



Consiglio dei **Diritti Genetici**



Rapporto di valutazione sulla notifica EFSA-GMO-BE-2004-07



“Richiesta di commercializzazione, per uso alimentare umano e animale, per l’importazione e la trasformazione di mais GM MON86 x MON810 x NK603 resistente agli insetti e tollerante l’erbicida glifosato, ai sensi del Regolamento (CE) 1829/2003 ”

Presentata dalla Monsanto Europe S.A.

Rapporto numero: 4-2006

PREMESSA

Il 18 ottobre 2003 è stato emanato il Regolamento (CE) 1829/2003 relativo agli alimenti ed ai mangimi geneticamente modificati. Tale Regolamento, entrato in vigore il 18 Aprile 2004, istituisce procedure comunitarie per l'autorizzazione e la vigilanza di alimenti e mangimi geneticamente modificati.

In base al principio "one door, one key", le richieste di commercializzazione di alimenti e mangimi geneticamente modificati possono essere presentate ai sensi del suddetto Regolamento senza che sia necessaria un'ulteriore autorizzazione ai sensi della Direttiva 2001/18/CE.

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

Procedura Autorizzativa

Un'azienda che intende commercializzare un OGM ad uso alimentare in Europa, dovrà presentare una domanda, denominata **notifica**, 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 sia effettuabile la valutazione del rischio e i piani di monitoraggio dei possibili effetti diretti e indiretti, immediati e differiti sull'ambiente e sulla salute umana, così come indicato negli allegati tecnici della Direttiva europea sull'emissione deliberata nell'ambiente di organismi geneticamente modificati².

La documentazione viene inviata al GMO-Panel dell'EFSA, che, verificatane la conformità, ha 6 mesi di tempo per redigere un parere scientifico sulla base della documentazione presentata, *opinion*, che viene trasmessa 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 ad 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 procedura di comitato⁵.

L'articolo 29 del Regolamento (CE) 1829/2003 garantisce il diritto all'informazione del pubblico regolamentando le modalità di accesso alla documentazione: il pubblico può richiedere all'EFSA l'accesso alla documentazione completa (escluse le parti confidenziali) relativa alle notifiche che abbiano ottenuto una "valid application".

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 da parte del pubblico di eventuali osservazioni è di **30 giorni dalla data di pubblicazione dell'*opinion* da parte dell'EFSA**.

Osservatorio Agrobiotecnologie

L'Osservatorio Agrobiotecnologie, come parte del Consiglio dei Diritti Genetici⁶, associazione scientifica e culturale indipendente, intende promuovere e approfondire la partecipazione del

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

pubblico ai processi decisionali relativi ai rilasci di OGM. A tal fine, analizza le *opinion* 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 pubbliche. 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 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 ad un'attenta valutazione delle richieste di rilascio di OGM e della difficoltà di reperimento delle informazioni scientifiche relative alla valutazione del rischio degli OGM, tale 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 14 Luglio 2005, l'EFSA ha pubblicato l'*opinion* relativa all'applicazione EFSA-GMO-BE-2004-07. Tale richiesta, presentata dalla Monsanto, è per ottenere l'autorizzazione a introdurre nel mercato europeo il mais GM MON863 x MON810 x NK603, per usi nell'alimentazione umana e animale, per l'importazione e la trasformazione.

Il mais suddetto è stato ottenuto tramite incrocio tradizionale tra le linee di mais geneticamente modificate MON863, MON810 e NK603 per combinare il carattere di resistenza ad alcuni coleotteri e principalmente alla Diabrotica (dovuto al gene cry3Bb1 inserito nel genoma del mais MON863), il carattere di resistenza ad alcuni lepidotteri e principalmente alla Piralide e alla Sesamia (dovuto al gene cry1Ab inserito nel genoma del MON810) ed il carattere di tolleranza agli erbicidi a base di glifosato (dovuto al gene CP4 EPSPS inserito nel genoma del mais NK603).

Il 3 aprile l'EFSA ha pubblicato la overall opinion e si è ufficialmente aperta la consultazione pubblica.

Il pubblico ha la possibilità di inviare – **entro 30 giorni dalla data di pubblicazione dell'*opinion*** - i propri commenti, come previsto dall'Articolo 6 comma 7 del Regolamento (CE) 1829/2003.

Le eventuali osservazioni potranno essere inviate alla Commissione Europea, entro il 2 maggio 2006, all'indirizzo http://europa.eu.int/comm/food/food/biotechnology/authorisation/public_comments_en.htm.

L'Osservatorio Agrobiotecnologie del CDG ha esaminato i documenti messi a disposizione del pubblico e ritiene che:

- La documentazione fornitaci, dopo richiesta di accesso all'EFSA, risulta incompleta infatti, sebbene ci sia stato dato il dossier tecnico completo non abbiamo ricevuto la documentazione relativa alle richieste effettuate dagli Stati Membri e dal GMO Panel.
- La richiesta di commercializzazione riguarda l'ibrido di mais MON 810 x MON 863 x NK603, ottenuti tramite incrocio classico, a partire dagli eventi MON 810, NK603 e MON 863, tale ibrido può essere realizzato attraverso tre vie di incrocio distinte. A nostro avviso tale metodologia porta alla realizzazione di ibridi potenzialmente differenti, che rendono difficile la scelta di appropriate linee parentali da utilizzare per le analisi comparative
- Dalla caratterizzazione dei singoli eventi, risulta evidente che il materiale effettivamente inserito, non si limita ai geni di interesse, ma al contrario, si sono cointegrati frammenti di DNA di diversa origine plasmidiche o mitocondiali:
 - in particolare, il MON 810 potrebbe presentare delezioni e/o riarrangiamenti, come conclude il lavoro di Hernandez⁷, dove non sono in grado di amplificare il DNA genomico del mais isogenico;
 - non è stata approfondita la ricerca di eventuali integrazioni di frammenti derivanti del secondo plasmide PV-ZMGT10 utilizzato nella trasformazione del MON 810;
 - nel caso del mais MON 863, come l'EFSA stessa sostiene^{8,9}, la caratterizzazione molecolare del DNA effettivamente integrato nel genoma non è stata completata. In

7 Hernandez M, Pla M, Esteve T, Prat S, Puigdomenech P and Ferrando A. A specific real-time quantitative PCR detection system for event MON810 in maize YieldGard based on the 3'-transgene integration sequence. Transgenic Research 2003, 12, 179-89.

8 Responses to EFSA Questions of February 13, 2004 (Ref. SR/sp D(2004)0155): pag. 3

9 Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on a request from the Commission related to the safety of foods and food ingredients derived from insect-protected genetically modified maize MON 863 and MON 863 x MON 810, for which a request for placing on the market was submitted under Article 4 of the Novel Food Regulation (EC) No 258/97 by Monsanto, The EFSA Journal (2004) 50, 1-25

effetti, il notificante, a causa di difficoltà tecniche dovute alla copurificazione di DNA mitocondriale e DNA genomico, non è stato in grado di identificare il punto di inserzione nel DNA genomico della pianta.

- In conclusione i dati forniti a riguardo della caratterizzazione molecolare non consentono di escludere possibili effetti secondari non prevedibili, determinati da interazioni tra nuovi elementi genici introdotti o modificati. Riteniamo pertanto necessarie l'uso di tecnologie ad ampio spettro per disegnare il profilo di espressione (trasrittomica, proteomica, metabolomica). In assenza di tali analisi, le ulteriori valutazioni condotte sul prodotto finale (composizionali, di allergenicità e tossicità, delle performance agronomiche..) sono essenziali per escludere effetti non previsti sulla salute umana ed animale. A nostro avviso, per ridurre i potenziali rischi derivanti dall'inserzione di DNA di funzione non nota, sarebbe opportuno migliorare la selezione delle piante trasformate, selezionando quelle con il minor numero di elementi di DNA non necessari, prima di arrivare alla fase di commercializzazione del prodotto.
- Le quattro località argentine, da cui proviene il materiale usato nelle analisi, non sono rappresentative della maggior parte delle aree di produzione che esportano mais in Europa, così come poco rappresentativo è il campione di materiale usato per le analisi.
- Tuttavia, dall'analisi composizionale risulta che sono stati valutati 62 parametri chimici per un totale di 310 confronti. Il 21% dei casi, cioè 58 casi su 310, mostravano differenze statisticamente significative tra il Mais MON863 x MON810 x NK603 e gli ibridi di controllo. Per 11 parametri (carboidrati, grassi totali, metionina, ac. Stearico, ac. Oleico, ac. Linoleico, ac. Linolenico, ac. Arachidico, magnesio, niacina (*una vitamina*) e ac. Ferulico) le differenze, tra test e controlli, si mantenevano statisticamente significative in modo costante in tutti i siti esaminati. Conseguentemente, andrebbe meglio indagata l'equivalenza composizionale tra mais MON863 x MON810 x NK603 e mais tradizionale poiché questi risultati dimostrano che il quadro delle vie metaboliche del mais GM è stato in qualche modo alterato.
- Dall'analisi tossicologica emergono, in alcuni gruppi alimentati con mais MON863 x MON810 x NK603, anomalie nelle prime vie spermatiche e nella produzione di urina insieme ad alcune differenze statisticamente significative del numero di granulociti neutrofili. I risultati sopra riportati dovrebbero sollevare ragionevoli dubbi circa l'accertata sicurezza dell'uso alimentare del mais MON863 x MON810 x NK603 e consigliare ulteriori indagini.
- La presunta assenza di allergenicità del mais MON863 x MON810 X NK603 è stata giustificata solo con ragionamenti deduttivi e non valutata con prove allergiche utilizzando la pianta intera. Infine, riteniamo gli studi sui polli, riportati dal notificante, non sufficienti per poter trarre conclusioni attendibili sull'equivalenza nutrizionale del prodotto.
- La valutazione di impatto ambientale fornita dal notificante è stata condotta considerando solo i possibili effetti derivanti dall'importazione del mais MON863 x MON810 x NK603. Non sono state considerate le conseguenze che potrebbero derivare dalla disseminazione involontaria, commistione e cattivo uso delle sementi importate. Inoltre, la maggior parte delle valutazioni sui possibili effetti derivanti dall'importazione del mais transgenico MON863 x MON810 x NK603 sono state effettuate in base ai risultati ottenuti studiando i singoli eventi di trasformazione (MON 863, MON 810 e NK603) e non il mais ibrido oggetto della notifica. La valutazione di impatto ambientale fornita non risulta perciò sufficiente per individuare i possibili effetti indesiderati derivanti dall'importazione e il processamento dei semi di mais transgenico. Dovrebbero essere forniti ulteriori studi riguardanti i possibili

effetti del mais GM sugli organismi non target e sui microrganismi del suolo, con lo scopo di verificare che la trasformazione genetica delle piante non abbia effetti negativi rispettivamente sulle catene trofiche e sui cicli biogeochimici.

- I piani di sorveglianza e monitoraggio previsti non risultano sufficienti per monitorare i possibili effetti indesiderati che non sono stati considerati nella valutazione di impatto fornita dal notificante, ed inoltre, non risultano idonei per assicurare la separazione tra le filiere di produzione GM, tradizionali e biologiche.

BACKGROUND

Il 23 novembre 2004 l'EFSA ha ricevuto dall'Autorità Competente del Belgio una richiesta di autorizzazione, o applicazione, per la commercializzazione del mais GM MON863 x MON810 x NK603, per l'importazione e la trasformazione, l'uso nell'alimentazione umana ed animale, presentata dalla Monsanto ai sensi del Regolamento (CE) 1829/2003 (riferimento EFSA-GMO-BE-2004-07).

Dopo aver ricevuto la richiesta l'EFSA ha informato gli stati membri e la Commissione, ed ha pubblicato sul suo sito Web¹⁰ il riassunto del dossier.

In seguito ad appropriata analisi, l'EFSA ha considerato l'applicazione valida (14 gennaio 2005) e ha reso disponibile agli Stati Membri ed 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, fino al 14 aprile 2005, per esprimere le loro valutazioni.

Il 27 aprile 2005 il GMO Panel ha richiesto all'applicante ulteriori dati, relativi a studi esistenti su ratti alimentati per 90 giorni con mangime contenente mais GM MON863 x NK603, che gli sono stati forniti il 19 maggio 2005.

L'EFSA ha quindi pubblicato l'*opinion* relativa all'applicazione EFSA-GMO-DE-2004-03 il 14 luglio 2005.

Il 3 aprile l'EFSA ha pubblicato la overall opinion è si è ufficialmente aperta la consultazione pubblica.

Si è quindi aperta la possibilità per il pubblico di inviare – **entro 30 giorni dalla data di pubblicazione dell'*opinion*** - i propri commenti, come previsto dall'Articolo 6 comma 7 del Regolamento (CE) 1829/2003.

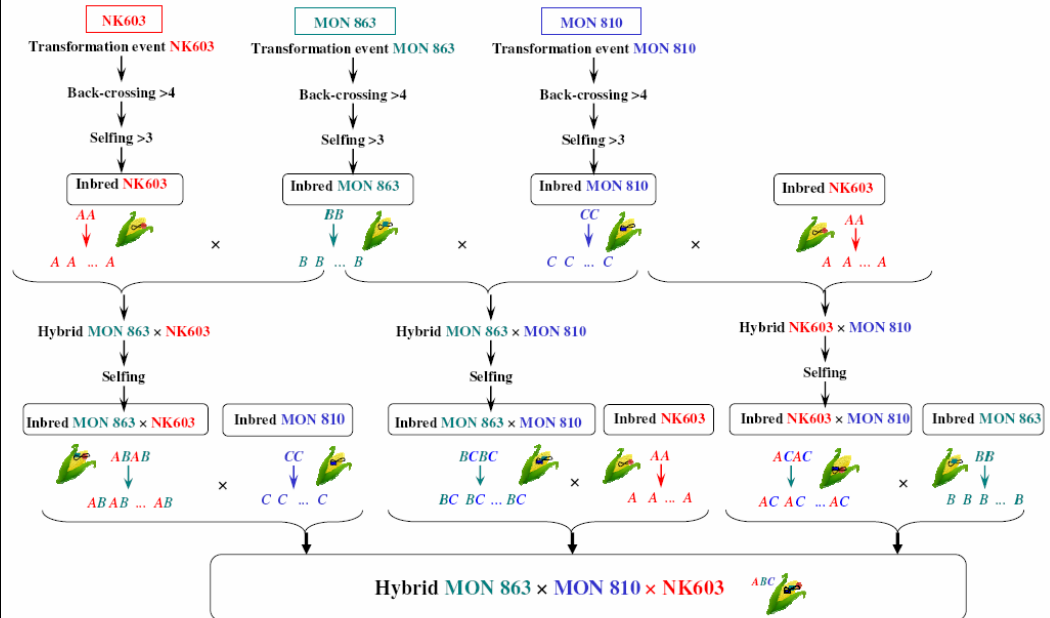
Le eventuali osservazioni potranno essere inviate alla Commissione Europea, entro il 2 maggio 2006, compilando il format predisposto dalla Commissione Europea all'indirizzo http://europa.eu.int/comm/food/food/biotechnology/authorisation/public_comments_en.htm.

¹⁰ http://www.efsa.eu.int/science/gmo/gm_ff_applications/catindex_en.html

2. Caratterizzazione molecolare

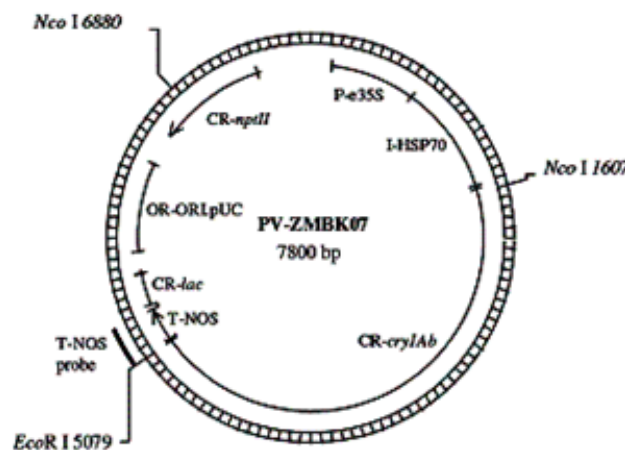
Parere EFSA

La richiesta di commercializzazione riguarda ibridi di mais MON 810 x MON 863 x NK603, ottenuti tramite incrocio classico, utilizzando linee inbred sviluppate a partire dalle linee GM MON 810, NK603 e MON 863, secondo lo schema di incrocio mostrato sotto¹¹.



MON 810

La linea di mais evento MON 810 è stata ottenuta tramite trasformazione con metodo biolistico utilizzando il plasmide PV-ZMBK07, il cui schema è riportato di seguito¹².



11 Application for authorization of MON 863 x MON 810 x NK603 maize in the European Union, according to Regulation (EC) No 1829/2003 on genetically modified food and feed. Part I Technical Dossier by Monsanto Company. Documentazione fornita dall'EFSA dopo richiesta di accesso ai sensi del regolamento (CE) n. 1049/2001 del 30 maggio 2001.

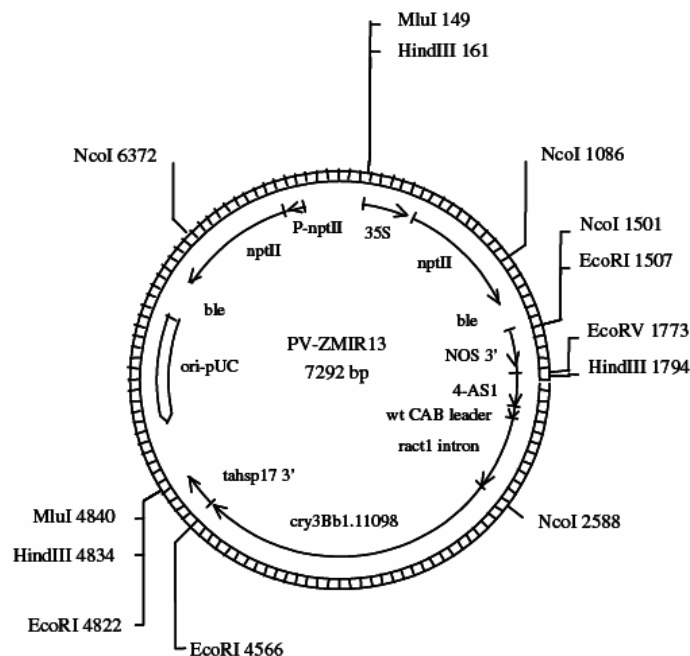
12 Confirmation of the Absence of T-NOS in MON 810 by Southern Blot Analysis MSL#: 19224 Monsanto Company. Documentazione fornita dall'EFSA dopo richiesta di accesso ai sensi del regolamento (CE) n. 1049/2001 del 30 maggio 2001.

Il plasmide, oltre alle sequenze dell'origine di replicazione ori-pUC e il gene *nptII* che conferisce resistenza agli antibiotici (kanamicina), ma non esprimibili nella pianta contiene:

- la cassetta di espressione per la sequenza codificante (ORF Open Reading Frame), ottimizzata per l'espressione nelle piante, l'endotossina CRY1Ab di *Bacillus thuringiensis*, sotto il promotore costitutivo P-e35S del gene 35S di CaMV (virus a mosaico del cavolfiore).

MON 863

La linea di mais evento MON 863 è stata ottenuta tramite trasformazione con metodo biolistico utilizzando un frammento di restrizione dopo digestione, con l'enzima *MluI*, di ca. 5000 bp del plasmide PV-ZMIR13, il cui schema è riportato di seguito¹³.



Il frammento *MluI* del plasmide contiene due cassette di espressione:

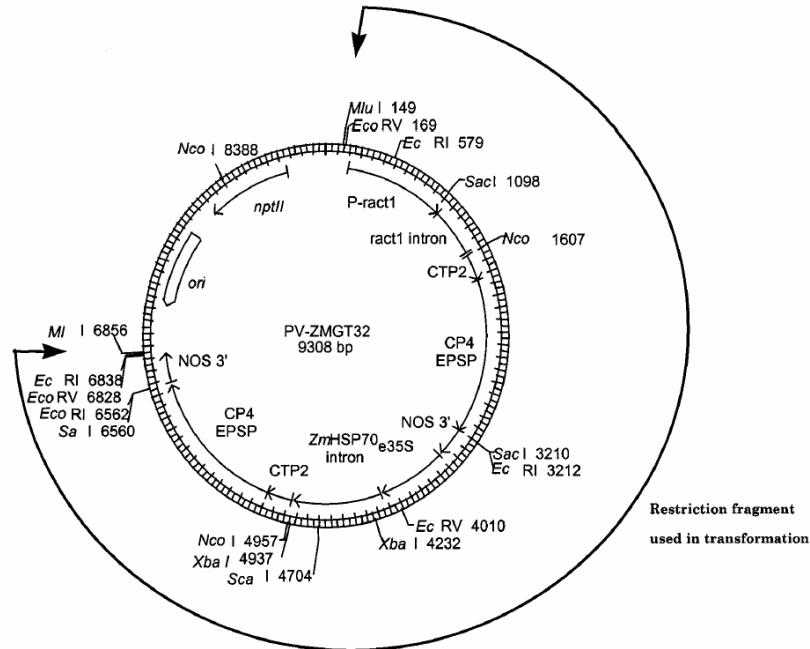
- la prima contiene la sequenza codificante (ORF Open Reading Frame), l'endotossina CRY3Bb1 di *Bacillus thuringiensis*, tossica per alcuni coleotteri e ottimizzata per l'espressione nelle piante e con alcune modificazioni nella sequenza aminoacidica che ne aumentano la tossicità verso gli insetti target, sotto il promotore costitutivo derivato dal P-e35S del gene 35S di CaMV (virus a mosaico del cavolfiore)
- la seconda contiene la sequenza codificante (ORF Open Reading Frame) del gene *nptII* che conferisce resistenza agli antibiotici aminoglicosidici (kanamicina, neomicina, paromomicina, ribostamicina, butirosina e gentamicina) di *Streptomyces hygroscopicus*, sotto il promotore costitutivo P-e35S del gene 35S di CaMV (virus a mosaico del

13 Confirmation of the Absence of T-NOS in MON 810 by Southern Blot Analysis. Monsanto Company. MSL#: 19224 Documentazione fornita dall'EFSA dopo richiesta di accesso ai sensi del regolamento (CE) n. 1049/2001 del 30 maggio 2001.

cavolfiore).

NK603

L'evento NK603 è stato trasformato utilizzando un frammento di 6,7 kB, del vettore PV-ZMGT32, mostrato di seguito¹⁴.



Il plasmide, oltre alle sequenze dell'origine di replicazione *ori-pUC* e il gene *nptII* che conferisce resistenza agli antibiotici (kanamicina), ma non esprimibili nella pianta contiene due cassette di espressione:

- la prima contenente la sequenza codificante del gene *cp4 EPSPS* di *Agrobacterium sp.* ceppo CP4 posta sotto il controllo del promotore costitutivo *P-ract1* di un gene dell'*actina* di *Oryza sativa*
- la seconda contenente la sequenza codificante del gene *cp4 EPSPS* di *Agrobacterium sp.* ceppo CP4 posta sotto il controllo del promotore costitutivo del gene 35S del CaMV (virus a mosaico del cavolfiore)

Osservazioni

Dallo schema relativo alla realizzazione dell'ibrido oggetto della notifica, si evidenzia come questi possa essere realizzato attraverso tre vie di incrocio distinte. A nostro avviso tale metodologia porta alla realizzazione di ibridi potenzialmente differenti, che rendono difficile la scelta di appropriate linee parentali da utilizzare per le analisi comparative. La documentazione fornitaci, dopo richiesta di accesso all'EFSA, risulta incompleta infatti, sebbene ci sia stato dato il dossier tecnico completo non abbiamo ricevuto la documentazione relativa alle richieste effettuate dagli Stati Membri e dal GMO Panel riguardo la notifica C/ES/00/01, presentata ai sensi della direttiva 2001/18/CE. E' bene ricordare che, relativamente all'evento NK603, la mappa del plasmide così come la tabella che descrive le dimensioni e le funzioni dei frammenti di DNA presenti nel plasmide ed effettivamente integrati nel genoma della pianta trasformata, sono state inserite nello SNIF della richiesta C/ES/00/01.

14 SNIF, Notifica C/ES/00/01. Monsanto Company.

Infine, il GMO Panel¹⁵ riporta che per la trasformazione dell'evento MON 810, sia stato impiegato il solo vettore PV-ZMBK07, mentre nella documentazione da loro stessi citata¹⁶ risulta che sia stato impiegato anche il vettore PV-ZMGT10, contenente le regioni codificanti per i geni CP4 EPSPS e gox che conferiscono tolleranza agli erbicidi a base di glifosato.

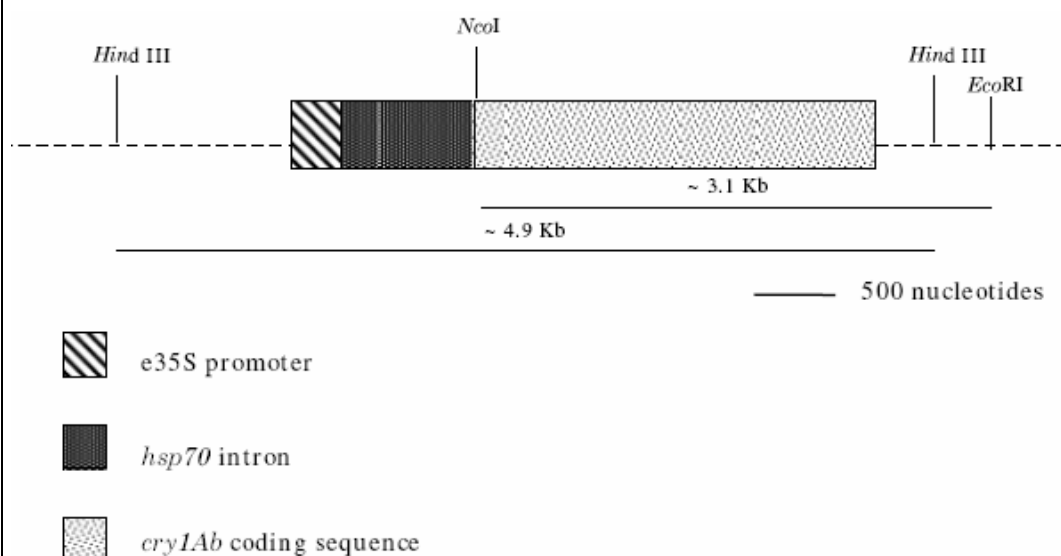
Parere EFSA

L'analisi Southern blot (SB) del DNA genomico degli ibridi di mais MON 863 × MON 810 × NK603 hanno confermato la presenza degli stessi inserti presenti nei singoli eventi GM.

Mentre, le analisi SB del DNA genomico dei singoli eventi GM hanno evidenziato in tutti gli eventi singoli la presenza di un'unica copia dell'inserto ed escluso l'inserzione di altri frammenti dei plasmidi nel genoma.

MON 810

Il frammento di DNA inserito è stato sequenziato, così come le regioni fiancheggianti il sito di inserzione. Dall'analisi di tali sequenze risulta inserito solo una parte del plasmide PV- ZMBK07 corrispondente al promotore P-35S e parte della ORF della Cry1Ab, che risulta deleta nella regione al 3' così come risulta non presente la sequenza del terminatore 3'nos. La sequenza fiancheggiante l'estremità 5' dell'inserto risulta omologa ad una porzione del gene della zeina di Zea mays, mentre la regione fiancheggiante l'estremità 3' mostra forte omologia con frammenti genici di origine mitocondriale. Una rappresentazione schematica dell'inserto è riportata nella figura seguente¹⁷.



L'EFSA fa notare che diverse questioni sollevate nel corso della valutazione del dossier anche da parte degli Stati Membri relative alla caratterizzazione molecolare dell'evento MON 810 e dell'ibrido oggetto della richiesta sono state risolte.

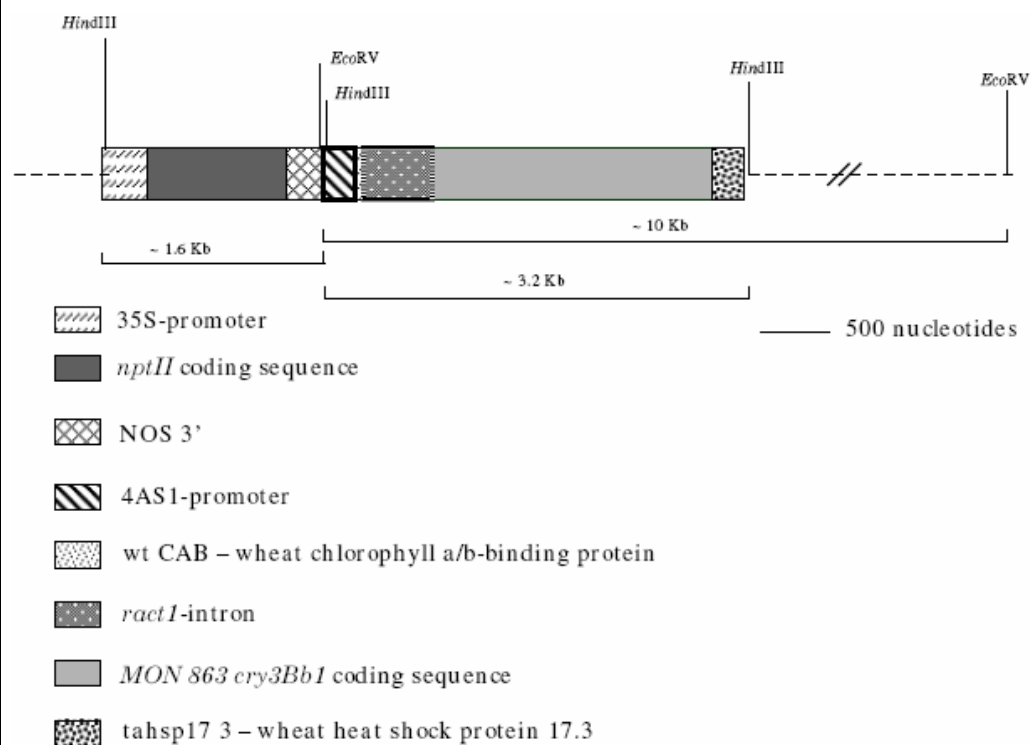
15 Parere EFSA: punto 2.2.2

16 Opinion of the Scientific Committee on Plants Regarding the Genetically Modified, Insect Resistant Maize Lines Notified by the Monsanto Company (NOTIFICATION C/F/95/12/02)

17 Application for authorization of MON 863 x MON 810 maize in the European Union, according to Regulation (EC) No 1829/2003 on genetically modified food and feed. Part I Technical Dossier by Monsanto Company. Documentazione fornita dall'EFSA dopo richiesta di accesso ai sensi del regolamento (CE) n. 1049/2001 del 30 maggio 2001

MON 863

Il frammento di DNA inserito è stato sequenziato, così come le regioni fiancheggianti il sito di inserzione. Il frammento *MluI* utilizzato per la trasformazione risulta correttamente integrato, mentre le sequenze fiancheggianti le estremità dell'inserito risultano omologhe a frammenti genici di origine mitocondriale. Una rappresentazione schematica dell'inserito è riportata nella figura seguente¹⁸.

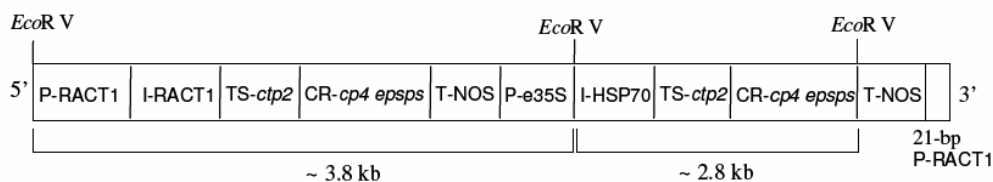
**NK603**

Il frammento di DNA inserito è stato sequenziato, così come le regioni fiancheggianti il sito di inserzione. Dall'analisi di tali sequenze il frammento utilizzato per la trasformazione risulta inserito integralmente, sono state riscontrate due mutazioni puntiformi nella sequenza codificante di uno dei geni *cp4 epsps* una delle quali determina un cambiamento aminoacidico della sequenza proteica L214P. All'estremità 3' dell'inserito è inoltre presente un frammento di 217 bp della regione enhancer del promotore del gene dell'actina di riso così come un altro piccolo frammento di DNA (305 bp) che presenta omologia con DNA di origine cloroplastica¹⁹. Una rappresentazione schematica dell'inserito è riportata nella figura seguente²⁰.

18 Application for authorization of MON 863 x MON 810 maize in the European Union, according to Regulation (EC) No 1829/2003 on genetically modified food and feed. Part I Technical Dossier by Monsanto Company. Documentazione fornita dall'EFSA dopo richiesta di accesso ai sensi del regolamento (CE) n. 1049/2001 del 30 maggio 2001

19 SNIF, Notifica C/ES/00/01. Monsanto Company.

20 Application for authorization of MON 863 x NK603 maize in the European Union, according to Regulation (EC) No 1829/2003 on genetically modified food and feed. Part I Technical Dossier by Monsanto Company. Documentazione fornita dall'EFSA dopo richiesta di accesso ai sensi del regolamento (CE) n. 1049/2001 del 30 maggio 2001.



Osservazioni

Dalla caratterizzazione molecolare dell'evento MON 810, risulta evidente che il materiale effettivamente inserito, non si limita ai geni di interesse, ma al contrario, si sono cointegrati frammenti di DNA di diversa origine mitocondriale²¹. Inoltre, non è possibile escludere che a livello del genoma della pianta ospite non si siano verificate delezioni e/o riarrangiamenti, come conclude il lavoro di Hernandez et al. 2003²², dove si dimostra che i primers selezionati in base alle sequenze delle regioni adiacenti al sito di inserzione di MON810 non sono in grado di amplificare il DNA genomico del mais isogenico.

Dalla documentazione fornitaci non risulta che si sia approfondita la ricerca di eventuali integrazioni di frammenti derivanti dal plasmide PV-ZMGT10, utilizzato nella trasformazione del MON 810, come invece il Comitato Scientifico delle Piante raccomandava nella sua valutazione²³.

Nel caso del mais MON 863, come l'EFSA stessa sostiene²⁴, la caratterizzazione molecolare del DNA effettivamente integrato nel genoma non è stata completata. In effetti, il notificante, a causa di difficoltà tecniche dovute alla copurificazione di DNA mitocondriale e DNA genomico, non è stato in grado di stabilire l'esatto punto di inserzione nel DNA genomico della pianta. A nostro avviso tali difficoltà tecniche sono facilmente superabili, attraverso opportuni sub-clonaggi del DNA genomico del mais evento MON 863. Senza le informazioni sulla reale dimensione e natura delle sequenze mitocondriali cointegrate non è possibile verificare la presenza di eventuali nuove ORF effettivamente integrate.

La caratterizzazione molecolare dell'evento NK603, risulta effettuata con accuratezza e l'inserito risulta integro, eccetto per due mutazioni puntiformi, tuttavia viene rilavata l'inserzione di frammenti di DNA non desiderati alle estremità dell'inserito, uno dei quali mostra omologia di sequenza con geni di origine cloroplastica²⁵.

Dall'analisi della documentazione fornitaci dall'EFSA ed in particolare dei documenti relativi alle risposte fornite dal notificante alle richieste di integrazione sia degli Stati Membri che dell'EFSA, si ha l'impressione che il notificante limiti le proprie risposte al minimo. Per esempio, i SB presentati nei nuovi documenti relativi al MON 810²⁶ e all'ibrido MON 810 x MON 863²⁷, sono stati effettuati digerendo il DNA genomico con un unico enzima di restrizione (*HindIII*), che generalmente non può essere ritenuto sufficiente in quanto eventuali frammenti di DNA troppo piccoli o troppo grandi potrebbero non essere evidenziabili. I dati molecolari pur incompleti suggeriscono comunque la possibilità che si siano

21 Assessment Report of the Robert Koch Institut in according with Directive 2001/18/EC: punto 3.2.2

22 Hernandez M, Pla M, Esteve T, Prat S, Puigdomenech P and Ferrando A. A specific real-time quantitative PCR detection system for event MON810 in maize YieldGard based on the 3'-transgene integration sequence. *Transgenic Research* 2003, 12, 179-89.

23 Opinion of the Scientific Committee on Plants Regarding the Genetically Modified, Insect Resistant Maize Lines Notified by the Monsanto Company (NOTIFICATION C/F/95/12/02): punto 6.1.3

24 Responses to EFSA Questions of February 13, 2004 (Ref. SR/sp D(2004)0155): pag. 3

25 SNIF, Notifica C/ES/00/01. Monsanto Company.

26 Confirmation of the Absence of T-NOS in MON 810 by Southern Blot Analysis. Monsanto Company. MSL#: 19224

27 Additional Confirmation of the Molecular Identity of Corn Hybrid MON 810 x MON 863 by Southern Blot Analysis. Monsanto Company. MSL#: 19226

verificati delezioni e/o riarrangiamenti del DNA genomico della pianta nella regione adiacente al sito di inserzione.

In conclusione i dati forniti a riguardo della caratterizzazione molecolare non consentono di escludere possibili effetti secondari non prevedibili, determinati da interazioni tra nuovi elementi genici introdotti o modificati. Riteniamo pertanto necessarie l'uso di tecnologie ad ampio spettro per disegnare il profilo di espressione (trasritmica, proteomica, metabolomica). In assenza di tali analisi, le ulteriori valutazioni condotte sul prodotto finale (composizionali, di allergicità e tossicità, delle performance agronomiche..) sono essenziali per escludere effetti non previsti sulla salute umana ed animale. A nostro avviso, per ridurre i potenziali rischi derivanti dall'inserzione di DNA di funzione non nota, sarebbe opportuno migliorare la selezione delle piante trasformate, selezionando quelle con il minor numero di elementi di DNA non necessari, prima di arrivare alla fase di commercializzazione del prodotto. Quest'ultima è una raccomandazione di carattere generale, dato che in quasi tutti gli eventi di mais GM, destinati alla commercializzazione e ottenuti tramite la tecnica biolistica, risultano cointegrati frammenti di DNA di diversa origine e dimensione.

Parere EFSA	<i>I livelli di espressione delle proteine CRY1Ab, CRY3Bb1, CP4 EPSP e NPTII, sono stati saggiati in diversi tessuti delle piante, tramite ELISA confrontando i livelli di espressione tra l'ibrido MON 810 x MON 863 x NK603 e i singoli eventi MON 810, NK603 e MON 863. I livelli di espressione delle proteine analizzate risultano equivalenti nell'ibrido e negli eventi singoli.</i>
Osservazioni	Come ci si sarebbe atteso i livelli di espressione delle proteine analizzate nell'ibrido risultano equivalenti a quelli verificati nei singoli eventi. Per tal motivo si confermano le nostre preoccupazioni espresse a riguardo dei risultati riportati relativamente all'ibrido MON 810 x MON 863 ²⁸ . Non avendo accesso ai dati originali, in quanto confidenziali, ci riserviamo dei dubbi in merito alla qualità e affidabilità di tali dati.
Parere EFSA	<i>La stabilità del materiale inserito è stata analizzata sia a livello fenotipico che genetico per diverse generazioni, senza evidenziare alcuna instabilità.</i>
Osservazioni	Le analisi relative all'aspetto della stabilità risultano condotte accuratamente.

3. Analisi Comparativa

3.2.1 valutazione dei singoli eventi

Parere EFSA	<i>Nell'analisi composizionale sono emerse differenze, piccole ma statisticamente significative, del contenuto di acido palmitico nel mais MON863, e del contenuto di acido stearico nel mais NK603 rispetto ai relativi mais non GM di controllo. Comunque, il Panel conclude che, nel primo caso, tali differenze non hanno nessun significato biologico poiché ricadono nel più ampio intervallo di variazione relativo alla specie, mentre, nel secondo caso, il mais NK603 ha la stessa composizione delle linee di confronto.</i>
--------------------	---

²⁸ Rapporto di valutazione della Notifica EFSA-GMO-DE-2004-03. Consiglio dei diritti genetici. Rapporto 2-2005

Osservazioni	Le variazioni statisticamente significative delle concentrazioni di acido palmitico e di acido stearico potrebbero essere un indizio che qualcosa di importante possa essersi modificato, rispettivamente, nel metabolismo del mais MON863 e del mais NK603. Le conclusioni del Panel non sono adeguatamente supportate da sufficienti evidenze scientifiche, per cui sarebbero opportuni ulteriori studi di approfondimento.
--------------	---

3.2.2 Scelta del controllo e produzione del materiale per l'analisi composizionale

Parere EFSA	<i>Le analisi composizionali sono state fatte su foraggio e granella ottenute in campi di prova realizzati in quattro località in due regioni geograficamente differenti dell'Argentina, durante la stagione di crescita 2002-2003. Il Panel considera che tali siti siano rappresentativi delle aree di produzione che esportano mais in Europa. Inoltre il Panel accetta che i dati per l'analisi comparativa siano stati ottenuti durante una sola stagione, poiché le linee parentali sono state valutate per diverse stagioni.</i>
Osservazioni	Si fa notare che sulla base di quanto riportato dalla Monsanto nel dossier tecnico, il materiale per l'analisi composizionale è stato prodotto, durante una sola stagione, in 4 piccolissimi campi sperimentali, costituiti da poche file di mais, in 2 località dell'Argentina definite rappresentative solo delle regioni argentine in cui il mais è coltivato per scopi commerciali. Non si capisce sulla base di quali evidenze scientifiche il Panel considera che "tali siti siano rappresentativi delle aree di produzione che esportano mais in Europa" e, quindi, non solo argentine.

3.2.3 Analisi Composizionale

Parere EFSA	<i>I dati composizionali ottenuti da granella e foraggio di mais MON863 x MON810 x NK603 sono stati confrontati con quelli ottenuti dal mais di controllo e da linee commerciali di riferimento. Alcune differenze statisticamente significative sono state osservate nei confronti tra la granella prodotta dal mais MON863 x MON810 x NK603 e quella di controllo. Comunque, tali differenze non erano costanti nei diversi siti di prova. Differenze costanti sono state osservate solo per il contenuto di acido oleico, acido linoleico e niacina. Il Panel considera i cambiamenti composizionali nel mais MON863 x MON810 x NK603 piccoli e non significativi dal punto di vista biologico. Inoltre considera improbabile che queste differenze possano causare effetti negativi sulla salute umana e animale.</i>
Osservazioni	Dall'esame del dossier tecnico allegato alla notifica risulta che il materiale (granella e foraggio) su cui sono state eseguite le analisi è stato raccolto in piccoli campi sperimentali realizzati nella stagione 2002-2003 in 4 località comprese in 2 regioni argentine. Oltre al mais MON863 x MON810 x NK603 nella comparazione erano compresi le sue linee parentali GM, una varietà non GM con background genetico simile, l'ibrido DKC-46-26, e altri 13 ibridi commerciali non GM. Sono stati valutati 62 parametri chimici per un totale di 310 confronti. Il 21% dei casi, cioè 58 casi su 310, mostravano differenze statisticamente significative. Per 11 parametri (carboidrati, grassi totali, metionina, ac. Stearico, ac. Oleico, ac. Linoleico, ac. Linolenico, ac. Arachidico, magnesio, niacina (una vitamina) e ac.

Ferulico) le differenze, tra test e controlli, si mantenevano statisticamente significative in modo costante in tutti i siti esaminati.

3.2.4 Trattati Agronomici e fenotipo GM²⁹

Parere EFSA | *Le piante sono state valutate per le loro caratteristiche agronomiche e per il loro fenotipo. Le analisi hanno riguardato la caratterizzazione del vigore dei semi e le caratteristiche fisiologiche/riproduttive della pianta, come ad esempio: l'altezza, la resa, la fioritura e l'impollinazione. Le piante testate non hanno evidenziato nessuna deviazione delle caratteristiche analizzate.*

Osservazioni | Nel dossier tecnico presentato dalla Monsanto vengono riportati i risultati inerenti le prove condotte per testare solo gli ibridi trasformati con i singoli eventi, ovvero i mais MON 863, MON 810 e NK603. Il notificante, facendo riferimento ai singoli ibridi GM, afferma che non essendoci differenze significative nelle caratteristiche agronomiche tra questi e i corrispettivi isogenici, presume che anche nell'ibrido di mais MON863 x MON810 x NK603 non siano prevedibili cambiamenti di comportamento rispetto alle piante isogeniche. Inoltre, dal titolo della referenza citata in notifica (Carringer et al., 2004³⁰), in cui dovrebbero essere presenti gli studi condotti per testare le caratteristiche agronomiche e il fenotipo del mais MON863 x MON810 x NK603, sembra che la caratterizzazione abbia riguardato solo gli ibridi transgenici MON863 x MON810 e MON863 x NK603. Infatti, nella documentazione fornita, non vengono citati o riportato studi condotti per testare le caratteristiche agronomiche e fenotipiche del mais MON863 x MON810 x NK603. Inoltre, l'unico studio citato è stato inserito nella parte del dossier considerata confidenziale, tale da non permettere una valutazione a riguardo. La possibilità del notificante, di rendere o meno confidenziali, le informazioni che potrebbe essere utili per un'analisi indipendente delle notifica, è un aspetto che dovrebbe essere trattato in modo più attento dall'autorità competente. L'osservatorio, reputa che le informazioni riguardanti le performance agronomiche non debbano rientrare nella parte del dossier considerata confidenziale, visto che la loro pubblicazione non può essere tale da poter nuocere all'azienda notificante. Inoltre, sebbene lo scopo della notifica non includa la coltivazione, tali ibridi di mais GM non sono mai stati testati nelle condizioni climatiche europee. Quindi, le informazioni riguardanti gli studi sulle performance agronomiche del mais MON863 x MON810 x NK603 non possono essere considerate sufficienti per effettuare un'analisi approfondita del rischio, derivante dall'importazione di tale mais.

3.3 Conclusione

Parere EFSA | *Sulla base dell'analisi composizionale comparata e delle prove agronomiche si conclude che il mais MON863 x MON810 x NK603 è composizionalmente e fenotipicamente equivalente alle sue linee parentali GM a singolo tratto e al mais non GM, escluso le caratteristiche introdotte.*

29 Parere EFSA: 3.2.4. p 10.

30Carringer, R.D., Marcinkiewicz, B.R. and Schottel, S. (2004) Collection of plant tissue and grain samples from test corn hybrids containing MON 810 x MON 863 and MON 863 x NK603, parental controls, and references in a 2002- 2003 Argentina field production. Monsanto Technical Report, MSL 18567.

Osservazioni	<p>Le conclusioni dell'EFSA sembrano sottovalutare le differenze riportate nell'analisi composizionale comparata tra mais MON863 x MON810 x NK603 e gli ibridi di controllo. Si ritengono quindi necessari studi epidemiologici su popolazioni campione selezionate, anche per verificare se le variazioni riscontrate possano generare, nel medio e lungo termine, effetti inintenzionali sui consumatori.</p> <p>Infine bisogna sottolineare che il Panel non ha considerato neanche nelle conclusioni la richiesta degli stati membri di ulteriori analisi composizionali ed agronomiche su dati provenienti da zone geografiche e stagioni di crescita diverse³¹.</p>
--------------	--

4. Valutazione della sicurezza per l'uso alimentare umano ed animale

4.2 Valutazione dei dati scientifici rilevanti

4.2.1 Valutazione dei singoli eventi

Parere EFSA	<i>I risultati di studi condotti su roditori alimentati, per 90 giorni, con mangime a base di mais MON863 non indicano effetti negativi sulla salute, di conseguenza il Panel conclude che non ci sono preoccupazioni sulla sua sicurezza.</i>
--------------------	--

Osservazioni	<p>In aprile 2004, l'EFSA rilasciò la sua opinione³² favorevole, relativa alla notifica C/DE/02/9, presentata ai sensi della direttiva 2001/18/CE, per l'uso del mais GM MON863 nell'alimentazione umana. Invece, le Autorità nazionali di alcuni stati membri, in particolare della Francia, espressero una opinione contraria evidenziando, nelle osservazioni inviate alla Commissione, che gli studi tossicologici riportavano diverse e preoccupanti patologie nei ratti alimentati con mangime contenente il mais MON863.</p> <p>In effetti, come denunciato pubblicamente dal quotidiano inglese "The Independent", i risultati degli studi tossicologici, allegati al dossier tecnico come documenti confidenziali, mostravano una serie di effetti negativi sui ratti alimentati con mais MON863. Ad esempio: il numero dei globuli bianchi dei ratti test era statisticamente differente da quello dei ratti nutriti con mais tradizionale di controllo. Risultarono fuori norma anche altri parametri ematici (glicemia, numero di granulociti, ecc...) e delle urine. Anomalo risultò anche il peso e la struttura dei reni, mentre fegato stomaco e retto mostravano evidenti lesioni.</p>
--------------	--

4.2.4 Analisi Tossicologica

4.2.4.3 Valutazione tossicologica dell'intero alimento

Parere EFSA	<p><i>La sicurezza del prodotto intero derivato da granella di mais MON863 x MON810 x NK603 è stata valutata su ratti con studi di tossicità orale della durata di 90 giorni.</i></p> <p><i>Tre gruppi di ratti (20 animali/sexo/gruppo) sono stati nutriti, ad libitum per 90 giorni, con una dieta contenente il 33% di mais. Il gruppo di controllo ha ricevuto</i></p>
--------------------	--

31 Parere EFSA: 3.1 p 9

32 The EFSA Journal (2004) 49, 1-25

una dieta contenente il 33% del mais di controllo non GM, mentre i due gruppi test hanno ricevuto diete contenenti il 33% di mais transgenico oppure l'11% di mais transgenico integrato con il 22% di mais di controllo.

Le analisi hanno registrato alcune differenze significative tra i gruppi test ed i controlli:

- Il numero medio dei granulociti neutrofili risultava significativamente più alto nel sangue delle femmine del gruppo alimentato con dieta all'11% di mais transgenico*
- Il volume delle urine era più basso nei maschi di ambedue i gruppi test*
- Pesi degli epididimi più alti sono stati osservati nei maschi del gruppo alimentato con dieta all'11% di mais transgenico*

Il Panel considera le sopracitate differenze irrilevanti e giudica sicuro l'uso del mais MON863 x MON810 x NK603 nell'alimentazione umana e animale.

Osservazioni

I granulociti neutrofili sono un sottogruppo dei globuli bianchi e come tali partecipano ai meccanismi di difesa cellulare, quindi, un loro incremento potrebbe essere un indizio di infiammazioni in corso. L'epididimo invece è il primo tratto delle vie spermatiche le cui anomalie potrebbero influenzare negativamente la riproduzione animale. Considerando quanto appena detto, i risultati esposti nel punto precedente dovrebbero far sorgere qualche preoccupazione ("scientificamente legittima") circa i potenziali rischi sanitari legati al consumo di mais MON863 x MON810 x NK603, soprattutto nel lungo periodo.

Infine, si fa presente che studi tossicologici su effetti sub-letali andrebbero effettuati anche su animali, come i polli, i suini ed i bovini nella cui dieta entra massicciamente il mais e che presentano sistemi digerenti fisiologicamente molto diversificati tra di loro e rispetto ai ratti, appartenendo a gruppi o classi differenti.

4.2.5 Allergenicità

4.2.5.2 Valutazione dell'allergenicità dell'intera pianta

Parere EFSA

Un altro problema è che le caratteristiche allergeniche dell'intera coltura possono essere incrementate come effetto indesiderato dell'inserzione casuale del transgene nel genoma della pianta ospite, per esempio attraverso la modificazione qualitativa e quantitativa dei modelli di espressione delle proteine endogene. Tali effetti indesiderati possono verificarsi per ogni modificazione genetica (ad esempio durante la modificazione genetica del MON863, del MON810 e dell'NK603) ma anche nella pianta con i tre tratti transgenici derivante dall'incrocio tra MON863, MON810 ed NK603. Comunque, questo problema al Panel appare non rilevante poiché il mais non è considerato comunemente un alimento allergenico.

Osservazioni

Se per "modificazione qualitativa del modello di espressione proteica" si intende la possibile presenza di proteine nuove (diverse da quelle espresse dai transgeni) o comunque mutate rispetto al quadro proteico del mais convenzionale, non si capisce come si possa escludere l'allergenicità potenziale del mais GM MON863 x MON810 x NK603, solo sulla base del fatto che il mais convenzionale non sia comunemente considerato un alimento allergenico. 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 per incrocio di linee

parentali geneticamente modificate con tecniche di biologia molecolare, come raccomandato anche dagli stati membri³³, sarebbe opportuno eseguire prove allergiche più estese, usando anche il prodotto intero.

4.2.6 Valutazione nutrizionale di food/feed GM

Parere EFSA	<p><i>Le caratteristiche nutrizionali del MON863 x MON810 x NK603 sono state valutate per mezzo di studi di alimentazione con Polli da carne.</i></p> <p><i>Più precisamente, gruppi composti ognuno da 100 polli, suddivisi in sottogruppi, hanno ricevuto (per 24 giorni³⁴) diete contenenti il 55-60% di granella dei seguenti ibridi: mais MON863 x MON810 x NK603, ibrido di controllo non GM (DKC46-26) e 5 ibridi commerciali non transgenici di riferimento.</i></p> <p><i>Differenze statisticamente significative sono risultate per i pesi delle parti edibili, petto e ali, tra gli animali alimentati con diete contenenti mais MON863 x MON810 x NK603 e quelli alimentati con mais di controllo non GM (DKC46-26). Tali differenze sono piccole e non osservate nel confronto tra il gruppo test e quelli alimentati con diete contenenti granella degli ibridi di riferimento.</i></p>
Osservazioni	<p>Il Panel conclude che gli studi sui polli erano adeguati per stabilire l'equivalenza nutrizionale e considera che le proprietà nutrizionali del mais MON863 x MON810 x NK603 non dovrebbero essere differenti da quelle del mais tradizionale³⁵.</p> <p>Come risulta dal dossier tecnico la dieta è stata somministrata ai gruppi di polli solo per 24 giorni, mentre l'osservazione si è protratta per 43-44 giorni. A nostro avviso, gli studi di alimentazione sugli animali devono avere una durata che copra un intervallo maggiore del periodo di crescita dell'animale. Inoltre, per una più corretta valutazione nutrizionale, gli studi andrebbero condotti anche con altri animali come ad esempio alcuni ruminanti (mucche da latte e vitelli da carne) ed i suini poiché sono i principali destinatari di mangimi a base di granella o insilati di mais ed hanno sistemi digerenti molto diversi tra di loro e rispetto agli uccelli. Per quanto detto, riteniamo gli studi sui polli riportati dal notificante non sufficienti per poter trarre conclusioni attendibili sull'equivalenza nutrizionale del prodotto.</p>

4.2.7 Post market monitoring di food/feed GM

Parere EFSA	<p><i>Il mais MON863 x MON810 x NK603 è, dal punto di vista nutrizionale, equivalente al mais convenzionale e sarà usato come ogni altro mais. Il Panel è dell'opinione che il monitoraggio post market non sia necessario.</i></p>
Osservazioni	<p>Come sottolineato in precedenza, il mais MON863 x MON810 x NK603 mostra diverse differenze statisticamente significative nell'analisi composizionale, alcuni effetti tossicologici sub-letali e la valutazione nutrizionale è inadeguata. Per tutti questi motivi riteniamo che il monitoraggio post market sarebbe necessario al fine di individuare precocemente l'insorgenza di eventuali effetti negativi sulla salute dei consumatori di prodotti contenenti il mais GM suddetto.</p>

33 Parere EFSA: 4. 1 p 11

34 Dossier tecnico pag 75, applicazione EFSA_GMO_BE_2004_07

35 Parere EFSA: 4.3 p 16

5. Valutazione dei rischi ambientali e piani di monitoraggio³⁶

5.1. Questioni sollevate dagli stati membri (ST)³⁷

ST

Gli stati membri hanno sollevato questioni relative:

- *agli impatti derivanti dal rilascio accidentale e agli effetti delle proteine CRY sulle specie non target;*
- *sulla necessità di ulteriori informazioni riguardanti le conseguenze che le tossine presenti nel mais MON863 x MON810 x NK603 e derivanti dai prodotti di scarto della lavorazione potrebbero avere sul suolo e sulle acque;*
- *sulla necessità di piani di sorveglianza e monitoraggio più dettagliati.*

5.2. Valutazione dei principali dati scientifici³⁸

5.2.1. Valutazione dei singoli eventi³⁹

Parere EFSA

MON 863 e MON 810

Il mais MON 863 è stato valutato in base allo scopo della notifica che concerne la sola importazione, mentre il mais MON 810 aveva già precedentemente ricevuto una valutazione in base sia alla richiesta di importazione che di coltivazione.

Il gruppo di esperti dell'EFSA ha considerato la possibilità che i prodotti genici, in particolare le proteine CRY, possano entrare nell'ambiente del tratto gastrointestinale degli animali e la possibilità del trasferimento genetico orizzontale (TGO) dei geni cry. I dati forniti dal notificante e quelli presenti in letteratura, suggeriscono che la maggior parte delle proteine vengono degradate dall'attività enzimatica presente nel tratto intestinale. La parte residuale presente nelle feci viene invece degradata dai microrganismi del suolo. L'esposizione degli organismi non target alla proteine CRY risulta perciò limitata.

NK 603

La notifica approvata C/ES/00/01 a cui l'EFSA fa riferimento per effettuare la valutazione di impatto del mais MON863 x MON810 x NK603 è stata approvata per la sola importazione del mais NK603. Non sono perciò necessarie ulteriori informazioni sui possibili impatti che potrebbero derivare dalla coltivazione del mais NK603. Il gruppo di esperti dell'EFSA ritiene che la valutazione di impatto ambientale fornita dal notificante sia in accordo con gli usi che si intende perseguire con tale autorizzazione e, che, l'importazione e l'utilizzo del mais NK603 non possa condurre ad effetti avversi diversi da quelli che potrebbe derivare dall'utilizzo di ibridi di mais convenzionale.

Osservazioni

I principali dati scientifici a cui il gruppo di esperti dell'EFSA dovrebbe fare riferimento nel formulare la propria opinione, visto lo scopo della notifica, dovrebbero riguardare il mais ibrido MON863 x MON810 x NK603 e non i dati ottenuti dai singoli ibridi GM. Infatti, le analisi composizionali dei macro e micronutrienti mostrano che sono presenti alcune differenze significative tra: i mais GM con un singolo evento di trasformazione, il mais MON863 x MON810 x NK603 e i rispettivi controlli isogenici, differenze che potrebbero condurre ad una valutazione di impatto diversa rispetto a quella che si potrebbe ottenere

36 Parere EFSA: 5. p 16.

37 Parere EFSA: 5.1. p 16.

38 Parere EFSA: 5.2. p 16.

39 Parere EFSA: 5.2.1. p 16.

considerando solo i singoli eventi di trasformazione.

5.2.2. Valutazione del rischio ambientale⁴⁰

5.2.2.1 Effetti potenziali della modificazione genetica sulla fitness delle piante GM⁴¹

Parere EFSA	<p><i>Il mais è una pianta altamente domesticata che generalmente non è in grado di sopravvivere negli ambienti non coltivati. Essa ha perso la capacità di rilasciare i semi ed, inoltre, non sono presenti in Europa piante selvatiche compatibili. Il flusso genico verticale attraverso il polline è limitato alle colture vicine. Le caratteristiche di sopravvivenza, moltiplicazione e disseminazione del mais MON863 x MON810 x NK603 non sono state alterate se non nel caso della presenza degli specifici insetti target o dello specifico erbicida. Il gruppo di esperti dell'EFSA è quindi dell'opinione che gli effetti ambientali non previsti, derivanti dall'importazione del mais MON 863 x MON 810 x NK603 non siano diversi da quelli che potrebbero derivare dall'utilizzo degli ibridi MON 863, MON 810, NK603 e tradizionali.</i></p>
Osservazioni	<p>La modificazione genetica apportata alle piante di mais GM, tenuto in conto anche dello scopo della notifica, non dovrebbe essere tale da condurre ad effetti indesiderati derivanti da un aumento di adattabilità ambientale degli ibridi GM. Infatti, viste le caratteristiche agronomiche del mais la sola resistenza ad alcune specie di Lepidotteri e Coleotteri e, la tolleranza all'erbicida glifosato non può essere considerata una condizione tale da poter creare un vantaggio selettivo, nel caso in cui vi fosse disseminazione involontaria dei semi al di fuori dei campi coltivati. Nel caso in cui la dispersione dei semi avvenga all'interno delle aree coltivate, l'inavvertita presenza di piante di mais GM, tolleranti all'erbicida glifosato potrebbe condurre ad una maggior difficoltà nella gestione delle infestanti solo nel caso in cui si utilizzi tale erbicida. Comunque, l'osservatorio è in disaccordo con le considerazioni attraverso cui il gruppo di esperti dell'EFSA giunge alle proprie conclusioni. Infatti, esistono prove di formazione di ibridi a livello intergenerico tra <i>Zea mays</i> e <i>Triticum aestivum</i> (Riera-Lizarazu & Mujeeb-Khazi, 1990⁴²; Suenaga & Nakajima, 1993⁴³). Inoltre, diversi studi presenti in bibliografia riportano che il flusso genico verticale attraverso il polline non è limitato solo alle colture vicine ma può estendersi fino a distanze notevoli. In uno studio di Jones e Brooks del 1950⁴⁴ viene riportato che la percentuale di ibridazione media era ancora l'1,6% a 200 metri di distanza dal campo di mais emittente e si manteneva allo 0,2% a 500 metri di distanza. Inoltre, in particolari condizioni climatiche il polline vitale di mais può essere trasportato, attraverso correnti d'aria di alta quota (800-2000 metri di quota), a considerevoli distanze per cadere al suolo anche a dozzine di Km dalla sorgente (Brunet Y., 2003⁴⁵). Ad esempio, gli autori di uno studio condotto sulla vitalità del polline e l'efficienza delle distanze di isolamento, hanno stimato in 32 Km la distanza percorribile dal</p>

40 Parere EFSA: 5.2.2. p 17.

41 Parere EFSA: 5.2.2.1. p 17.

42 Riera-Lizarazu O., Mujeeb-Kazi A. (1990) Maize (*Zea mays* L.) mediated wheat (*Triticum aestivum* L.) polyploid production using various crossing methods. *Cereal Res. Commun.*, 18: 339-345.

43 Suenaga K., Nakajima K. (1993) Efficient production of haploid wheat (*Triticum aestivum*) through crosses between Japanese wheat and maize (*Zea mays*). *Plant Cell Reports*, 8: 263-266.

44 Jones, J.M., and J.S. Brooks. 1950. "Effectiveness and distance of border rows in preventing outcrossing in corn", *Oklahoma Agric. Exp. Sta. Tech. Bull. No. T-38*.

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

polline vitale di mais nel suo tempo di vita valutato 2 ore, in considerazione della velocità media del vento che realmente si verifica durante la fioritura nell'area di studio, la quale era priva di qualsiasi barriera anche naturale (Luna V. S. et al., 2001⁴⁶). In base a queste considerazioni e all'impossibilità di consultare gli studi riguardanti le performance agronomiche del mais ibrido MON863 x MON810 x NK603 (Carringer et al., 2004) non è comunque possibile affermare con certezza la possibile assenza di effetti indesiderati, derivanti da un aumento della fitness, in seguito alla modificazione genetica.

5.2.2.2. Rischi derivati dal trasferimento genetico⁴⁷

Parere EFSA

Un prerequisito per il trasferimento genetico è la disponibilità di vie in grado di trasferire il materiale genetico, DNA nel caso di trasferimento genetico orizzontale e polline in caso di trasferimento genetico verticale che può avvenire in seguito ad impollinazione incrociata tra piante sessualmente compatibili.

Nell'ambiente naturale, l'esposizione dei microrganismi al DNA delle piante GM, può avvenire in seguito alla degradazione dei residui colturali lasciati dopo il raccolto.

Il DNA transgenico è una componente degli alimenti derivati dal mais GM, per cui, i microrganismi del tratto digestivo degli uomini e degli animali, possono essere esposti al DNA transgenico.

Il polline transgenico è disperso e distribuito dalle piante GM coltivate o dalle piante risultanti dalla inavvertita presenza di semi di mais GM in partite di mais convenzionale. Un altro mezzo con cui il mais GM potrebbe essere propagato è dovuto alla disseminazione involontaria di semi di mais durante il trasporto.

(a) Trasferimento genetico dalle piante ai batteri⁴⁸

Il trasferimento genetico tra piante e batteri in condizioni naturali, allo stato attuale delle conoscenze, è estremamente improbabile e potrebbe capitare solo attraverso la ricombinazione omologa dei microrganismi.

I geni cry3Bb1, NptII, cry1Ab e cp4 espressi nel mais MON863 x MON810 x NK603 sono stati posti sotto il controllo di promotori eucariotici che mostrano limitata (nessuna) attività nei procarioti. Inoltre, i geni presenti nel mais MON863 x MON810 x NK603 sono ampiamente presenti in natura. In base a queste considerazioni e alla mancanza di pressione selettiva nel tratto intestinale, la probabilità che il trasferimento genetico orizzontale possa conferire vantaggio selettivo o incrementare la fitness è molto limitata. Per questo, è molto improbabile che il DNA transgenico possa stabilirsi nel genoma dei microrganismi presenti nell'ambiente e nel tratto digerente dell'uomo e degli animali. Nell'improbabile eventualità che il TGO possa avvenire non sono comunque prevedibili effetti avversi sull'ambiente e sulla salute umana ed animale dato che non verrebbero introdotti nuovi geni nelle comunità microbiche specifiche.

Le linee di mais MON863 contengono il gene integro nptII codificante la resistenza agli antibiotici aminoglicosidici ed utilizzato come marker per la selezione delle piante trasformate. Il gruppo di esperti dell'EFSA ha recentemente espresso il proprio parere sull'utilizzo dei geni di resistenza agli antibiotici nelle piante GM ed ha concluso che l'utilizzo dei geni nptII come marker per la selezione delle piante

46 S. Luna V., J. Figueroa M., B. Baltazar M., R. Gomez L., R. Townsend and J. B. Schoper "Maize Pollen Longevity and Distance Isolation Requirements for Effective Pollen Control", crop Sci., Sep 2001; 41: 1551 – 1557.

47 Parere EFSA: 5.2.2.2. p 17.

48 Parere EFSA: 5.2.2.2. (a) p 18.

trasformate non pone un rischi per l'ambiente e per la salute umana ed animale. Queste conclusioni sono basate sul limitato uso degli antibiotici kanamicina e neomicina nel settore medico e veterinario, l'elevata diffusione di tale geni nei batteri presenti in natura e il basso rischio di trasferimento genetico tra pianta e batteri.

(b) Trasferimento genetico da pianta a pianta⁴⁹

L'impollinazione incrociata tra colture tradizionali e transgeniche dipende esclusivamente dalla probabilità che avvenga il rilascio accidentale o l'inavvertita presenza di semi transgenici in partite convenzionali.

Per il mais, il trasferimento genetico da pianta a pianta è limitato alle altre piante d mais, visto che, non esistono in Europa specie selvatiche compatibili.

Come mostrato nelle diverse prove sperimentali, non ci sono indicazioni che facciano dedurre un aumento della capacità competitiva delle piante GM di mais, in comparazione a quelle convenzionali con lo stesso background.

La protezione verso le specie infestanti di Coleotteri e Lepidotteri non fornisce alle piante di mais un vantaggio selettivo, visto che la sopravvivenza di tali piante, è limitata dall'assenza di dormienza dei semi, dalla suscettibilità ai funghi patogeni e dalle basse temperature. I semi che potrebbero svernare nelle zone europee a clima temperato non sarebbero perciò in grado di originare comunità di piante selvatiche.

Gli studi condotti in Europa e nel mondo per testare il mais NK603 hanno mostrato che la tolleranza all'erbicida non costituisce un carattere in grado di aumentare la fitness delle piante, eccetto nella presenza dell'erbicida specifico.

Osservazioni

(a) Trasferimento genetico tra piante e batteri

I geni cry presenti negli ibridi di mais GM non possono considerarsi omologhi a quelli naturalmente espressi dai batteri da cui sono stati isolati. Come è infatti mostrato nella documentazione fornita dal notificante, tali geni sono stati modificati in laboratorio per consentire alla pianta di esprimere le proteine CRY in una forma che sia direttamente attiva verso gli organismi bersaglio. Invece, in natura, la proteina CRY è una pretossina che per esplicare la sua funzione necessita di essere attivata dagli enzimi del tratto digerente degli insetti.

Inoltre, i possibili effetti derivanti dal possibile TGO dei geni cry alle comunità microbiche e, la stabilità del transgene, rimangono tuttora oggetto di studio. Comunque, è stato ampiamente dimostrato che la tossina Bt può accumularsi nel suolo mantenendo la sua attività per diversi mesi (Saxena and Stotzky, 2003⁵⁰; Zwahlen et al, 2003⁵¹). Altri studi hanno inoltre riportato la persistenza del DNA nel suolo (Ceccherini et al. 2003⁵²; Nielsen et al. 2002⁵³), in ambiente acquatico (Paul et al., 1989⁵⁴), nel tratto digerente dei topi (Schubbert et al., 1997⁵⁵) e sebbene in minor proporzione anche in quello dei ruminanti (Duggan et al.,

49 Parere EFSA: 5.2.2.2. (b) p 18.

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

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

52 Ceccherini M.T., Poté J., Kay E., Van V.T., Maréchal J., Pietramellara G., Nannipieri P., Vogel T.M., and Simonet P. (2003). "Degradation and Transformability of DNA from Transgenic Leaves". Applied and Environmental Microbiology, Jan., pp: 673-678.

53 Nielsen K.M., Choi M., Pietramellara G., Nannipieri P., Bensasson D. (2002). Advances in Microbial Ecology 17.

54 Paul, W.J., Jeffrey, W.H., David, A.W., De Flaun, M.F. and Cazares, L.H. (1989). Turnover of extracellular DNA in eutrophic and oligotrophic freshwater environments of Southwest Florida. Appl. Environ. Microbiol. 55, 1823-1828.

55 Schubbert, R., Renz, D., Schmitz, B. and Doerfler, W. (1997) Foreign (M13) DNA ingested by mice reaches peripheral leukocytes, spleen, and liver via the intestinal wall mucosa and can be covalently linked to mouse DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 961-966.

2000⁵⁶; Gay, 2001⁵⁷). Oltre al trasferimento genetico orizzontale che può avvenire tra i microrganismi del suolo e le piante, studi riportano la possibilità che questo possa avvenire anche tra la microflora batterica che popola l'intestino umano e quello degli animali (Landis et al., 2000⁵⁸; Jarvis et al., 2001⁵⁹; Nielsen et al., 2002⁶⁰).

In base a queste considerazioni, il rischio che il DNA presente negli alimenti o derivante dai residui della lavorazione, possa essere trasferito alle comunità microbiche, sia del suolo che dell'organismo umano ed animale, non è da sottovalutare. Per cui, dovrebbero essere condotti studi più approfonditi, per assicurare che l'utilizzo di questi alimenti non conduca ad effetti indesiderati non previsti nella valutazione del rischio effettuata dal notificante.

Inoltre, la possibile diffusione nelle comunità microbiche del gene nptII presente nel mais MON 863 e nell'ibrido MON863 x MON810 x NK603 in seguito a TGO, potrebbe diminuire l'efficacia dei trattamenti agli antibiotici aminoglicosidici come neomicina e gentamicina che sono ancora utilizzati nel campo veterinario e medico in diversi paesi europei.

(b) Trasferimento genico da pianta a pianta

Considerando quanto detto al punto 5.2.2.1, non si può escludere la possibilità di trasferimento genetico tra gli ibridi di mais GM e le corrispettive specie compatibili. Visto lo scopo della notifica, tale evenienza potrebbe verificarsi in seguito al cattivo uso delle sementi o al rilascio accidentale o inavvertita presenza di semi transgenici in partite convenzionali, con conseguente rischio per le colture tradizionali e biologiche.

5.2.2.3. Rischi potenziali sugli organismi non target⁶¹

Parere EFSA

I prodotti genici, in particolare le proteine CRY, possono entrare nell'ambiente o nel tratto gastrointestinale degli animali attraverso il trasferimento genetico orizzontale o come parte dei residui della produzione industriale. I dati forniti dal notificante e quelli presenti in letteratura suggeriscono che la maggior parte di queste proteine sono denaturate dagli enzimi del tratto gastrointestinale, per cui, solo piccole quantità possono essere disperse attraverso le feci. La quantità di proteina CRY distribuita nell'ambiente attraverso i soli sottoprodotti della lavorazione industriale è perciò limitata, riducendo così i possibili rischi per gli organismi non target.

56 Duggan, P.S., Chambers, P.A., Heritage, J. and 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.

57 Gay, P. (2001) The biosafety of antibiotic resistance markers in plant transformation and the dissemination of genes through horizontal gene flow. In Safety of Genetically Engineered Crops (Custers, R., ed.). Zwijnaarde, Belgium: Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology, pp. 135–159.

58 Landis, W.G., Lenart, L.A. and Spromberg, J.A. (2000) Dynamics of horizontal gene transfer and the ecological risk assessment of genetically engineered organisms. Hum. Ecol. Risk Assess. 6, 875–899.

59 Jarvis G.N., Kurtovic A., Kay A.G. and Russel J.B. (2001). The physiological and genetic diversity of bovine streptococcus bovis strains. FEMS Microbial Ecology 35: 49-56.

60 Nielsen K.M., Choi M., Pietramellara G., Nannipieri P., Bensasson D. (2002). Advances in Microbial Ecology 17

61 Parere EFSA: 5.2.2.3. p 19.

Osservazioni	<p>I meccanismi di trasferimento genetico orizzontale sia verso i microrganismi del suolo che quelli della microflora intestinale degli animali e, i meccanismi d'azione delle proteine CRY, allo stato attuale delle conoscenze non sono ancora stati del tutto chiariti⁶². Il DNA transgenico derivato dai sottoprodotti della lavorazione, una volta distribuiti nell'ambiente potrebbe condurre ad effetti sugli organismi non target, in particolare ai microrganismi del suolo, che non sono stati tenuti in debito conto nella valutazione del rischio. Non essendo stato possibile stimare dalla documentazione fornita dal notificante le quantità e la destinazione dei sottoprodotti della lavorazione e considerando lo stato attuale delle conoscenze dei possibili effetti sugli organismi non target non è comunque possibile fare una stima di tale rischio.</p> <p>Nella documentazione fornita dal notificante non sono riportati studi specifici sui possibili effetti verso gli organismi non target. Il notificante nel concludere che non vi siano effetti sugli organismi non target, fa riferimento ai soli patogeni non target che attaccano il mais, verso i quali le piante GM non mostrerebbero nessuna differenza significativa rispetto alle corrispettive piante isogeniche.</p> <p>Una corretta valutazione del rischio dovrebbe essere mirata all'individuazione di specie chiave rappresentative delle comunità di appartenenza e degli ambienti in cui l'OGM potrebbe essere rilasciato, in modo da consentire il monitoraggio dei possibili effetti negativi sulle specie non target e quindi sulle catene trofiche. Ad esempio, non è stato condotto nessun tipo di studio sui possibili effetti dell'ibrido di mais transgenico sull'artropodofauna utile e sui microrganismi del suolo.</p> <p>L'analisi sui possibili rischi potenziali verso gli organismi non target condotta dal notificante non può perciò essere considerata sufficiente.</p>
--------------	---

5.2.3. Piani di sorveglianza e monitoraggio⁶³

Parere EFSA	<p><i>Gli obiettivi dei piani di monitoraggio sono:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>verificare se le questioni sollevate nella valutazione di impatto ambientale, riguardanti l'avvento di potenziali effetti avversi derivanti dall'OGM o dal suo utilizzo, siano corrette;</i> - <i>identificare i possibili effetti sulla salute e sull'ambiente che non sono stati anticipati nella valutazione di impatto ambientale.</i> <p><i>Lo scopo dei piani di monitoraggio previsti dal notificante sono in accordo con gli usi che si intendono perseguire nella richiesta di autorizzazione che non include la coltivazione. Dato che il mais MON863 x MON810 x NK603 sarà destinato principalmente ad uso animale, il notificante ha proposto che i piani di sorveglianza generale debbano concentrarsi sul monitoraggio dei possibili effetti sulla salute animale e di tale filiera alimentare. Il gruppo di esperti dell'EFSA è in accordo con questo tipo di approccio.</i></p>
Osservazioni	<p>L'importazione e il processamento degli ibridi di mais GM, come descritto nei punti precedenti potrebbe rappresentare un rischio sia per la filiera dei prodotti destinati all'alimentazione animale sia per quelli destinati all'alimentazione umana. I piani di sorveglianza generale dovrebbero perciò essere rivolti non solo alla filiera zootecnica, ma ad entrambe le filiere di produzione.</p>

62 Griffiths J.S., Haslam S.M., Yang T., Garczynski S.F., Mulloy B., Morris H., Cremer P.S., Dell A., Adang M.J., Aroian R.V. (2005) "Glycolipids as receptors for Bacillus thuringiensis crystal toxin", Science, Feb. vol 307 pp. 922-925.

63 Parere EFSA: 5.2.3. p 19.

Non risulta chiaro chi dovrebbero essere i responsabili per fornire agli operatori del settore tutte le informazioni per un corretto utilizzo dei prodotti GM, fondamentale per evitare la commistione, il rilascio accidentale e il cattivo uso delle sementi importate. Inoltre, non viene specificato chi avrà la responsabilità nel caso in cui si verificassero dei possibili effetti indesiderati e quali saranno gli organi predisposti e coinvolti nel piano di sorveglianza generale.

Il piano di sorveglianza generale dovrebbe perciò fornire una descrizione dettagliata:

- dei siti di ingresso e delle modalità di trasporto e stoccaggio del materiale grezzo;

- delle regole su come evitare la commistione, disseminazione involontaria e il cattivo uso delle sementi GM importate e lavorate, da destinare agli operatori del settore;

- degli organi coinvolti nel piano di sorveglianza e sulle specifiche responsabilità.

Il piano di sorveglianza generale così come riportato nella notifica, non risulta sufficiente per monitorare i possibili effetti indesiderati che non sono stati considerati nella valutazione di impatto fornita dal notificante.

5.3. Conclusioni⁶⁴

Parere EFSA

Il mais MON 863 x MON 810 x NK603 è stato valutato a riguardo della sola importazione, non sono quindi necessarie ulteriori informazioni sugli effetti ambientali associati alla coltivazione. Il gruppo di esperti dell'EFSA è quindi d'accordo nell'affermare che i possibili effetti ambientali derivanti dall'importazione e il processamento del mais transgenico non siano diversi da quelli del mais tradizionale.

I piani di monitoraggio forniti dal notificante risultano in accordo con gli usi previsti dallo scopo della notifica in oggetto.

Osservazioni

La valutazione di impatto ambientale fornita dal notificante è stata condotta considerando solo i possibili effetti derivanti dall'importazione del mais MON863 x MON810 x NK603. Non sono state considerate le conseguenze che potrebbero derivare dalla disseminazione involontaria, commistione e cattivo uso delle sementi importate. Inoltre, la maggior parte della valutazione sui possibili effetti derivanti dall'importazione del mais transgenico MON863 x MON810 x NK603 sono state effettuate in base ai risultati ottenuti studiando i singoli eventi di trasformazione (MON 863, MON 810 e NK603) e non il mais ibrido oggetto della notifica.

La valutazione di impatto ambientale fornita non risulta perciò sufficiente per individuare i possibili effetti indesiderati derivanti dall'importazione e il processamento dei semi di mais transgenico.

Dovrebbero essere forniti ulteriori studi riguardanti i possibili effetti del mais GM sugli organismi non target e sui microrganismi del suolo, con lo scopo di verificare che la trasformazione genetica delle piante non abbia effetti negativi rispettivamente sulle catene trofiche e sui cicli biogeochimici.

I piani di sorveglianza e monitoraggio previsti non risultano sufficienti per monitorare i possibili effetti indesiderati che non sono stati considerati nella valutazione di impatto fornita dal notificante, ed inoltre, non risultano idonei per assicurare la separazione tra le filiere di produzione GM, tradizionali e biologiche.

⁶⁴ Parere EFSA: 5.3. p 19.