Ministero della Salute
DGISAN
0012841-P-02/04/2013
1.6.b.d/11

Ministero della Salute

DIPARTIMENTO DELLA SANITA' PUBBLICA VETERINARIA, DELLA SICUREZZA ALIMENTARE E DEGLI ORGANI COLLEGIALI PER LA TUTELA DELLA SALUTE
DIREZIONE GENERALE PER L'IGIENE E LA SICUREZZA DEGLI ALIMENTI E LA NUTRIZIONE
Ufficio 17 ex DGSAN – Igiene delle tecnologie alimentari
Viale Giorgio Ribotta, 5 - 00144 Roma

DGSAN-6/
Risposta al Foglio del .....
N. .....

Alla Rappresentanza permanente
d'Italia presso l'Unione Europea
Rue de Marteau 9
B1000 Brussels

Oggetto: Nota Ministro Balduzzi relativa alla procedura di cui all'art.34 del regolamento CE 1829/2003 per quanto attiene il mais GM MON810.

In relazione all'argomento in oggetto si prega codesta Rappresentanza di voler trasmettere la nota del Ministro Balduzzi ed il relativo documento allegato alla Commissione Europea.

IL DIRETTORE GENERALE
(Dott. Silvio Borrello)

EC

Il Ministro della Salute

29 MAR. 2013

Gentile Ms. André,

è pervenuto dal Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali un dossier predisposto dal Consiglio per la ricerca e la sperimentazione in agricoltura contenente informazioni e valutazioni relative al *mais* geneticamente modificato MON810, che desta talune gravi preoccupazioni per le implicazioni inerenti alla sua coltivazione.

Riguardo a tale tipologia di *mais*, la cui immissione in commercio è stata consentita con decisione della Commissione 98/294/CE del 22 aprile 1998, è stata presentata una richiesta per il rinnovo dell'autorizzazione che ne include l'uso come alimento e mangime, compreso l'utilizzo dei semi per la coltivazione. Nonostante il parere favorevole espresso il 15 giugno 2009 dall'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA), l'*iter* di rinnovo non si è ancora concluso, di conseguenza il predetto mais può permanere sul mercato.

Ai sensi dell'articolo 34 del regolamento del Parlamento europeo e del Consiglio del 22 settembre 2003, n. 1829/2003, nel trasmettere l'accluso dossier, rappresento la necessità che venga effettuata una nuova valutazione completa del prodotto stesso, alla luce delle nuove linee guida sulla valutazione del rischio ambientale delle piante geneticamente modificate adottate dall'EFSA nel 2010. Nel contempo, chiedo che vengano definite adeguate misure di gestione da rendere obbligatorie per tutti gli utilizzatori di tale OGM, valutando altresì l'opportunità di sospendere l'autorizzazione alla messa in coltura di sementi di *mais* MON810 nei Paesi dell'Unione europea.

In attesa di conoscere le determinazioni che saranno adottate al riguardo, l'occasione mi è gradita per inviare i miei migliori saluti, con viva cordialità!

Renato Balduzzi

Ms. Dorothée André
DG Health and Consumers (SANCO)
Commissione Europea
Rue Froissart 101
1040 Bruxelles

NOTA DELLE AUTORITÀ ITALIANE ALLA COMMISSIONE EUROPEA

DG SANCO

Oggetto: Misure d'urgenza concernenti la coltivazione di sementi di mais geneticamente modificato MON810, ai sensi dell'articolo 34 del regolamento n. 1829/2003/CE.

Il germoplasma maidicolo italiano

In Italia, il mais rappresenta una coltura primaria, con circa un milione di ettari coltivati, e rappresenta circa il 10% della superficie agricola nazionale. Il germoplasma di mais reperibile in Italia è certamente uno dei più ampi, sia per apporti originali sia per differenziazione locale di forme. Se ragioni geografiche e storiche favorirono l'introduzione di molteplici forme nel nostro Paese, le innumerevoli situazioni pedoclimatiche che lo caratterizzano e le distinte modalità di coltura hanno dato luogo ad un complesso imponente di varietà locali, con il concorso dei più vari meccanismi genetici atti ad assicurare l'adattamento ai nuovi ambienti. La rapida e ampia diffusione degli ibridi di mais - avvenuta a partire dagli anni cinquanta - ha portato alla quasi completa scomparsa per sostituzione delle preesistenti varietà locali, facendo del mais sostanzialmente una "*commodity*" la cui produzione intensiva è concentrata nell'area Padana.

Tuttavia, tale prezioso patrimonio genetico oggi riceve grande considerazione e valorizzazione ad opera di programmi nazionali e regionali volti alla conservazione della biodiversità genetica delle piante agrarie, oltre a costituire su specifici territori, la base genetica per la identificazione di filiere di qualità (Quaderni della Ricerca della Regione Lombardia, 2002 – Mais in Lombardia: varietà tradizionali). Alcune Regioni hanno attivato azioni di conservazione, tutela e riconoscimento, come la Regione Lazio, con l'attività svolta da ARSIAL in applicazione della LR 15/2000. Banche di germoplasma dedicate conservano tale biodiversità, tra le più significative delle quali si può citare quella del CRA-Unità di ricerca per la maiscoltura di Bergamo, dove sono conservati e caratterizzati oltre 600 campioni di popolazioni locali, il cui mantenimento ricade nelle attività del progetto nazionale Risorse Genetiche Vegetali del Ministero delle politiche agricole, alimentari e forestali, in ottemperanza alle disposizioni Europee relativamente al Trattato Internazionale FAO per la conservazione delle risorse genetiche in agricoltura (URL: www.planttreaty.org)

In tema di conoscenza dei parametri principali per garantire una corretta coesistenza in termini di colture convenzionali, biologiche e OGM, il mais è stato oggetto di alcuni studi in ambito nazionale, che si avvalgono di modellistiche specifiche per la misurazione del movimento del polline e conseguente flusso genico tra piante OGM e non, e tra la pianta OGM e l'ambiente. Gli studi risalgono all'intervallo temporale 2005-2008, e vertono – ove sia stato possibile – sull'evento MON810. In particolare si fa riferimento al progetto "OGM in agricoltura" finanziato dal Mipaaf e coordinato da INRAN conclusosi il 30/06/2008, ed allo studio relativo al comportamento del polline "Indagine sulle dinamiche di diffusione del polline tra coltivazioni contigue di mais nel contesto padano" (Della Porta et al., 2006). **Entrambi gli studi sono antecedenti al periodo che deve essere preso in esame dal presente documento, e vengono citati come pregresso.**

Nel presente documento vengono discussi in dettaglio aspetti di particolare interesse emersi dalla bibliografia recente, in particolare relativi alla presenza e persistenza della tossina Cry1Ab nell'ambiente, ed ai suoi effetti nei confronti di organismi non-target. Oltre alle argomentazioni scientifiche citate, si fa riferimento in particolare a due corposi documenti prodotti dalla Swiss National Science Foundation, pubblicati nel 2012, che rappresentano in questo contesto la documentazione più aggiornata in termini di risultati analizzati e bibliografia esaminata (FNSNF 3495, 3499).

Il mais geneticamente modificato MON810

L'unico evento di mais GM permesso in Europa è il mais MON810. Questo mais esprime resistenza all'attacco di insetti fitofagi quali la ECB (European Corn Borer; *Ostrinia nubilalis*), mediante espressione endogena della proteina Bt nella forma Cry 1Ab (originata da *Bacillus turingensis*).

Nel territorio dell'Unione europea, la coltivazione del mais MON810, è aumentato di oltre il 25% (23.297 ettari) nel 2011 fino a raggiungere 114.490 ettari, rispetto ai 91.193 ettari nel 2010. Il mais geneticamente modificato MON 810 è coltivato in 6 Paesi dell'UE: Spagna, Portogallo, Repubblica Ceca, Polonia, Slovacchia e Romania. La Spagna si è confermata quale più grande produttore UE del mais Bt, con un aumento del 28%, mentre il Portogallo e la Repubblica Ceca hanno registrato un aumento delle superfici coltivate. Dal 2010, 6 Paesi Ue: Francia, Germania, Austria, Grecia, Ungheria e Lussemburgo hanno temporaneamente sospeso la coltivazione del mais Bt MON810, sulla base della "clausola di salvaguardia" (Dati da: *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2011*", dell'ISAAA *(International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications)*.

In accordo ai documenti EFSA del 2010 (EFSA 2010), l'introduzione di una OGM deve tenere in completa considerazione le caratteristiche dell'ambiente ricevente, relativamente a tre componenti principali: la pianta GM (caratteristiche intrinseche), l'area geografica nella quale si intende coltivare la pianta GM (suolo, clima, irrigazione, altre colture etc.), e il sistema colturale impiegato. Le misure di gestione necessarie per la protezione dell'ambiente nel caso specifico del MON8010, sono esplicitate in **Allegato 2** al presente documento.

Autorizzazioni per il rilascio del MON810

L'immissione in commercio del mais geneticamente modificato MON810 è stata approvata con Decisione della Commissione n. 294 del 22 aprile 1998, ai sensi della direttiva 90/220/CEE sull'emissione deliberata nell'ambiente di organismi geneticamente modificati, e ai sensi del regolamento 258/97 del Parlamento europeo e del Consiglio del 27 gennaio 1997 sui nuovi prodotti e i nuovi ingredienti alimentari.

Monsanto Europa ha notificato il mais MON810 nel luglio 2004, come un prodotto esistente che poteva continuare ad essere immesso sul mercato a norma degli articoli 8 e 20 del regolamento 2003/1829/CE. L'iscrizione di questo mais nel registro comunitario degli alimenti e dei mangimi geneticamente modificati consente di mantenere il suo utilizzo per alimenti e mangimi nonché la messa in coltura delle sue sementi nel territorio dell'Unione europea, anche se le richieste di rinnovo di tali autorizzazioni, depositate per le diverse utilizzazioni del mais MON810 in aprile e maggio 2007, non hanno avuto determinazioni al riguardo.

La richiesta di rinnovo dell'autorizzazione per il mais MON810 è stata oggetto di un parere dell'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA) del 15 giugno 2009 (EFSA, 2009), adottato sulla base delle vecchie linee guida per la valutazione ambientale degli OGM risalente al 2006 (EFSA, 2006). Infatti, la valutazione del MON810 pubblicata nel 2009 non poteva essere effettuata secondo le nuove linee guida pubblicate dall'EFSA nel 2010. Queste, inoltre, sono ancora oggetto di discussione in seno al Comitato permanente per la catena alimentare e la salute degli animali, nella prospettiva della loro adozione da parte della Commissione.

Tuttavia, un nuovo parere della stessa Agenzia dell'8 dicembre 2011 relativo al mais Bt11, trasferibile anche al MON810, mettono in discussione le precedenti conclusioni. A differenza delle precedenti conclusioni sul Bt11 o sul MON810, l'EFSA, nel suo nuovo parere, emesso sulla base delle nuove linee guida per la valutazione pubblicate nel 2010, sottolinea l'esistenza di rischi ambientali associati alla coltivazione di tali OGM. Nello specifico, nel suddetto parere, l'EFSA mette in evidenza:

- la comparsa di resistenze alla tossina Cry1Ab in popolazioni di lepidotteri bersaglio, cosa che induce l'adozione di tecniche di controllo dei parassiti (ad esempio, insetticidi) con un impatto ambientale più elevato,

- riduzione delle popolazioni di alcune specie di lepidotteri sensibili non- bersaglio quando sono esposte al polline di mais Bt11 o MON810 Bt11 depositato sulle loro piante ospiti.

Questi nuovi dati scientifici, riportati nelle pubblicazioni scientifiche posteriori al parere dell'EFSA del 15 giugno 2009, sono illustrati in modo dettagliato nell'**Allegato 1** e relativa bibliografia in **Allegato 3**.

Inoltre, il nuovo parere dell'EFSA sul Bt11, che non può essere considerato una rivalutazione completa del mais MON810 (anche al di là del fatto che alcuni aspetti quali gli effetti sub-letali non sono affrontati) nella misura in cui si concentra principalmente sugli impatti su organismi non bersaglio e sullo sviluppo di resistenza da parte dei parassiti senza considerare l'insieme degli elementi necessari ad una valutazione completa dei rischi, raccomanda l'attuazione delle seguenti misure di gestione:

- la realizzazione di zone di rifugio pari al 20% della superficie interessata dal mais Bt, comprese le parcelle di superficie inferiore a 5 ettari quando il raggruppamento di parcelle rappresenta più di 5 ettari di mais Bt, al fine di ritardare l'insorgenza di resistenze alla tossina Cry1Ab nei lepidotteri bersaglio;

- l'adozione di misure di mitigazione del rischio appropriate per limitare l'esposizione delle larve di lepidotteri non bersaglio, quali la creazione di fasce di bordo a mais non geneticamente modificato o di distanze di isolamento;

- l'assenza di coltivazioni di mais Bt11 entro 20 m dall'habitat di specie di lepidotteri protetti la cui sensibilità alla tossina Cry1Ab non è nota, in modo da minimizzare l'esposizione e quindi il rischio per le larve di queste popolazioni di lepidotteri;

- il rafforzamento del piano di monitoraggio specifico proposto dal notificante, al fine di evidenziare un'evoluzione delle resistenze, in particolare nelle aree "a rischio", considerando altri parassiti del mais;

- il rafforzamento del piano di monitoraggio generale proposto dal notificante, secondo le nuove linee guida dell'EFSA in materia di monitoraggio ambientale delle piante geneticamente modificate (EFSA, 2011b).

L'insieme delle misure di gestione proposte, che rivela l'importanza dei rischi per l'ambiente, come anche le misure di controllo raccomandate dall'EFSA si trovano integralmente in **Allegato 2** al presente documento.

Tuttavia, nessuna misura di gestione della coltura di mais MON810 volta a limitare i rischi per l'ambiente e identificata dalle conclusioni dell'EFSA dell'8 dicembre 2011, è imposta dalla decisione di autorizzazione 98/294/CEE deliberata ai sensi della abrogata direttiva 90/220/CEE, il cui rinnovo è ancora in corso di esame.

Le misure di gestione e piani volontari di monitoraggio proposti dalla Monsanto e parzialmente attuati, sono chiaramente incompleti rispetto alle raccomandazioni formulate dall'EFSA, e quindi insufficienti per preservare l'ambiente.

Tenendo conto del fatto che nuova documentazione scientifica è disponibile, relativamente alla presenza di problematiche di natura ambientale poste dalla coltivazione del mais MON810, non correttamente affrontate nella loro interezza, si ritiene che qualsiasi autorizzazione debba essere dipendente da misure atte a ridefinire l'effetto della coltivazione del mais MON810 sull'ambiente.

Pertanto, si chiede alla Commissione di avviare senza indugio le seguenti azioni:

- effettuare una nuova valutazione completa del MON810 alla luce delle nuove linee guida;
- definire adeguate misure di gestione che dovrebbero essere rese obbligatorie per tutti gli utilizzatori di tale OGM;
- nel frattempo, sospendere urgentemente l'autorizzazione alla messa in coltura di sementi di mais MON810 in Italia e nel resto dell'Unione Europea a norma dell'articolo 34 del regolamento (CE) 1829/2003.

Allegato 1 – Rassegna delle evidenze scientifiche posteriori al 2009 sugli impatti della coltivazione del mais MON810, con particolare esame degli effetti su organismi non bersaglio e sulla persistenza della tossina Bt nell'ambiente.

I-Rischi identificati

I.1-Diffusione e persistenza della tossina Cry1Ab nel suolo e nell'acqua

I-1.a Diffusione della tossina

Elementi del parere di HCB del 22 dicembre 2009

Le piante che hanno un gene *cry* liberano tossine nel suolo attraverso l'essudazione radicale, il loro polline e i loro residui (Saxena e Stotzky, 2000). Tuttavia, i quantitativi di proteine *Cry* disseminate a partire da piante transgeniche sono molto variabili. Per esempio, si possono citare due studi sul cotone che stimano, in un caso (Sims e Ream, 1997) circa 1 kg la quantità di tossina Cry rilasciata per ettaro di coltura, pari a circa 1,6 mg / kg di terreno e, nell'altro (stima pubblicata nel Biopesticide Registration Action Document,) circa 3,6 g la quantità di tossina Cry percolata per ettaro, pari a circa 1,6 µg / kg di suolo. Esiste pertanto un fattore 1000 di differenza tra le due stime mentre entrambe le relazioni si basano sulla presenza di 150 000 piante per ettaro, il che è probabilmente dovuto ad una diversa valutazione della percentuale di piante raccolte e della profondità del suolo considerata (7 cm contro 15 cm).

Nel caso del mais MON810, su una massa di circa 100 tonnellate di mais per ettaro, il BRAD stima che potrebbero essere diffusi 465 g di tossina Cry1Ab per ettaro di mais, pari a circa 208 microgrammi di Cry1Ab per kg suolo.

Pubblicazioni scientifiche posteriori

Lo studio condotto da Tank et al. (2010) negli Stati Uniti mostra che frammenti di mais possono essere dispersi dai corsi d'acqua e che la tossina Cry1Ab potrebbe essere rinvenuta più frequentemente di quanto era stato precedentemente rilevato, nei corsi d'acqua drenanti aree di produzione di mais. Così, sei mesi dopo la raccolta, residui di mais sono stati trovati nell'86% dei 217 siti della rete idrografica studiata. La tossina Cry1Ab è stata rilevata nel 13% dei corsi d'acqua e nel 23% delle colonne d'acqua analizzate.

I-1.b Persistenza della tossina

Elementi tratti dal parere del HCB del 22 dicembre 2009

Le proteine Cry hanno la proprietà di essere adsorbite a diversi componenti del suolo quali l'argilla o gli acidi umici, conservando la loro proprietà insetticida (Tapp et Stotzky, 1998).

I dati relativi alla persistenza delle tossine Cry sono contrastanti. Herman et al. (2002) hanno mostrato, con l'aiuto di saggi biologici su insetti, che l'emivita della tossina Cry1F è inferiore ad 1 giorno. Sims et Holden (1996) hanno mostrato un DT50 (tempi corrispondenti al 50% di

dissipazione) della tossina Cry1Ab proveniente dal mais, di 1,6 giorni, contro 8,3 per alcune tossine di origine batterica. Palm et al. (1994) indicano che l'88% delle proteine Cry1Ab sono eliminate dal suolo in 7 giorni.
Tuttavia, diversi autori (Donegan et al. 1995 ; Tapp et Stotzky, 1998) hanno osservato che l'attività insetticida delle tossine Cry può persistere nel suolo per più di 6 mesi. Studi anteriori spiegano questi risultati in apparenza contraddittori.
West et al. (1984) hanno mostrato che la dispersione delle tossine Cry del suolo era un fenomeno bifasico: all'inizio si osserva una dispersione rapida delle tossine, seguita da una perdita molto più lenta del 10% delle proteine restanti. La caduta rapida osservata durante i primi giorni è attribuita all'utilizzazione della tossina da parte dei microrganismi, mentre la fase "stabile", all'immobilizzazione e alla protezione della tossina da parte delle argille e della materia organica (Palm et al., 1996). I tempi di emivita della tossina nel suolo sarebbe dunque fortemente dipendente dall'attività microbica, a sua volta dipendente dal pH.
Icoz et al. (2008), forniscono dati derivanti da studi condotti in campo aperto, per un periodo di quattro anni. Non sono stati rilevati effetti consistenti derivati dalla presenza di mais Bt sui microrganismi del suolo, relativamente alla posizione, stagionalità, e background genetico del mais Bt esaminati; in generale non è stata rilevato accumulo di Bt nel suolo, sebbene la protein Bt possa restare stabile per un periodo di almeno 234 giorni quando adsorbita su particelle d'argilla.

Pubblicazioni scientifiche posteriori

Sander et al. (2010) hanno dimostrato la alta stabilità conformazionale della tossina Cry1Ab, che potrebbe spiegare il mantenimento della sua attività insetticida nel suolo.
Circa la persistenza della tossina CryAb nei corsi d'acqua, Tank et al. (2010) hanno mostrato che la tossina CryAb può persistere nei frammenti di foglia di mais e può essere rilevata nei corsi d'acqua 6 mesi dopo la raccolta.

I-2 Comparsa di resistenza negli organismi nocivi bersaglio

Elementi tratti dal parere del HCB del 22 dicembre 2009

Alcune resistenze di un livello sufficientemente elevato da permettere uno sviluppo su mais MON 810 sono state rilevate su insetti non europei: *Busseola fusca* (in Asia, Van Rensburg, 2007; in Sud Africa, Kruger, 2009), *Diatraea saccharalis* (negli USA, Huang et al. 2007, Wu et al. 2009) *Ostrinia furnacalis* (in Cina, Xu et al. soumis) e *Spodoptera frugiperda* (in Puerto Rico, Storer et al., 2010).
Non esiste, a priori, alcuna ragione per pensare che tali resistenze non possano essere selezionate nelle popolazioni europee di *Ostrinia nubilalis* (piralide) et *Sesamia nonagrioides* (sesamia).
La genetica (livello di resistenza, grado di dominanza e costo della resistenza) della resistenza alle dosi prodotte dalle parti vegetative del mais MON 810 nelle due specie bersaglio europee – *O. nubilalis* et *S. nonagrioides* – è sconosciuta e tale resterà fino a che non sarà disponibile qualche ceppo o popolazione naturale resistente a questo mais.
Allo stesso modo se sappiamo che la frequenza degli alleli di resistenza al mais MON 810 è inferiore a 10^{-3} nelle popolazioni di *O. nubilalis* (Bourguet et al. 2003, Stodola et al. 2006), non

abbiamo praticamente alcun dato sulla frequenza di tali alleli nelle popolazioni di *S. nonagrioides* (Andreadis et al.2007).
L'assenza di dati sulla dinamica della resistenza e sulla frequenza precisa degli alleli che conferiscono una resistenza alle dosi di tossine prodotte dal mais MON 810, rende aleatoria ogni predizione sulla velocità con la quale la resistenza sarà selezionata nelle popolazioni naturali di *O. nubilalis* et *S. nonagrioides*.

E' impossibile sapere se la quantità di zone rifugio proposte dal notificante sarà sufficiente per evitare o soltanto ritardare la comparsa di resistenze nelle popolazioni di *O. nubilalis* et *S. nonagrioides*. E' impossibile valutare con precisione il numero di anni o di decenni che separeranno i primi campi di mais MON 810 e la generalizzazione della resistenza nelle popolazioni di piralide e di sesamia.

Pubblicazioni scientifiche posteriori

Lo studio condotto da Kruger et al. (2009 e 2011) conferma lo sviluppo di resistenze alla tossina Cry1Ab nell'insetto bersaglio *Busseola fusca* in Sud Africa e dimostra che la realizzazione di zone di rifugio si è rivelata inefficace per impedire lo sviluppo di queste resistenze.

Elementi dal parere dell'EFSA del 8 dicembre 2011

Resistenze alla tossina CryAb possono comparire nei lepidotteri bersaglio associati alla coltura del mais MON810. Questa evoluzione delle resistenze può condurre a pratiche di controllo degli insetti dannosi (ad esempio, insetticidi) che possono produrre effetti negativi per l'ambiente. Tali resistenze sono già state messe i evidenza negli insetti parassiti del mais *Busseola fusca* (Kruger et al., 2011) et *Spodoptera frugiperda* (Storer et al., 2010) al di fuori dell'Europa.

Nelle zone dove sono presenti altri lepidotteri dannosi (ad esempio *Sesamia cretica, Helicoverpa armigera, Mythimna unipuncta*), possono presentarsi allo stesso modo delle resistenze in seguito ad un'esposizione di questi insetti alla proteina CryAb.

I.3- Impatto del mais MON810 sugli invertebrati non bersaglio

I.3.a Studi in laboratorio

Elementi tratti dal parere del HCB del 22 dicembre 2009

Fino ad oggi, sono state realizzate due meta-analisi di dati ottenuti in laboratorio: uno condotto da Duan et al. (2008) con il fine di misurare l'impatto sulle api e l'altro da Naranjo (2009) sull'insieme dei vertebrati non bersaglio.

Gli studi in laboratorio prendono in considerazione un numero ristretto di phyla (n=3), di classi (n=8), di ordini (n = 16), di famiglie (n = 43) di generi (n = 79) o di specie (n = 99) di invertebrati. Ciò è legato alle difficoltà o all'impossibilità di allevare o di riprodurre in cattività alcune specie di insetti.

La meta analisi di Naranjo (2009) include 84 studi sulla tossina CryAb pura o prodotta dal mais Bt.

Gli effetti messi in evidenza sono in particolare i seguenti: (1) lieve riduzione dei tempi di sviluppo dei predatori che non si traduce tuttavia in una riduzione della loro sopravvivenza o del loro tasso di riproduzione e (2) una diminuzione dei tempi di sviluppo e della sopravvivenza di numerosi Lepidotteri che siano parassiti non bersaglio o specie emblematiche (es: *Nymphalidae, Papilionidae, Saturnidae, Lycaenidae et Bombyxidae*).

D'altra parte l'analisi di Naranjo (2009) mette chiaramente in evidenza un effetto della qualità degli ospiti/prede sullo sviluppo, la riproduzione e la sopravvivenza dei parassitoidi e dei predatori.
Questi tre parametri sono interessati soltanto se questi ospiti/prede sono prima indeboliti da un'esposizione alle tossine del Bt alle quali sono sensibili. D'altro canto, i parassitoidi e i predatori si sviluppano, si riproducono e sopravvivono normalmente su ospiti/prede naturalmente insensibili o divenute resistenti alle tossine del Bt. Questi risultati permettono di concludere che gli effetti sui parassitoidi e sui predatori sono in generale – se non esclusivamente – indiretti.

Pubblicazioni scientifiche posteriori

Una nuova meta-analisi dei dati ottenuti in laboratorio sulle larve di lepidotteri non bersaglio è stata realizzata da Lang e Otto (2010). Comprende 16 studi in laboratorio sull'analisi degli effetti tossici del mais Bt e/o della tossina Cry sulle larve di 11 specie di lepidotteri (farfalle e acari).
Il 52% degli studi rivelano un effetto avverso sui bruchi.

Per altri versi lo studio di Boh net al. (2010) mostra alcuni effetti avversi del mais Bt che esprime la tossina CryAb, sull'artropode *Daphnia magna*, correntemente utilizzata come organismo modello negli studi eco tossicologici. Vengono considerati la sopravvivenza, la fecondità e il tasso di crescita delle popolazioni di *D. magna* nutrite con il mais geneticamente modificato.

Un altro studio condotto da Chambers et al. (2010) mette in evidenza gli effetti negativi sulla crescita di organismi acquatici della famiglia di tricotteri. Anche Jensen et al. (2010) hanno evidenziato gli effetti negativi di mais Bt sulla crescita e la sopravvivenza di alcuni invertebrati non bersaglio, come gli isopodi e le leatherjackets, che si nutrono di detriti vegetali nei corsi d'acqua. Tali studi confermano la possibilità di effetti subletali delle tossine Bt sugli organismi acquatici non bersaglio.

Uno studio condotto da Kramarz et al. (2009) sulla lumaca *Cantareus aspersus* mostra ugualmente un effetto negativo a lungo termine del mais MON810 sulla crescita di questa specie.

La coltivazione del mais MON810 può favorire lo sviluppo di altri parassiti del mais. Così alcuni studi condotti negli Stati Uniti hanno dimostrato che il mais MON810 favorisce la

sopravvivenza di un nuovo parassita del mais, il verme grigio occidentale dei fagioli (Dorhout e Rice, 2010).

I.3.b Studi in campo

Elementi tratti dal parere del HCB del 22 dicembre 2009

La qualità degli studi è spesso criticabile. Così Marvier et al. (2007) notano che tra i 63 articoli dedicati agli studi nel settore, il 40% fornisce delle medie senza accompagnarle dalla loro varianza, il 20% non ha chiaramente specificato il numero di campioni e il 22% utilizza in maniera inappropriata sub-campionamenti per effettuare delle misure di varianza.

In conseguenza, il numero di studi considerati nella meta-analisi di Marvier et al. (2007) si limita a (1) 24 studi concernenti il confronto tra mais Bt che produce Cry1Ab e mais convenzionali non trattati con insetticidi e (2) 8 studi che hanno confrontato questi stessi mais con parcelle trattate con insetticidi. Per il mais MON810 queste cifre sono rispettivamente 11 e 4. La meta analisi di Wolfenbarger et al. (2008) considera praticamente gli stessi studi. La più recente meta-analisi (Naranjo, 2009) comprende 14 studi supplementari.

I risultati della meta-analisi di Marvier et al. (2007), Wolfenbarger et al. (2008) e Naranjo (2009) possono essere così sintetizzate:
L'abbondanza di invertebrati non bersaglio è complessivamente maggiore nelle parcelle di mais convenzionali non trattate con insetticidi piuttosto che nelle parcelle di mais MON810.
Più specificamente, gli imenotteri parassitoidi - per lo più alcune specie di vespe appartenenti ai *Braconidae* e agli *Ichneumonidae* - sono meno frequenti nelle parcelle di mais che producono la tossina Cry1Ab rispetto a quelle con mais convenzionale non trattate. Questa riduzione proviene quasi esclusivamente da una diminuita abbondanza di *Macrocentrus grandii*, un parassitoide specialista della piralide del mais *Ostrinia nubilalis*. L'effetto sui parassitoidi è certamente un effetto secondario legato alla riduzione della densità del loro ospite e dunque all'efficacia del mais MON810 sul suo bersaglio principale: *O. nubilalis*.
I collemboli sono in media meno frequenti nei mais che producono la tossina Cry1Ab piuttosto che nei mais convenzionali. Marvier et al. (2007) giudicano tuttavia che questa differenza è basata su un numero di studi troppo ridotto (n=3) per essere considerata significativa.

Pubblicazioni scientifiche posteriori

La meta-analisi di Lang et Otto (2010) comprende sette studi sul campo, relativi all'analisi degli effetti tossici diretti del mais Bt esprimente la tossina Cry1Ab su larve di lepidotteri. Il 21% degli studi mostrano un effetto negativo sui bruchi.
Inoltre, studi realizzati in Asia su 10 anni dimostrano che la coltura del cotone resistente agli insetti ha favorito lo sviluppo di altri insetti non bersaglio nocivi per le colture e ha portato ad un aumento dell'uso di insetticidi (Lu et al., 2010).
Un altro studio condotto sul campo da Virla et al. (2010) mostra che la cicalina, un insetto parassita per il mais, si sviluppa maggiormente nel campo di mais Bt che nel campo di mais convenzionale. Questo fenomeno potrebbe essere legato ad una maggiore attrattiva del mais Bt per questi insetti o a una minore competizione con i parassiti bersaglio del mais Bt.

Elementi tratti dal parere dell'EFSA del 8 dicembre 2011:

I dati scientifici disponibili confermano l'esistenza di un potenziale rischio per le larve dei lepidotteri (farfalle) non bersaglio, associato con l'ingestione di polline del mais Bt depositato su piante ospiti di questi lepidotteri, situate dentro o in prossimità dei campi di mais Bt (Lang e Otto, 2010, Perry et al, 2010, 2011). Questo rischio esiste in particolare per le specie minacciate.

La sensibilità al polline del mais Bt11 o MON810 è stata misurata solo in un numero molto limitato di lepidotteri non bersaglio. Le due specie *Vanessa atalanta* (Vulcano) e *Inachis io* (occhio di pavone) sono state classificate da AESA come "altamente sensibili". Una minore sensibilità è stata misurata in *Ostrinia furnicalis* (piralide del mais asiatico) e *Danaus plexippus* (monarca).
La valutazione dell'EFSA dell'impatto sulle altre specie si basa sull'applicazione di un modello. Secondo questo modello, in assenza di misure di gestione, la mortalità locale (alla scala del campo) per le specie altamente sensibili potrebbe raggiungere il 100% nelle situazioni più sfavorevoli. Così, la mortalità locale è stimata pari all'8% per le specie *Vanessa atalanta* e *Inachis io*, e al 13% per *Plutella xylostella*. La mortalità complessiva (a livello regionale) potrebbe raggiungere l'8%. La mortalità dipende anche dalla superficie coltivata a mais Bt11 e 1507.
Sarebbe particolarmente significativo se il MON810 e Bt11 mais fossero stati coltivati su superfici superiori a 7,5% della superficie agricola di una determinata area (l'EFSA non specifica la dimensione dell'area in questione).

I.3.c Sviluppo di parassiti secondari

La coltivazione del mais Bt può favorire lo sviluppo di parassiti secondari, che, se non controllati, possono essere dannosi per altre colture (Dorhout e Rice, 2010, Viria et al, 2010, Meissle et al, 2010). Questo fenomeno è stato osservato negli Stati Uniti, con lo sviluppo di *Striacosta albicosta* (verme grigio del fagiolo) (Michel et al, 2010) e in Cina, dove delle cimici si sono sviluppate in colture di cotone Bt (Lu et al, 2010).

I-3.d Conclusioni

I risultati combinati degli studi condotti in laboratorio e in campo permettono, fino ad ora, di concludere che la coltivazione del mais MON810:

Avrà un impatto sugli imenotteri parassitoidi specialisti di *O. nubilalis*. Questo impatto non è legato alla tossicità diretta della proteina Cry1Ab. Controllando le infestazioni di piralide, questo mais Bt elimina completamente l'ospite di questi parassitoide costituito da *O. nubilalis*. E' da notare che *Macrocentrus grandii*, parassitoide maggiormente interessato da questo effetto, non infesta le popolazioni francesi della piralide del mais.

Potrebbe modificare le popolazioni di lepidotteri non bersaglio. Numerosi lepidotteri sono infatti sensibili alla tossina Cry1Ab e possono essere potenzialmente intossicati ingerendo polline di mais MON810. Se questa tossicità è dimostrata, nessuno studio ha confrontato le popolazioni di questi insetti in condizioni naturali.

Si avrebbe un impatto sui lepidotteri non bersaglio, ed in particolare sulle due *specie Vanessa atalanta* (vulcano) e *Inachis io* (occhio di pavone) con una la mortalità, in assenza di misure di gestione, che può arrivare al 100%.

Potrebbe favorire lo sviluppo di parassiti secondari, potenzialmente dannosi per le altre colture.

Tuttavia permangono incertezze sugli impatti su altri invertebrati non bersaglio, per i seguenti motivi:

gli studi condotti direttamente sul mais MON810 sono del tutto limitati,

questi studi coprono solo una parte di specie che invadono il mais e un piccolo numero di specie europee poiché la maggior parte degli studi sono stati condotto negli Stati Uniti e in Cina,

la potenza statistica delle esperienze è, per la maggior parte dei gruppi di invertebrati studiati, molto limitata; questi studi non permettono dunque di rilevare gli effetti di debole ampiezza,

la qualità delle pubblicazioni in questo settore è a volte insufficiente.

la durata delle sperimentazioni è spesso molto limitata e non consente valutazioni effettuate per un lasso di tempo significativo al rilevamento di variazioni.

Infine, occorre tenere presente che gli studi di laboratorio e di campo passano sotto silenzio gli eventuali effetti sub-letali. Se nessun effetto sulle api ha potuto essere dimostrato fino ad oggi, Duan et al. (2008) considerano che le altre fonti di "stress" subite da questi impollinatori (es. dosi sub-letali di insetticidi, attacchi di *Varroa destructor*, virosi ...) possono aumentare la loro sensibilità alle tossine Cry del Bt.

Le conclusioni dell'EFSA (2009) « the likelihood of adverse effects ... is foreseen to be very low» (la probabilità di un effetto indesiderabile ... è considerata molto bassa) sono troppo perentorie rispetto ai limiti degli studi sopra indicati tutte dal momento che recenti pubblicazioni scientifiche mostrano che l'impatto della coltivazione del mais Bt su alcuni organismi non bersaglio è stato sottostimato.

In ambito di studi che considerano in dettaglio i diversi aspetti delle componenti biologiche relative all'impatto della coltura GM sull'ambiente, si possono ritrovare ulteriori elementi nel documento FNSNF 3499 "Synthesis and Overview Studies to evaluate existing research and knowledge on biological issues on GM plants of relevance to Swiss environments (Sweet and Bartsch, 2012). Inoltre, valutazioni più comprensive su un panorama più generale relativo a tutti gli eventi GM autorizzati in ambito Eu ed internazionale, sono riportati nella pubblicazione di Franke et al. (2011). Sustainability of current GM crop cultivation. Plant research International, Wageningen UR (NL).

Allegato 2- Misure di gestione necessarie per la protezione dell'ambiente

Le seguenti misure di gestione sono raccomandate dall'EFSA al fine di proteggere l'ambiente, tenendo conto dei rischi individuati:

II.1. Misure di gestione per limitare i rischi di comparsa di resistenze alla tossina Cry1Ab

Devono essere realizzate delle aree di rifugio coltivate a mais non-GM, destinate a ritardare la potenziale insorgenza di resistenze alla tossina Cry1Ab. Esse devono rappresentare almeno il 20% della superficie del mais MON810. L'EFSA raccomanda di rafforzare il piano di gestione proposto dal notificante: l'attuazione delle zone di rifugio non deve essere limitata a campi di più di 5 ha, come proposto dal notificante. Esse devono essere realizzate per campi di mais MON810 con una superficie inferiore a 5 ha quando il raggruppamento di diversi campi rappresenta più di 5 ettari di mais MON810.

II.2 Misure di gestione per limitare gli effetti sui lepidotteri non bersaglio

- L'EFSA raccomanda l'adozione di misure di gestione per limitare l'esposizione delle larve di lepidotteri non bersaglio al polline di mais Bt, come ad esempio l'impianto di file di mais non-Bt lungo i bordi dei campi di mais Bt, o la creazione di distanze di isolamento rispetto agli habitat delle specie di Lepidotteri.
- Le specie Lepidotteri di interesse conservazionistico, che si trovano in habitat protetti ai sensi della direttiva 2004/35/CE, e la cui sensibilità alla tossina Cry1Ab è sconosciuto, devono essere oggetto di una protezione supplementare. In questo caso, si raccomanda di non coltivare mais MON810 a meno di 20 m da questi habitat per minimizzare l'esposizione e quindi il rischio per questi Lepidotteri.
- Nel caso in cui tali misure fossero considerate sproporzionate (ad esempio, in assenza di specie molto sensibili nelle zone considerate), esse possono essere ridotte con l'accordo dei gestori del rischio, e in questo caso, devono essere realizzati studi supplementari. Questi studi devono permettere di confermare la stima della sensibilità dei lepidotteri non bersaglio e di determinare se le larve di lepidotteri non bersaglio molto sensibili alla tossina Cry1Ab sono presenti e si nutrono su piante ospiti che si trovano dentro o accanto ai campi di mais durante la disseminazione del polline.

II.3. Monitoraggio specifico

Il monitoraggio specifico deve essere attuato per quanto riguarda il rischio di insorgenza di una resistenza alla tossina Cry1Ab negli insetti non bersaglio. Il piano di monitoraggio proposto dal notificante deve essere rafforzato attraverso l'applicazione delle seguenti raccomandazioni dell'EFSA:

- campioni mirati di lepidotteri bersaglio nelle aree a rischio (aree dove il tasso di adozione del mais Bt è alto e dove sono presenti parassiti bersaglio di tipo multivoltins),
- includere nel campionamento gli insetti bersaglio sopravvissuti all'interno del mais Bt,
- considerare altri lepidotteri parassiti del mais diversi dalla piralide e dalla sesamia,
- rivedere il protocollo di monitoraggio al fine di individuare alleli di resistenza ad una frequenza inferiore al 5% nelle zone a rischio.

II.4. Monitoraggio generale

Conformemente al regolamento (CE) n 1829/2003 e alla direttiva 2001/18/CE, il notificante ha proposto un piano di monitoraggio generale.

Al fine di migliorarlo l'EFSA raccomanda le seguenti modifiche:

a) Il contenuto e il formato del questionario da inviare agli agricoltori devono essere rivisti:

- Il questionario deve essere completato con ulteriori domande sulle ricrescite del mais da colture precedenti, sulle piante di mais inselvatichite a bordo campo, sulle piante infestanti presenti nei campi di mais MON810. Devono essere considerati altri lepidotteri dannosi diversi dalla piralide e dalla sesamia. Devono essere aggiunte domande sui danni causati dai parassiti al mais MON810, come pure domande sulla percentuale di mais non-Bt coltivato in azienda rispetto al mais MON810, e sulla distanza tra la zona rifugio e il mais MON810.

- Il questionario deve essere progettato in modo da garantire una validità statistica e una rappresentatività dei dati raccolti e inoltre una potenza statistica sufficiente, dovrebbe consentire di generare dati sulla gestione agronomica del mais Bt, nonché sull'impatto ambientale e sul sistema colturale. Il questionario dovrebbe riguardare campi di mais MON810 in regioni e sistemi colturali rappresentativi del paese; il comparatore (rilevatore?) deve essere identificato; il questionario deve consentire di seguire campi negli anni successivi alla coltura degli OGM, deve fornire informazioni sui altri OGM coltivati nella stessa azienda; il questionario deve essere costruito in modo tale da incoraggiare risposte obiettive e indipendenti da parte degli agricoltori.

b) Inoltre, l'EFSA raccomanda di tenere conto dei seguenti punti aggiuntivi, secondo le nuove linee guida in materia di monitoraggio (EFSA, 2011):

- Il quadro di campionamento deve essere completo e in ogni paese deve essere applicata una stratificazione in modo coerente.
- Le aree nelle quali è intensa la coltivazione di mais MON810, dovrebbero essere sovra-rappresentate nel piano di campionamento.
- Deve essere documentato il numero di agricoltori che non partecipano al follow-up e le relative motivazioni.
- Interviste standardizzate e imparziali dovrebbero essere effettuate da soggetti indipendenti e dovrebbero esser applicate procedure di qualità.
- Per verificare la validità dei questionari dovrebbero essere utilizzati dati provenienti da altre fonti di informazione.
- Dovrebbero essere forniti i dati grezzi provenienti dai questionari agli agricoltori; intervalli di confidenza dovrebbero essere inclusi nella relazione statistica.
- Dovrebbero essere utilizzate adeguate procedure statistiche.
- La dimensione predefinita dell'effetto standard dovrebbe essere adattato in funzione dei parametri misurati.

- I dati dovrebbero essere raccolti e analizzati nell'arco di diversi anni. Alla fine di 10 anni, dovrebbe essere eseguito uno studio statistico sull'insieme dei dati..
- Dovrebbe essere realizzata una codifica per gli agricoltori seguiti per diversi anni.
- Dovrebbe essere indicato il numero di anni durante i quali gli agricoltori hanno coltivato mais MON810 o altre colture GM.

c) L'EFSA raccomanda anche di tener conto delle reti di monitoraggio esistenti. Il notificante, in concertazione con lo Stato membro, dovrebbe:

- considerare gli obiettivi di protezione e gli indicatori che possono essere seguiti attraverso i programmi di monitoraggio esistenti;
- identificare le reti di monitoraggio esistenti adeguate per gli scopi di protezione scelti;
- descrivere l'approccio generico e sviluppare criteri più dettagliati per valutare le reti di monitoraggio esistenti e selezionare le reti appropriate;
- individuare le modifiche da apportare a tali reti di monitoraggio e descrivere come potrebbero essere attuate, e individuare le lacune che potrebbero essere integrate da ulteriori follow-up;
- incoraggiare queste reti ad adottare le modifiche proposte e descrivere come i dati provenienti da queste reti saranno integrati e valutati.

d) Inoltre, per la selezione delle reti di monitoraggio esistenti, l'EFSA raccomanda di prendere in considerazione i seguenti punti per esaminare l'adeguatezza di tali sistemi per fornire dati pertinenti:
- la pertinenza degli obiettivi di protezione e degli indicatori seguiti;
- il tipo e la qualità dei dati registrati;
- la potenza statistica e le grandezze degli effetti rilevati da queste reti di monitoraggio;
- la facilità di accesso ai dati raccolti da queste reti;
- l'esperienza e le performance passate di queste reti;
- i metodi usati da queste reti.

L'EFSA raccomanda, infine, di descrivere le modalità di partecipazione di terzi al monitoraggio generale.

****

Allegato 3 - Riferimenti bibliografici

AESA, 2009. Scientific Opinion of the Panel on Genetically Modified Organisms on applications (EFSA-GMO- RX-MON810) for the renewal of authorization for the continued marketing of (1) existing food and food ingredients produced from genetically modified insect resistant maize MON810; (2) feed consisting of and/or containing maize MON810, including the use of seed for cultivation; and of (3) food and feed additives, and feed materials produced from maize MON810, all under Regulation (EC) No 1829/2003 from Monsanto. The EFSA Journal 1149, 1-84.

AESA, 2010. Guidance on the environmental risk assessment of genetically modified plants. The EFSA Journal 8(11):1879.

AESA, 2011a. Statement supplementing the evaluation of the environmental risk assessment and risk management recommendations on insect resistant genetically modified maize Bt11 for cultivation. The EFSA Journal 9(12):2478.

AESA, 2011b. Guidance on the Post-Market Environmental Monitoring (PMEM) of genetically modified plants. The EFSA Journal 9(8):2316.

Andreadis, S.S., Alvarez-Alfageme, F.A., Sánchez-Ramos, I., Stodola, T.J., Andow, D.A., Milonas, P.G., Savopoulou-Soultani, M., Castañera, P., 2007. Frequency of resistance to Bacillus thuringiensis toxin Cry1Ab in Greek and Spanish population of Sesamia nonagrioides (Lepidoptera: Noctuidae). Journal of Economic Entomology, 100: 195-201.

Bohn, T., Traavik, T. and Primicerio, R., 2010. Demographic responses of *Daphnia magna* fed transgenic Btmaize, Ecotoxicology, 19: 419-430.

Bourguet, D., Chaufaux, J., Séguin, M., Buisson, C., Hinton, J.L., Stodola, T.J., Porter, P., Cronholm, G., Buschman, L.L., Andow, D.A., 2003. Frequency of alleles conferring resistance to Bt maize in French and US corn belt populations of the European corn borer, Ostrinia nubilalis. Theoretical and Applied Genetics, 106 : 1225-1233.

Chambers, C.P., Whiles, MR, Rosi-Marshall, E.J., Tank, J.L., Royer, T.V., Griffiths, N.A., Evans-White, M.A., Stojak, A.R., 2010. Responses of stream macroinvertebrates to Bt maize leaf detritus. Ecological Applications 20, 1949-1960.

Della Porta G, Ederle D, Bucchini L, Prandi M, Pozzi C, Verderio A, 2006. Indagine sulle dinamiche di diffusione del polline tra coltivazioni contigue di mais nel contesto padano. Cedab publ. 2006.

Donegan, K.K., Palm, C.J., Fieland, V.J., Porteous, L.A., Ganio, L.M., Schaller, D.L., Bucao, L.Q., Seidler, R.J., 1995. Changes in levels, species, and DNA fingerprints of soil microorganisms associated with cotton expressing the Bacillus thuringiensis var. kurstaki endotoxin. Applied Soil Ecology, 2 : 111-124.

Dorhout, D.L. Rice, M.E., 2010. Intraguild competition and enhanced survival of Western bean cutworm (Lepidoptera: Noctuidae) on transgenic Cry1Ab (MON810) Bacillus thuringiensis corn.

13 Journal of Economic Entomology 103, 54-62.

Duan, J.J., Marvier, M., Huesing, J., Dively, G., Huang, Z.Y., 2008. A meta-analysis of effects of Bt crops on honey bees (Hymenoptera: Apidae). PLoS One, 3: 1-6 (e1415).

Franke AC, Breukers MLH, Broer W, Bunte F, Dolstra O, D'Engelbronner Kolff FM, Lotz LAP, Van Montfort J, Nikoloyuk J, Rutten MM, Smulders MJM, van de Wiel CCM, van Zijl M (2011). Sustainability of current GM crop cultivation. Plant Research International, Wageningen UR (NL)

HCB, 2009. Avis sur les réponses de l'AESA aux questions posées par les Etats membres au sujet de la culture et de la consommation du maïs Mon810, Dossier EFSA-GMO-RX-MON 810.

Herman, R.A., J.D. Wolt et W.R. Halliday. 2002. Rapid degradation of the Cry1F insecticidal crystal protein in soil. J. Agric. Food Chem. 2002, 50 : 7076-7078

Huang F, Leonard, B.R., Andow, D.A. 2007. Sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae) resistance to transgenic Bacillus thuringiensis maize. Journal of Economic Entomology 100: 164-171.

Jensen, P.D., Dively, G.P., Swan, C.M., Lamp, W.O., 2010. Exposure and nontarget effects of transgenic Bt corn debris in streams. Environmental Entomology 39, 707-714.

Icoz I, Saxena D, Andow DA, Zwahlen C, Stotzky G, 2008. Microbial populations and enzyme activities in soil in situ under transgenic corn ex pressing Cry proteins from Bacillus thuringiensis. Journal of Environmental Quality 37: 647-662

ISAAA - *(International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications)*. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2011"

Kramarz, P., de Vaufleury, A., Gimbert, F., Cortet, J., Tabone, E., Andersen, M. N., Krogh P. H., 2009. Effects of Bt-maize material on the life cycle of the land snail Cantareus aspersus. Applied Soil Ecology, 42 : 236-242.

Kruger M, Van rensburg JBJ, Van den Berg J, 2009. Perspective on the development of stem borer resistance to Bt maize and refuge compliance at the Vaalharts irrigation scheme in South Africa. Crop protection 28: 684-689

Kruger, M., Van Rensburg, J.B.J., Van den Berg, J., 2011. Resistance to Bt maize in Busseola fusca (Lepidoptera: Noctuidae) from Vaalharts. South Africa. Environmental Entomology 40, 477- 483.

Lang, A., and Otto, M., 2010. A synthesis of laboratory and field studies on the effects of transgenic Bacillus thuringiensis (Bt) maize on non-target Lepidoptera. Entomol Exp Appl 135 : 121-134.

Lu, Y., Wu, K., Jiang, Y., Xia, B., Li, P., Feng, H., Wyckhuys, K.A.G., Guo Y., 2010. Mirid bug outbreaks in multiple crops correlated with wide-scale adoption of Bt cotton in China. Science 328, 1151-1154.

Marvier, M., McCreedy, C., Regetz, J., Kareiva, P., 2007. A meta-analysis of effects of Bt cotton and maize on non target invertebrates. Science, 316 : 1475-1477.

Meissle, M., Romeis, J., Bigler, F., 2011. Bt maize and integrated pest management – A European perspective. Pest Management Science 67, 1049-1058.

Michel, A.P., Krupke, C.H., Baute T.S., Difonzo, C.D., 2010. Ecology and management of the western bean cutworm (Lepidoptera: Noctuidae) in corn and dry beans. Journal of Integrated Pest Management 1, 1-10.

Naranjo, S.E. 2009. Impact of Bt crops on non-target invertebrates and insectide use patterns. CAB Review: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources 4, No. 011.

Palm C.J., Donegan, K., Harris, D., Seidler, R.J. Quantification in soil of *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki δ-endotoxin from transgenic plants Mol. Ecol. 1994, 3 : 145-151

Palm C.J., Schaller D.J., Donegan K.K., Seidler R.J., 1996, Persistence in soil of transgenic plant produced *Bacillus thuringiensis var kurstaki* d-endotoxin. Can. J. Microbiol., 42 : 1258-1262

Perry, J.N., Devos, Y., Arpaia, S., Bartsch, D., Gathmann, A., Hails, R.S., Kiss, J., Lheureux, K., Manachini, B., Mestdagh, S., Neemann, G., Ortego, F., Schlemann, J., Sweet, J.B., 2010. A mathematical model of exposure of non-target Lepidoptera to Bt-maize pollen expressing Cry1Ab within Europe. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 277, 1417-1425.

Perry, J.N., Devos, Y., Arpaia, S., Bartsch, B., Ehlert, C., Gathmann, A., Hails, R.S., Hendriksen, N.B., Kiss, J., Messéan, A., Mestdagh, S., Neemann, G., Nuti, M., Sweet, J.B., Tebbe, C.C., 2011. Estimating the effects of Cry1F Bt-maize pollen on non-target Lepidoptera using a mathematical model of exposure. Journal of Applied Ecology, DOI:10.1111/j.1365-2664.2011.02083.x (in press)

Quaderni della Ricerca della Regione Lombardia (2002) – Mais in Lombardia: varietà tradizionali

Sander, M., Madliger, M. and Schwarzenbach, R. (2010) Adsorption of transgenic insecticidal Cry1Ab protein to SIO2. 1. Forces driving adsorption, Environ. Sci. Technol. 44 : 8870- 8876.

Saxena et Stotzki, 2000, Insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* is released from roots of transgenic Bt corn in vitro and in situ. FEMS Microbiol. Ecol. 33 : 35-39

Scholderer J, Verbeke W, 2012. FNSNF 3495. Genetically Modified Crop production: social sciences, agricultural economics, and costs and benefits of coexistence. ISBN 978-3-7281-3495-0

Sims, S.R., Holden, L.R., 1996. Insect bioassay for determining soil degradation of *Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki* CryIA(b) protein in corn tissues. Environmental Entomology, 25: 659-664.

Sims, S.R. et J.E. Ream. 1997. Soil inactivation of the *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki CryIIA insecticidal protein within transgenic cotton tissue: laboratory and field studies..J. Agric. Food Chem., 45 : 1502-1505

Stodola, T.J., Andow, D.A., Hyden, A.R., Hinton, J.L., Roark, J.J., Buschman, L.L., Porter, P., Cronholm, G.B., 2006. Frequency of resistance to Bacillus thuringiensis toxin Cry1Ab in southern United States corn belt population of European corn borer (Lepidoptera: Crambidae). Journal of Economic Entomology, 99 : 502-507.

Storer, N.P., Babcock, J.M., Schlenz, M., Meade, T., Thompson, G.D., Bing, J.W., Huckaba, R.M., 2010. Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperla* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. Journal of Economic Entomology 103, 1031-1038.

Sweet J, Bartsch D, 2012. FNSNF 3499. Synthesis and Overview Studies to evaluate existing research and knowledge on biological issues on GM plants of relevance to Swiss environments. ISBN 978-3-7281-3498-1

Tank, J., Rosi-Marshall, E., Royer, T., Whiles, M., Griffiths, N., Frauendorf, T. and Treering, D. (2010) Occurrence of maize detritus and a transgenic insecticidal protein (Cry1Ab) within the stream network of an agricultural landscape, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107 : 17645-17650.

Tapp, H., Stotzky, G., 1998. Persistence of the insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki in soil. Soil Biology & Biochemistry, 30 : 471-476.

Then, C. (2010) Risk assessment of toxins derived from *Bacillus thuringiensis*-synergism, efficacy, and selectivity, Environmental Science and Pollution Research, 17, 791-797.

Van Rensburg, J.B.J., 2007. First report of field resistance by the stem borer, *Busseola fusca* (Fuller) to Bt-transgenic maize. South African Journal of Plant and Soil, 24 : 147-151.

Virla, E.G., Casuso M., Frias, E.A., 2010. A preliminary study on the effects of a transgenic corn event on the non-target pest *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae). Crop Protection 29, 635-638.

West, A. W.; Burges, H. D.; White, R. J.; Wyborn, C. H., 1984. Persistence of *Bacillus thuringiensis* parasporal crystal inseticidal activity in soil. J. Invertebr. Pathol., v. 44, p.128-133.

Wolfenbarger, L.L., Naranjo, S.E., Lundgren, J.G., Bitzer, R.J., Watrud, L.S., 2008. Bt crop effects on functional guilds of non-target arthropods: a meta-analysis. PLoS ONE, 3 : 1-11 (e2118).

Wu, X, Huang, F., Leonard, B.R., Ghimire, M., 2009. Growth and development of Bacillus thuringiensis Cry1Ab-susceptible and Cry1Ab-resistant sugarcane borer on diet and conventional maize plants. Entomologia Experimentalis et Applicata 133 : 199-207.

Xu, L., Wang, Z., Zhang, J., He, K., Ferry N., Gatehouse, A.M.R, 2010. Cross-resistance of Cry1Ab-selected Asian corn borer to other Cry toxins. Journal of Applied Entomology. 134 : 429–438.