguardante alimenti e mangimi geneticamente modificati. Tale regolamento, entrato in vigore il 18 aprile 2004, istituisce procedure comunitarie per l'autorizzazione di alimenti e mangimi geneticamente modificati e la loro vigilanza.

In base al principio "one door, one key", le richieste di commercializzazione possono essere presentate ai sensi del suddetto regolamento, senza che sia necessaria un'ulteriore autorizzazione in base alla direttiva 2001/18/CE.

L'ente responsabile della valutazione delle notifiche è l'European Food Safety Authority (EFSA), attraverso un apposito gruppo di esperti, il GMO Panel.

Procedura autorizzativa

Un'azienda che intende commercializzare un organismo geneticamente modificato (OGM) per uso alimentare in Europa dovrà presentare una domanda o notifica, denominata *application*, all'Autorità Competente di uno Stato membro. Essa dovrà contenere, oltre ai documenti richiesti per la valutazione della sicurezza alimentare¹, tutte le informazioni necessarie affinché siano effettuabili la valutazione del rischio e i piani di monitoraggio dei possibili effetti diretti e indiretti, immediati e differiti sull'ambiente e sulla salute umana².

La documentazione è inviata al GMO Panel dell'EFSA, il quale, verificatane la conformità, ha sei mesi di tempo per redigere un parere scientifico, denominato *scientific opinion*, che viene trasmesso alla Commissione Europea. Nella fase propedeutica alla formulazione del parere, l'EFSA può richiedere una valutazione di sicurezza dell'alimento all'ente per la valutazione degli alimenti di uno Stato membro³ e/o una valutazione del rischio ambientale a opera dell'Autorità competente di uno Stato membro⁴.

Nel caso in cui la richiesta includa anche la coltivazione, la valutazione del rischio ambientale del prodotto deve essere condotta dall'Autorità Competente di uno Stato membro, ai sensi della direttiva 2001/18/CE. Le Autorità Competenti degli altri Stati membri possono essere consultate.

Se la notifica riceve parere favorevole da parte dell'EFSA, la richiesta passa al Comitato delle Autorità Competenti degli Stati membri dell'Unione Europea, e sarà autorizzata secondo la specifica procedura⁵.

Nell'ambito del regolamento (CE) 1829/2003, l'articolo 29 garantisce, regolandone le modalità, il diritto all'informazione del pubblico, infatti, si può richiedere all'EFSA l'accesso alla documentazione completa (escluse le parti confidenziali) relativa alle notifiche convalidate (*valid applications*). Inoltre, l'articolo 6 comma 7 del regolamento (CE) 1829/2003 prevede la possibilità per il pubblico di partecipare attivamente ai processi decisionali attraverso la facoltà di esprimere osservazioni: il tempo limite per la presentazione di tali osservazioni è di **30 giorni dalla data di pubblicazione dell'opinione generale (*overall opinion*) da parte dell'EFSA.**

Osservatorio Agrobiotecnologie

L'Osservatorio Agrobiotecnologie (OA), come parte del Consiglio dei Diritti Genetici (CDG)⁶, associazione scientifica e culturale indipendente, intende promuovere e approfondire la partecipazione del pubblico ai processi decisionali relativi ai rilasci di OGM. A tal fine, analizza le *opinions* pubblicate dall'EFSA e la documentazione disponibile e realizza un rapporto di valutazione basato sia sulle notizie rese disponibili al pubblico (secondo le modalità previste dal regolamento), sia sulle informazioni scientifiche fornite da altre fonti autorevoli. Il rapporto così realizzato ha la finalità di evidenziare gli eventuali punti non chiariti nella notifica e nell'*opinion*, fornendo così gli elementi necessari al pubblico per formulare le proprie osservazioni. Inoltre, l'OA intende concorrere

¹ Regolamento (CE) n. 1829/2003, articoli 5(8) e 17(8).

² Direttiva 2001/18/CE.

³ Regolamento (CE) n. 1829/2003, art. 6, par. 3, lett. b.

⁴ Regolamento (CE) n. 1829/2003 art. 6, par. 3, lett. c.

⁵ Regolamento (CE) n. 1829/2003 art. 35.

⁶ www.consigliodirittigenetici.org.

direttamente al processo di autorizzazione dei nuovi OGM inviando alla Commissione Europea le proprie osservazioni.

In considerazione della scarsità del tempo lasciato al pubblico per procedere a un'attenta valutazione delle richieste di rilascio di OGM e della difficoltà di reperimento delle informazioni scientifiche relative alla valutazione del rischio, il suddetto rapporto non può essere considerato come un oggetto statico e definitivo, bensì come un lavoro in fase di elaborazione che potrà arricchirsi di tutti i contributi che saranno resi disponibili in futuro.

RIASSUNTO

Il 16 settembre 2005 la domanda EFSA-GMO-NL-2005-12, presentata dalla Pioneer Hi-Bred/Mycogen Seeds allo scopo di commercializzare in Europa il mais GM 59122 per l'importazione, il processamento e l'uso in alimenti e mangimi, ha ricevuto la *valid application*. L'EFSA sta quindi valutando la documentazione proposta dal notificante.

Il mais 59122 è stato modificato geneticamente per esprimere le proteine Cry34Ab1, Cry35Ab1 e PAT. Cry34Ab1 e Cry35Ab1 agiscono insieme nel controllo delle larve del coleottero *Diabrotica spp.* L'espressione della proteina PAT, usata come marker, conferisce tolleranza all'applicazione dell'erbicida glufosinato d'ammonio.

L'Osservatorio Agrobiotecnologie del CDG ha esaminato i documenti messi a disposizione del pubblico, elaborando in sintesi quanto segue.

Analisi molecolare

Il dossier descrive accuratamente le caratteristiche molecolari dell'inserito, che risulta completo in ogni sua parte. L'unico appunto è l'assenza di una prova di PCR (Polymerase Chain Reaction) condotta sul DNA del genoma di mais non trasformato utilizzando una coppia di primer in grado di amplificare la regione tra il border 5' e quello 3', in modo da dimostrare l'integrità della regione di inserzione nel genoma di mais. Infine si rileva l'assenza di una tabella per poter confrontare i livelli di espressione delle proteine transgeniche nelle diverse condizioni studiate.

Analisi composizionale, tossicologica e allergologica

Dall'analisi composizionale risulta che vi sono chiare differenze statisticamente significative tra il mais 59122 e il controllo. Questi risultati dimostrano che il quadro delle vie metaboliche del mais GM è stato in qualche modo alterato, quindi appare necessario indagare ulteriormente per accertarne l'equivalenza composizionale con il mais tradizionale.

Lo studio tossicologico di 90 giorni eseguito sui roditori dimostra che l'intero alimento GM ha un effetto tossico sulle cavie, che subiscono modificazioni a livello di alcuni parametri ematici, del contenuto di calcio e potassio ecc. Questi risultati confermano le differenze evidenziate tra mais GM e controllo nell'analisi composizionale e testimoniano la presenza di effetti indesiderati dovuti alla modificazione genetica.

Per valutare l'allergenicità del mais 59122 le proteine introdotte a seguito della modificazione genetica (Cry34Ab1, Cry35Ab1 e PAT) sono state valutate separatamente, mentre, data l'assenza di sostanziale equivalenza tra mais 59122 e mais di controllo e il rischio tossico presentato dal mais GM, appare necessario condurre dei test per analizzare l'eventuale potenzialità allergenica dell'alimento nel suo complesso, poiché le proteine potrebbero anche interagire tra loro.

Analisi dei rischi ambientali

Pur non essendone prevista la coltivazione, la granella di mais 59122 potrebbe essere rilasciata nell'ambiente durante il trasporto, l'immagazzinamento, la trasformazione e l'utilizzo a livello di fattoria. A quest'ultimo livello non possono essere esclusi il cattivo uso o addirittura la semina, sebbene non prevista.

Nel caso di crescita accidentale, il trasferimento genetico verticale può avvenire senza ostacoli con tutte le altre cultivar di mais, comprese quelle tradizionali e gli ecotipi locali, il cui genoma potrebbe essere inavvertitamente inquinato dai transgeni, com'è già avvenuto in altri paesi^{7,8} e potrebbe avvenire ancora più diffusamente nel prossimo futuro. Il notificante non riporta nessuno studio relativo agli effetti sugli organismi non target e sui cicli biogeochimici. Residui di mais 59122, comprese le tossine Cry34Ab1 e Cry35Ab1, potrebbero finire sul terreno con il letame e accumularsi nel suolo interferendo eventualmente con gli invertebrati che vi vivono (coleotteri in particolare, ma

⁷ Quist D., Chapela I.H. (2001) Transgenic DNA introgressed into traditional maize landraces in Oaxaca, Mexico. *Nature*, vol. 414, 541-543.

⁸ Alvarez Morales A. (2002) Transgenes in maize landraces in Oaxaca: official report on the extent and implications. 7th Int. Symp. Biosafety of Genetically Modified Organism, Beijing, *Meeting Proceedings*, 78.

anche alcuni lepidotteri), con le comunità microbiche e, di conseguenza, con i cicli biogeochimici. La conoscenza scientifica su questi punti allo stato attuale è largamente insufficiente per poter elaborare una efficace valutazione del rischio.

Anche alla luce di quanto detto sopra, sarebbe opportuno predisporre un piano di monitoraggio caso-specifico per controllare il rilascio involontario di residui e/o semi vitali, con conseguente crescita di piante di mais 59122, nei punti più critici - per esempio i luoghi di stoccaggio e le aziende agricole in cui viene usata la granella -, soprattutto se inseriti in un'area di coltivazione del mais. In conclusione, si sottolinea il fatto che non viene proposto neanche un adeguato piano di sorveglianza generale, sempre necessario secondo il parere dell'EFSA⁹.

BACKGROUND

Il 27 gennaio 2005 l'EFSA ha ricevuto dall'Autorità Competente dei Paesi Bassi una richiesta di autorizzazione per la commercializzazione del mais GM 59122, presentata dalla Pioneer Hi-Bred/Mycogen Seeds ai sensi del regolamento (CE) 1829/2003 (riferimento EFSA-GMO-NL-2005-12). Nella richiesta sono previsti importazione, processamento e impiego del mais GM nella preparazione di prodotti alimentari destinati all'uomo e mangimi per gli animali.

Dopo aver ricevuto la richiesta l'EFSA ha informato gli Stati membri e la Commissione, e ha pubblicato sul suo sito web¹⁰ il riassunto del dossier (*summary*).

In seguito ad appropriata analisi, l'EFSA ha considerato l'applicazione valida (*valid application* pubblicata il 16 settembre 2005) e ha reso disponibile agli Stati membri e alla Commissione Europea l'intera documentazione, così come al cittadino che ne faccia richiesta. Sono state inoltre consultate le Autorità Competenti degli Stati membri, come previsto dalla direttiva 2001/18/CE e dall'articolo 6(4) e 18(4) del regolamento (CE) 1829/2003, le quali hanno avuto 3 mesi per esprimere le loro valutazioni.

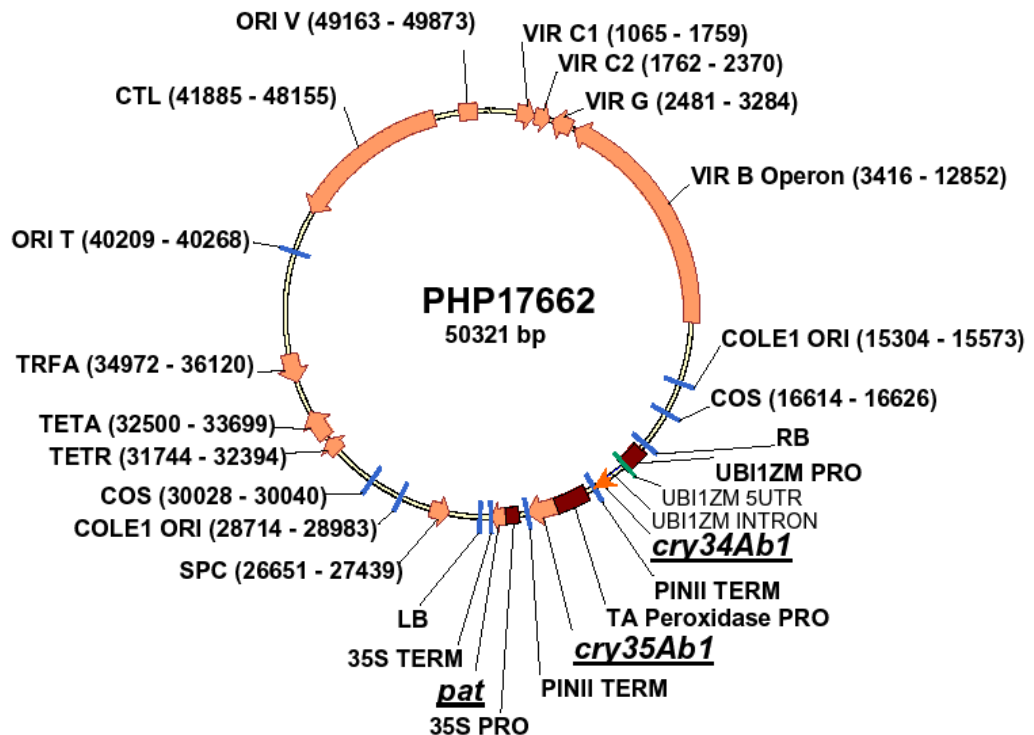
⁹ Opinion EFSA 25, January 2006, *The EFSA Journal*, 319, 1-27.

¹⁰ http://www.efsa.eu.int/science/gmo/gm_ff_applications/more_info/809/partii1.pdf.

1 Caratterizzazione molecolare

Dossier completo

L'evento mais 59122 è stato ottenuto tramite trasformazione mediata da *Agrobacterium*, utilizzando il plasmide PV-BVGT08, in modo da ottenere un mais che esprimesse costitutivamente le proteine *Cry34Ab1* e *Cry35Ab1* (resistenza ai coleotteri), e *PAT* (tolleranza all'erbicida glufosinato). Lo schema del plasmide è riportato di seguito¹¹:



Il T-DNA del plasmide contiene, a partire dal Right Border (RB):

- la cassetta di espressione *cry34Ab1*, che conferisce resistenza agli insetti fitofagi (in particolare coleotteri), costituita dalla sequenza codificante l'endotossina *Cry34Ab1* di *Bacillus thuringiensis*, modificata sinteticamente e ottimizzata per l'espressione nelle piante, sotto il promotore costitutivo *P-ubi1ZM* del gene dell'ubiquitina I di *Zea mays*, e il sito di poliadenilazione 3'-*PINII* del gene dell'inibitore delle proteasi II di *Solanum tuberosum*;
- la cassetta di espressione *cry35Ab1*, che conferisce resistenza agli insetti fitofagi (in particolare coleotteri), costituita dalla sequenza codificante l'endotossina *Cry35Ab1* di *Bacillus thuringiensis*, modificata sinteticamente e ottimizzata per l'espressione nelle piante, sotto il promotore costitutivo *P-TA peroxidase* del gene della perossidasi di *Triticum aestivum*, e il sito di poliadenilazione 3'-*PINII* del gene dell'inibitore delle proteasi II di *Solanum tuberosum*;
- la cassetta di espressione *pat*, che conferisce tolleranza agli erbicidi a base di glufosinato d'ammonio, costituita dalla sequenza codificante per l'enzima *PAT* (fosfinotricina acetil transferasi) di *Streptomyces viridochromogenes*,

¹¹ Application EFSA-GMO-NL-2005-12, according to regulation (EC) n. 1829/2003. Part I.

ottimizzata per l'espressione nelle piante, posta sotto il promotore costitutivo P-e35S del gene 35S di CaMV (Cauliflower Mosaic Virus, virus a mosaico del cavolfiore) e della sequenza di poliadenilazione 3'-35';

- *il Left Border (LB) del plasmide Ti di Agrobacterium tumefaciens.*

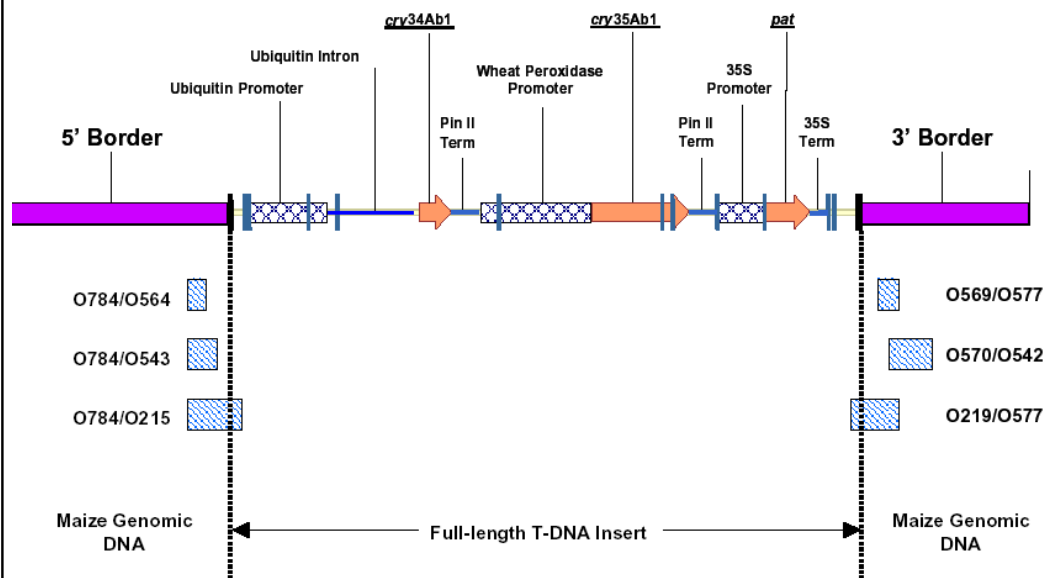
Osservazioni

Il dossier descrive accuratamente il metodo di trasformazione, il vettore e gli elementi genici presenti in esso.

Dossier completo

Le analisi Southern Blot (SB) del DNA hanno evidenziato la presenza di un'unica copia dell'inserto ed escluso l'inserzione di altre sequenze di DNA derivanti dal vettore nel genoma della pianta trasformata.

Il sequenziamento dell'inserto e delle regioni fiancheggianti ha evidenziato che il T-DNA di ca. 7.300 bp si è inserito mantenendosi integro.



Sono state individuate 2 mutazioni puntiformi tra la sequenza dell'inserto e quella del plasmide, ma in una regione non codificante (P-TA perossidase).

Le regioni fiancheggianti il sito di inserzione sono state amplificate con coppie di primer omologhe alle regioni al 5' e al 3' dell'inserto anche nella linea isogena di mais non trasformata, dimostrando che le sequenze individuate sono originarie del genoma di mais.

E' stata analizzata a livello bioinformatico la presenza di ORF (Open Reading Frame) nelle regioni fiancheggianti l'inserto senza rilevare alcuna omologia con tossine o allergeni noti.

Osservazioni

La descrizione fornita del sito di inserzione è estremamente dettagliata, ben organizzata all'interno del dossier e tutti i dati risultano riportati risultano consultabili. L'unico appunto che può essere fatto riguarda l'assenza di una prova di PCR condotta sul DNA del genoma di mais non trasformato utilizzando una coppia di primer in grado di amplificare la regione tra il border 5' e quello 3', in modo da dimostrare l'integrità della regione di inserzione nel genoma di mais.

Dossier completo

I livelli di espressione delle proteine Cry34Ab1, Cry35Ab1 e PAT sono stati saggiati nelle foglie, nelle radici, nel polline, negli stocchi, nel foraggio e nella granella, tramite ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorption Assay), su campioni raccolti in 6 siti nella stagione 2002-03 in Cile e 5 siti nel 2003 in Canada e USA. I livelli di

	<i>espressione della proteina PAT risultano estremamente bassi nella granella, in Cile anche al di sotto del limite di sensibilità dell'analisi.</i>
Osservazioni	Le analisi sono state condotte con buona accuratezza, tuttavia sarebbe stato preferibile disporre di una tabella di sintesi complessiva per poter confrontare i valori tra le diverse stagioni e i differenti trattamenti colturali (trattamento con erbicida o no).
Dossier completo	<i>La stabilità del materiale inserito è stata analizzata a livello sia fenotipico sia genetico per diverse generazioni, senza evidenziare alcuna instabilità.</i>
Osservazioni	Le analisi relative all'aspetto della stabilità risultano condotte accuratamente.

2 Analisi comparativa

2.1 Produzione del materiale per la valutazione comparativa

Dossier completo	<i>Il materiale utilizzato per la valutazione comparativa è stato ricavato da coltivazioni condotte in sei località del Cile (durante le stagioni 2002-2003), in tre località statunitensi (nel 2003) e in due canadesi (nel 2003). Come controllo è stato usato mais con assetto genetico paragonabile.</i>
Osservazioni	Gli studi per saggiare le caratteristiche agronomiche, fenotipiche e dei macro- e micronutrienti dei prodotti GM dovrebbero essere condotti per almeno quattro anni, in condizioni climatiche differenti, allo scopo di accertare la stabilità dell'inserito e i possibili cambiamenti derivanti dalla trasformazione genetica.

2.2 Selezione dei composti per l'analisi comparativa

Dossier completo	<p><i>Il materiale ricavato dalle coltivazioni su campo è stato valutato, per quanto riguarda la composizione, in base ai paesi di provenienza.</i></p> <p>Cile <i>Sono state individuate differenze statisticamente significative riguardanti il contenuto di: proteine, ceneri, carboidrati; calcio; acido palmitico, acido stearico, acido linoleico, acido linolenico; arginina, istidina, isoleucina, leucina, fenilalanina, prolina, triptofano, tirosina, valina; acido folico, vitamina E. In ogni caso, i valori ottenuti rientrano tutti nei relativi intervalli riportati in letteratura. Il notificante conclude che il mais GM e il controllo sono comparabili.</i></p> <p>Stati Uniti e Canada <i>Le differenze statisticamente significative hanno riguardato il contenuto di: proteine, ceneri, carboidrati; rame, ferro, manganese, zinco; acido stearico, acido oleico, acido linoleico, acido linolenico; acido aspartico, glicina, acido glutamico, istidina, isoleucina, leucina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, tirosina, valina; vitamina B1, acido folico, vitamina E. I valori ottenuti rientrano comunque nei relativi intervalli riportati in letteratura. Il notificante conclude che il mais GM e il controllo sono comparabili.</i></p>
Osservazioni	L'opinione del notificante appare discutibile, perché l'analisi composizionale evidenzia delle chiare differenze, statisticamente significative, tra il mais GM e il

controllo. Poiché queste variazioni statisticamente significative potrebbero indicare che qualcosa di importante si è modificato nel metabolismo della pianta GM, sembrano necessari ulteriori approfondimenti.

2.3 Analisi tossicologica

2.3.1 Valutazione delle nuove proteine

Dossier completo

Il mais 59122 produce le proteine Cry34Ab1, Cry35Ab1 e PAT. Per quanto riguarda le prime due, uno studio condotto sui topi, con somministrazione acuta orale delle proteine considerate individualmente o in associazione, ha dimostrato che esse sono prive di effetto tossico.

La proteina PAT ha attività enzimatica ma anche un'elevata specificità di substrato verso il componente attivo del glufosinato d'ammonio. Questo substrato non è presente né nel mais, né nel cibo, né nel mangime. Uno studio condotto sui ratti, alimentati con la proteina PAT, indica che essa non induce effetti immunologici. Un test di tossicità acuta orale effettuato sui topi dimostra l'assenza di tossicità della proteina.

Le sequenze delle proteine Cry34Ab1, Cry35Ab1 e PAT sono prive di omologie significative con quelle di tossine note. Inoltre queste proteine sono degradate in tempi rapidi dai fluidi digestivi simulati e sono rapidamente denaturate dal calore.

Osservazioni

Il notificante ritiene che i risultati ottenuti negli esperimenti condotti portino alla conclusione che le proteine Cry34Ab1, Cry35Ab1 e PAT non sono tossiche per il consumo umano e animale. In realtà, i dati relativi all'analisi composizionale indicano chiaramente che molti costituenti del mais 59122 manifestano una mancanza di sostanziale equivalenza con i controlli: Si ritengono quindi necessarie ulteriori analisi del prodotto GM, per poter assicurarne la mancanza di tossicità per uomini e animali.

2.3.2 Valutazione di nuovi costituenti non proteici

Dossier completo

Il notificante non lo ritiene applicabile.

Osservazioni

In realtà, come visto nei punti precedenti del presente rapporto, esistono chiare differenze nella composizione del mais GM rispetto ai controlli, che andrebbero attentamente valutate perché il cambiamento metabolico che esse sottendono potrebbe portare anche alla comparsa di nuovi composti.

2.3.3 Valutazione tossicologica dell'intero alimento

Dossier completo

Per valutare la tossicità dell'intero alimento GM è stato eseguito uno studio sui ratti, alimentati per 90 giorni in parte con il mais 59122, in parte con il mais di controllo. I risultati indicano variazioni statisticamente significative a carico di diversi parametri ematici, nel contenuto di alcuni minerali (calcio e potassio) e di albumina e nel volume di urina. Il notificante ritiene che queste differenze non siano collegate alla dieta e non abbiano un'origine tossicologica. E' stato condotto anche uno studio di 42 giorni sui pollastri, alimentati con mais 59122 o mais di controllo: non sono state osservate modificazioni statisticamente significative nei parametri presi in considerazione e anche in questo caso il notificante sostiene l'assenza di tossicità.

Osservazioni	Lo studio a 90 giorni eseguito alimentando i ratti con l'intero prodotto GM dimostra con chiarezza che le cavie subiscono delle modificazioni non trascurabili e di cui occorre tenere conto, visto che del mais 59122 si richiede l'approvazione anche per l'uso alimentare. Questi risultati, comunque, confermano le differenze statisticamente significative osservate nell'analisi composizionale. Appaiono quindi necessarie ulteriori indagini per verificare in modo più approfondito se questo mais GM sia realmente privo di effetti tossici per uomo e animali.
---------------------	--

2.4 Allergenicità

2.4.1 Valutazione dell'allergenicità delle nuove proteine

Dossier completo	<i>Quando confrontate con proteine allergeniche conosciute, Cry34Ab1, Cry35Ab1 e PAT dimostrano assenza di sequenze omologhe; inoltre, sono caratterizzate da rapida degradazione nei fluidi gastrici simulati, livelli di espressione relativamente bassi, termolabilità. Quindi, il notificante ritiene che il mais 59122 non presenti un significativo rischio allergico per uomini e animali.</i>
Osservazioni	Poiché non c'è sostanziale equivalenza tra mais 59122 e mais di controllo (come chiaramente dimostrato dall'analisi composizionale e dallo studio a 90 giorni condotto sui ratti), è necessario condurre dei test per analizzare l'eventuale potenzialità allergica delle proteine presenti nel mais GM, le quali potrebbero anche interagire tra loro.

2.4.2 Valutazione dell'allergenicità dell'intera pianta

Dossier completo	<i>Il mais è considerato uno degli alimenti meno allergenici al mondo, ma valutare l'allergenicità delle sue proteine risulta difficile. Negli ultimi anni alcuni studi hanno identificato la presenza di possibili allergeni in questo cereale (per esempio: Pastorello et al., 2000¹²; Pasini et al., 2002¹³). Comunque, il notificante ritiene che la modificazione genetica indotta nel mais 59122 non introduca sostanze tossiche o allergeniche nuove.</i>
Osservazioni	Appare azzardato escludere l'allergenicità potenziale del mais 59122 solo perché il mais convenzionale non è comunemente considerato un alimento allergico. Infatti, anche piccole mutazioni puntiformi potrebbero determinare cambiamenti nella struttura di una proteina tali da creare epitopi per le IgE. Dato che non si sta valutando un normale mais ma una nuova varietà ottenuta tramite tecniche di modificazione genetica, sarebbe opportuno eseguire prove allergiche usando anche il prodotto intero, come raccomandato dagli Stati membri ¹⁴ .

2.5 Valutazione nutrizionale dell'alimento GM

Dossier completo	<i>Considerato che tra mais 59122 e controllo esiste sostanziale equivalenza di composizione e che gli studi di alimentazione (della durata di 42 giorni), condotti sui</i>
-------------------------	---

¹² Pastorello E.A., Farioli L., Pravettoni V., Ispano M., Scibola E., Trambaioli C., Giuffrida M.G., Ansaloni R., Godovac-Zimmermann J., Conti A., Fortunato D., Ortolani C. (2000) The major maize allergen, which is responsible for food-induced allergic reactions, is a lipid transfer protein. *J. Allerg. Clin. Immunol.*, 106, 4, 744-751.

¹³ Pasini G., Simonato B., Curioni A., Vincenzi S., Cristaudo A., Santucci B., Peruffo A.B., Giannattasio M. (2002) Ig-E mediated allergy to corn: a 50 kDa protein, belonging to the reduced soluble proteins, is a major allergen. *Allergy*, 57, 98-106.

¹⁴ Parere EFSA: 4. 1, p. 9.

pollastri, testimoniano l'assenza di tossicità delle proteine Cry34Ab1, Cry35Ab1 e PAT, il notificante è dell'opinione che gli alimenti e i mangimi derivati dal mais 59122 siano sostanzialmente e nutrizionalmente equivalenti agli alimenti e mangimi derivati dal mais commerciale e altrettanto sicuri per il consumo.

Osservazioni In realtà, come già visto ai punti precedenti di questo rapporto, tra mais 59122 e controllo c'è mancanza di sostanziale equivalenza di composizione nonché mancanza di equivalenza nutrizionale; inoltre, l'assenza di rischio tossicologico e allergenico non può essere considerata sufficientemente accertata dagli studi eseguiti.

2.6 Monitoraggio post-marketing dell'alimento GM

Dossier completo *In base a quanto detto prima, non sono stati evidenziati rischi per la salute umana, animale e ambientale derivanti dall'uso del mais 59221. Il notificante è quindi dell'opinione che il monitoraggio post-marketing non sia necessario.*

Osservazioni In base a quanto detto prima, appare necessario il monitoraggio post-marketing, al fine di individuare precocemente l'insorgenza di eventuali effetti negativi sulla salute dei consumatori dovuti a prodotti contenenti il mais GM in questione.

3 Valutazione del rischio ambientale

3.1 Meccanismi di interazione tra pianta GM e organismi target (se applicabile)

Dossier completo *Le proteine Cry34Ab1 e Cry35Ab1 sono state testate singolarmente e in miscela per l'attività contro la diabrotica. Questo studio, eseguito da Herman e collaboratori (2002)¹⁵, mostra che:*

- *la proteina Cry35Ab1 da sola non causa mortalità o inibizione della crescita delle larve di diabrotica;*
- *la proteina Cry34Ab1 da sola causa mortalità e inibizione della crescita delle larve di diabrotica;*
- *i risultati dei saggi biologici fatti con miscele delle due proteine suggeriscono che entrambe contribuiscono all'attività tossica (tanto che per la massima attività insetticida sono richieste ambedue).*

Una delle proteine (Cry34Ab1) potrebbe essere richiesta per il legame forte e altamente specifico ai recettori dell'epitelio intestinale degli insetti target, mentre l'altra proteina (Cry35Ab1) potrebbe essere necessaria per la formazione ottimale dei pori di membrana.

D'altra parte, un modo di azione simile è stato già suggerito per altre tossine binarie insetticide (De Maagd et al., 2003)¹⁶.

Gli studi di alimentazione hanno poi dimostrato che l'epitelio dell'intestino medio è il principale tessuto bersaglio delle proteine Cry34Ab1 e Cry35Ab1. Se ne può dedurre che il sito e il modo apparente di azione delle due proteine sono comparabili con quelli di altre tossine Cry del B. thuringiensis (Moellenbeck et al.,

¹⁵ Herman R.A., Scherer P.N., Young D.L., Mihaliak C.A., Meade T., Woodsworth A.T., Stockhoff B.A., Narva K.E. (2002) Binary insecticidal crystal protein from *Bacillus thuringiensis*, strain PS149B1: effects of individual protein components and mixtures in laboratory bioassays. *J. Econ. Entomol.*, 95, 635-639.

¹⁶ de Maagd R.A., Bravo A., Berry C., Crickmore N., Schnepf H.E. (2003) Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Ann. Rev. Genet.*, 37, 409-433.

Osservazioni	<p>2001)¹⁷.</p> <p>Da quanto emerge dagli studi citati dal notificante, il meccanismo d'azione delle proteine Cry34Ab1 e Cry35Ab1 non è ancora ben definito. In ogni caso è assodato che esse, pur presentando singolarmente bassa tossicità, producono notevoli effetti letali a danno dei coleotteri¹⁸ in generale, e quindi non solo a carico della diabrotica. Inoltre, sottolineiamo che le modalità e il sito di azione delle tossine Cry34Ab1 e Cry35Ab1, come riportato dal notificante, sono comparabili con quelli delle altre proteine Cry. In conclusione, non ci sembra corretto affermare che la diabrotica debba essere considerata il solo organismo target.</p> <p>La conoscenza scientifica su questi punti è insufficiente, quindi ulteriori studi sarebbero necessari per poter formulare una più corretta valutazione degli effetti ambientali.</p>
--------------	--

3.2 Cambiamenti potenziali nelle interazioni della pianta GM con l'ambiente biotico derivanti dalla modificazione genetica

3.2.1 Persistenza e capacità infestante

Dossier completo	<p><i>Il mais 59122 è stato testato in campo in differenti località su scala mondiale, come nel Cile, negli USA e nel Canada, e le analisi dei dati di campo raccolti da queste prove hanno dimostrato che i caratteri introdotti nel mais 59122 non determinano differenze relative alla morfologia riproduttiva, alla persistenza e alla capacità invasiva rispetto al mais commerciale.</i></p> <p><i>Inoltre, nel contesto di questa notifica, che vale per l'autorizzazione del mais 59122 per tutti gli usi nell'alimentazione umana e animale, e per tutti i prodotti trasformati (alimenti e mangimi) derivati dal mais GM, e che quindi non riguarda la coltivazione dei semi, il rilascio del mais 59122 dovrebbe essere strettamente limitato alla perdita di granella durante l'importazione, l'immagazzinamento e la trasformazione.</i></p>
Osservazioni	<p>La persistenza e la capacità infestante del mais 59122 sono state dedotte sulla base di pochi dati ottenuti nelle prove agronomiche di campo, effettuate in diversi siti per una o due stagioni, e sono relativi essenzialmente a quantità, forma e colore del polline prodotto per pianta, nonché alla germinabilità dei semi¹⁹. Riteniamo tale procedura insufficiente per valutare con adeguata certezza i caratteri in discussione; di conseguenza, pensiamo che siano necessari ulteriori studi sperimentali mirati.</p> <p>Pur non essendone prevista la coltivazione, il mais 59122 potrebbe essere rilasciato nell'ambiente non solo durante il trasporto, l'immagazzinamento e/o la trasformazione, ma anche a livello di fattoria. Proprio in quest'ultimo caso non possono essere esclusi il cattivo uso o addirittura la semina, sebbene non prevista, della granella.</p> <p>I semi di mais, quantunque scarsamente dormienti, possono persistere nel terreno e germinare l'anno seguente, soprattutto in aree climatiche come quella mediterranea, che caratterizza l'Europa meridionale, compresa buona parte della penisola italiana. In queste condizioni il mais GM, rilasciato involontariamente</p>

¹⁷ Moellenbeck D.J., Peters M.L., Bing J.W., Rouse J.R., Higgins L.S., Sims L., Nevshemal T., Marshall L., Ellis R.T., Bystrak P.G., Lang B.A., Stewart J.L., Kouba K., Sondag V., Gustafson V., Nour K., Xu D., Swenson J., Zhang J., Czaplá T., Schwab G., Jayne S., Stockhoff B.A., Narva K., Ernest Schnepf H., Stelman S.J., Poutre C., Koziel M., Duck N. (2001) Insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* protect corn from corn rootworms. *Nature Biotechnology*, 19, 668-672.

¹⁸ de Maagd R.A., Bravo A., Berry C., Crickmore N., Schnepf H.E. (2003) Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Ann. Rev. Genet.*, 37, 409-433.

¹⁹ Vedi part I: punto D.4.

durante il trasporto, lo stoccaggio o per uso improprio a livello di fattoria, può germinare anche nella stagione successiva e, se questo avviene in un campo di mais, non essendo la pianta GM facilmente individuabile, può creare problemi di coesistenza con la produzione di mais GM-free o convenzionale.

3.2.2 Vantaggi o svantaggi selettivi

Dossier completo	<p><i>I vantaggi specifici introdotti dalla modificazione genetica nel mais 59122 non conferiscono nessun vantaggio selettivo alle piante nell'ambiente naturale, al di fuori degli ambienti agricoli.</i></p> <p><i>Inoltre, nel contesto di questa notifica, che vale per l'autorizzazione del mais 59122 per tutti gli usi nell'alimentazione umana e animale, e per tutti i prodotti trasformati (alimenti e mangimi) derivati dal mais GM, e che quindi non riguarda la coltivazione dei semi, il rilascio del mais 59122 dovrebbe essere strettamente limitato alla perdita di granella durante l'importazione, l'immagazzinamento e la trasformazione.</i></p>
Osservazioni	<p>L'assenza di vantaggi o svantaggi selettivi per il mais 59122, rispetto a varietà isogeniche, viene semplicemente affermata: nessun valido studio svolto per meglio valutare tali aspetti viene citato a supporto di questa conclusione. Si rileva la totale mancanza di dati per elaborare un adeguato giudizio scientifico sugli argomenti in discussione. Inoltre, negli ambienti agricoli in cui viene usato il glufosinato d'ammonio e in caso di attacchi di diabrotica o altri coleotteri dannosi, il mais 59122 avrebbe notevoli quanto indubitabili vantaggi selettivi.</p> <p>Infine, si ricorda che eventi insidiosi di rilascio accidentale possono realizzarsi anche a livello di fattoria.</p>

3.2.3 Potenziale per il trasferimento genetico

Dossier completo	<p><i>In Europa non esistono relative selvatiche o infestanti sessualmente compatibili con il mais, e ciò elimina qualsiasi possibilità di potenziale trasferimento genetico tra tali specie. Il trasferimento genetico potenziale è quindi limitato alle altre varietà di mais coltivate.</i></p> <p><i>La modificazione genetica nel mais 59122 non ne cambia l'incapacità di trasferire materiale genetico ai batteri.</i></p> <p><i>In conclusione, nel contesto di questa notifica, che è per l'autorizzazione del mais 59122 per tutti gli usi nell'alimentazione umana e animale, e per tutti i prodotti trasformati (alimenti e mangimi) derivati dal mais 59122, e quindi non riguarda la coltivazione dei semi, il potenziale per il trasferimento genetico è considerato irrilevante.</i></p>
Osservazioni	<p>Come ricorda il notificante, il trasferimento genetico verticale può avvenire senza ostacoli con tutte le altre cultivar di mais, comprese quelle tradizionali e gli ecotipi locali, il cui genoma potrebbe essere inavvertitamente inquinato dai transgeni, com'è già avvenuto nel Messico^{20,21} e potrebbe avvenire ancora più diffusamente nel prossimo futuro²². In Europa, questa possibilità è limitata dal fatto che la</p>

²⁰ Quist D., Chapela I.H. (2001) Transgenic DNA introgressed into traditional maize landraces in Oaxaca, Mexico. *Nature*, vol. 414, 541-543.

²¹ Alvarez Morales A. (2002) Transgenes in maize landraces in Oaxaca: official report on the extent and implications. 7th Int. Symp. Biosafety of Genetically Modified Organism, Beijing, Meeting Proceedings, 78.

²² Serratos-Hernández J.A, Islas-Gutierrez F., Buendia-Rodriguez E., Berthaud, J. (2004) Gene flow scenarios with transgenic maize in Mexico. *Environ. Biosafety Res.*, 3, 149-157.

richiesta non prevede la coltivazione del mais 59122, ma potrebbe verificarsi in caso di uso improprio dei semi del mais GM o comunque di rilascio involontario, con conseguente germinazione nei dintorni o all'interno di un altro campo di mais. Si ricorda inoltre che in condizioni meteorologiche particolari, ma non infrequenti, il polline di mais può conservare la propria vitalità anche se trasportato su lunghe distanze, per esempio alcuni chilometri dalla sorgente^{23,24}.

I fenomeni di trasferimento orizzontale dei transgeni da pianta a batteri, soprattutto a livello del tratto gastroenterico, finora sono stati dimostrati solo in laboratorio, ma potrebbero verificarsi anche in natura, sebbene a bassa frequenza. In effetti, nel tubo digerente di animali alimentati con mais GM sono state trovate sequenze di DNA transgenico appartenente al genoma della coltura GM²⁵. E' lecito ipotizzare che ciò possa avvenire anche per il mais 59122 e gli eventuali batteri trasformati sarebbero rilasciati nel suolo tramite il letame.

3.2.4 Interazioni tra la pianta GM e gli organismi target

Dossier completo

La modificazione genetica nel mais 59122 fornisce ai coltivatori uno strumento altamente specifico, efficiente e benefico per l'ambiente, per il controllo sicuro di coleotteri dannosi (Diabrotica spp.).

Comunque, nel contesto di questa notifica, che è per l'autorizzazione del mais 59122 per tutti gli usi nell'alimentazione umana e animale, e per tutti i prodotti trasformati (alimenti e mangimi) derivati dal mais 59122, e che quindi non riguarda la coltivazione dei semi, la probabilità che le piante di mais 59122 germoglino originando popolazioni di mais sufficienti per applicare una sufficiente pressione selettiva sulla diabrotica è irrilevante.

Osservazioni

In effetti, se si esclude la coltivazione, le possibilità di interazione tra il mais 59122 e gli organismi bersaglio, costituiti di fatto dai coleotteri, si riducono notevolmente ai soli casi di rilascio involontario nell'ambiente. Comunque, ricordiamo che un pericolo maggiore potrebbe derivare dalla presenza, anche involontaria, di semi di mais GM nelle sementi di un altro mais qualunque, le quali darebbero origine a coltivazioni con piante di mais 59122 perfettamente mimetizzate tra molte altre della medesima specie.

3.2.5 Interazioni della pianta GM con gli organismi non target

Dossier completo

Non c'è nessuna tossicità potenziale nell'interazione del mais 59122 con organismi non target derivante dalla modificazione genetica. Questo è stato confermato, grazie a diversi studi, dalla specificità delle attività biologiche delle proteine Cry34Ab1 e Cry35Ab1 e da accurate valutazioni sull'assenza di tossicità delle proteine Cry34Ab1 e Cry35Ab1 verso gli organismi non target e utili.

Nel contesto di questa notifica, che vale per l'autorizzazione del mais 59122 per tutti gli usi nell'alimentazione umana e animale, e per tutti i prodotti trasformati (alimenti e mangimi) derivati dal mais 59122, e che quindi non riguarda la coltivazione dei semi, la probabilità che l'importazione del mais 59122 possa

²³ Luna S.V., Figueroa J.M., Baltazar B.M., Gomez R.L., Townsend R., Schoper J.B. (2001). Maize pollen longevity and distance isolation requirements for effective pollen control, *Crop Sci.*, 41, 1551-1557.

²⁴ Brunet Y., Foueillassar X., Audran A., Garrigou D., Dayau S., Tardieu L. (2003) Evidence for long-range transport of viable maize pollen. In Boelt B., *Proceedings: The 1st European Conference on the Co-existence*.

²⁵ Duggan P.S., Chambers P.A., Heritage J., Forbes J.M. (2000). Survival of free DNA encoding antibiotic resistance from transgenic maize and the transformation activity of DNA in ovine saliva rumen fluid and silage effluent. *FEMS Microbiol. Lett.*, 191, 71-77.

determinare effetti negativi sugli organismi non target è irrilevante.

Osservazioni

Le interazioni della pianta GM intera con gli organismi non target, con conseguenti ed eventuali effetti negativi, non possono essere ridotte agli effetti delle sole proteine transgeniche espresse dalla pianta. Inoltre, il notificante non riporta alcun riferimento bibliografico a precisi studi sperimentali realizzati con l'obiettivo di indagare specificamente gli effetti delle proteine Cry34Ab1 e Cry35Ab1 su altrettanto definite specie di organismi non target e/o utili, potenziali bersagli involontari. La tossicità delle proteine Cry34Ab1 e Cry35Ab1 non si limita alla diabrotica, ma potrebbe coinvolgere altre specie di coleotteri, per esempio quelle di predatori integrati nei meccanismi di controllo naturale e/o ampiamente utilizzati anche nella lotta biologica²⁶.

Lo stesso notificante riporta, nel dossier tecnico e nell'allegato prodotto ai sensi del Protocollo di Cartagena, che l'esposizione delle larve dei lepidotteri *Ostrinia nubilalis* (piralide) ed *Helicoverpa zea* alle proteine Cry34Ab1 e Cry35Ab1 determina una considerevole inibizione della crescita²⁷. Noi ci limitiamo a far notare che, anche in questo caso, è altamente improbabile che tale effetto negativo si limiti alle sole specie di lepidotteri considerate dannose e non coinvolga anche altre specie dello stesso ordine.

L'esposizione degli organismi non target, potenzialmente sensibili alle tossine Cry34Ab1 e Cry35Ab1 prodotte dal mais 59122, può avvenire in seguito alla crescita o coltivazione involontaria (sementi contaminate) del mais GM. Un'altra via di impatto, in particolare per i coleotteri residenti nel suolo, potrebbe essere costituita dall'accumulo²⁸ della tossina Bt, trasferita sul terreno mediante il letame prodotto in allevamenti dove si usano mangimi a base di granella di mais 59122. A nostro avviso questa possibilità andrebbe meglio indagata.

3.2.6 Effetti sui processi biogeochimici

Dossier completo

La modificazione genetica del mais 59122 non causerà alcun possibile effetto immediato e/o ritardato sui processi biogeochimici derivanti dalle interazioni potenziali con gli organismi target e non target.

Inoltre, questa notifica non riguarda l'autorizzazione alla coltivazione dei semi del mais GM. Quindi, il rilascio nell'ambiente del mais 59122 dovrebbe essere strettamente limitato alla perdita di granella durante l'importazione, l'immagazzinamento e la trasformazione.

Osservazioni

Come abbiamo già detto le proteine Cry34Ab1 e Cry35Ab1 potrebbe arrivare al terreno con il letame e accumularsi, esplicando la propria azione tossica soprattutto a carico dei coleotteri residenti nel suolo. Non conosciamo studi specifici attinenti al destino e agli effetti delle suddette proteine nel suolo (neppure il notificante ne indica nel suo dossier). Al contrario, nella letteratura scientifica è ampiamente dimostrato che altre tossine Cry finiscono al suolo per vie diverse e lì si accumulano legandosi alle particelle argillose, mantenendo la loro attività tossica per diversi mesi^{29,30}.

²⁶ Ferrari M., Marcon E., Menta A. (1990) Lotta biologica, Edizioni Agricole, Bologna.

²⁷ Part I: Dossier tecnico - punto D.1; part III. Cartagena Protocol.

²⁸ Vedi punto 9.8.

²⁹ Saxena D., Stötzky G. (2003). Fate and effect in soil of the insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* intransgenic plants. In *Collection of biosafety reviews*, International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB), Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio, 7-83.

³⁰ Zwahlen C., Hilbeck A., Nentwig W. (2003) Degradation of Cry1Ab within *Bacillus thuringiensis* corn tissue in the field. *Molecular Ecology*, 12, 765-775.

L'eventuale modifica delle comunità di invertebrati del suolo, riflettendosi anche sulle altre popolazioni edafiche, potrebbe avere nel lungo periodo effetti pure sui cicli biogeochimici.

A nostro avviso questi argomenti non sono sufficientemente conosciuti per cui sono necessari ulteriori studi per poter sostenere "scientificamente" qualsiasi affermazione in merito.

3.2.7 Impatti delle specifiche tecniche di coltivazione, gestione e raccolta

**Dossier
completo**

Lo scopo di questa notifica non comprende l'autorizzazione per la coltivazione dei semi di mais 59122. Di conseguenza, non ci sarà nessun impatto dovuto alle tecniche di gestione e raccolta.

3.3 Piani di monitoraggio ambientale

3.3.1 Interazioni tra valutazione del rischio ambientale e monitoraggio

**Dossier
completo**

Una valutazione del rischio ambientale (ERA; Environment Risk Assessment) per questa notifica è stata effettuata in accordo con l'allegato II della direttiva 2001/18/CE e la Decisione della Commissione 2002/623/CE. Le conclusioni confermano che non ci sono effetti negativi identificati per la salute umana e animale e l'ambiente, derivanti dal prodotto descritto in questa notifica.

3.3.2 Monitoraggio della pianta GM caso-specifico

**Dossier
completo**

Il monitoraggio caso-specifico dovrebbe essere realizzato solo nei casi in cui siano stati identificati potenziali effetti negativi nell'ERA. Dalle conclusioni di questa valutazione risulta che il rischio per la salute umana e animale e l'ambiente derivante dal mais 59122 e qualsiasi prodotto derivato può essere considerato irrilevante. Di conseguenza, il piano di monitoraggio caso-specifico non è applicabile.

Osservazioni

Come abbiamo visto in precedenza, effetti indesiderati legati principalmente al trasferimento verticale dei geni potrebbero verificarsi in caso di rilascio accidentale nell'ambiente dovuto a perdite o uso improprio dei semi del mais 59122. Di conseguenza, sarebbe opportuno predisporre un piano di monitoraggio caso-specifico per controllare il rilascio involontario nei punti più critici, come per esempio i luoghi di stoccaggio e le aziende agricole in cui viene usata la granella vitale, soprattutto se inseriti in un'area di coltivazione del mais.

Inoltre, avendo ravvisato anche possibili effetti negativi a carico di alcune biocenosi residenti nel suolo, dovuti all'uso del letame prodotto da animali alimentati con mais 59122, a nostro avviso, nel piano di monitoraggio caso-specifico dovrebbe essere compreso il controllo di popolazioni di coleotteri e comunità batteriche residenti nel suolo, opportunamente scelte.

Si ricorda che, secondo quanto sostenuto da esperti dell'EFSA, il piano di monitoraggio caso-specifico deve considerare anche le situazioni di incertezza e non solo i rischi potenziali chiaramente emersi dalla valutazione dei rischi ambientali³¹.

³¹ Opinion EFSA 25, January 2006, *The EFSA Journal*, 319, 1-27.

3.3.3 Sorveglianza generale dell'impatto della pianta GM

Dossier completo	<p><i>L'applicazione di consolidate routine di pratiche di sorveglianza (esempio: il monitoraggio di cultivar agricole o prodotti per la protezione delle piante) non è necessaria per controllare il verificarsi di effetti negativi non previsti. Comunque, siccome la maggior parte del mais importato è usata per l'alimentazione animale, la sorveglianza generale può aiutare a confermare la sicurezza dell'uso, nei mangimi animali, del mais 59122 e di ogni prodotto derivato.</i></p>
Osservazioni	<p>Premesso che il piano di sorveglianza generale deve considerare anche gli effetti negativi a carico della salute umana e dell'ambiente, si evidenzia che il notificante non propone alcun piano di sorveglianza generale, ritenendolo non necessario. Invece, secondo quanto affermato dal GMO Panel dell'EFSA, un solido piano di sorveglianza generale è sempre necessario e una specifica enfasi dovrebbe essere posta sulla redazione di questionari aziendali per monitorare qualunque impatto negativo a livello di fattoria³¹.</p>