



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

16.02.09

**Helse- og miljørisikovurdering av
genmodifisert soyalinje 305423 x 40-3-2 fra
Pioneer Hi Bred International Inc.
(EFSA/GMO/NL/2007/47)**

BIDRAGSYTERE

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

VURDERT AV

Faggruppe for genmodifiserte organismer:

Knut Berdal (leder), Jihong Liu Clarke, Helge Klungland, Casper Linnestad, Anne I. Myhr, Audun Nerland, Ingolf Nes, Kåre M. Nielsen, Hilde-Gunn Opsahl Sorteberg, Odd E. Stabbetorp, Vibeke Thrane

Koordinatorer fra sekretariatet:

Arne Mikalsen og Merethe Aasmo Finne

SAMMENDRAG

Helse- og miljørisikovurderingen av den genmodifiserte og herbicidtolerante soyalinjen 305423x40-3-2 fra Pioneer Hi-Bred International (EFSA/GMO/NL/2007/47) er utført av Faggruppe for genmodifiserte organismer i Vitenskapskomiteen for mattrygghet. Mattilsynet og Direktoratet for naturforvaltning (DN) ber Vitenskapskomiteen for mattrygghet om å vurdere den genmodifiserte soyalinjen 305423 x 40-3-2 til import og prosessering, og til bruk i næringsmidler og fôrvarer. Søknaden gjelder ikke dyrking.

Risikovurderingen av den genmodifiserte soyaen er basert på dokumentasjon som er gjort tilgjengelig på EFSA's nettside GMO EFSA-net. I tillegg er det benyttet informasjon fra uavhengige vitenskapelige publikasjoner i vurderingen. 305423x40-3-2 er risikovurdert i henhold til tiltenkt bruk og faggruppen har derfor ikke vurdert mulige helse- og miljøeffekter knyttet til dyrking av soyalinjen. Vurderingen er gjort i overensstemmelse med miljø- og helsekravene i genteknologiloven med forskrifter, først og fremst forskrift om konsekvensutredning etter genteknologiloven, samt kravene i EUs forordning 1829/2003/EF og utsetningsdirektiv 2001/18/EF med annekser. Det presiseres at de deler av den norske konsekvensutredningsforskriften som vedrører bærekraft, samfunnsnytte og etikk ikke er vurdert av VKM. Videre er EFSA's retningslinjer for risikovurdering av genmodifiserte planter (EFSA 2006) og Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) konsensusdokument for soya (OECD 2001) lagt til grunn for vurderingen.

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

Soyalinjen 305423x40-3-2 er fremkommet ved konvensjonell krysning mellom de genmodifiserte soyalinjene 305423 og RR Soybean 40-3-2, produsert av henholdsvis Pioneer Hi-Bred og Monsanto.

Foreldrelinjen 305423 er fremkommet ved at celler fra den kommersielle sorten "JACK" er transformert ved hjelp av partikkelakselerasjonsmetoden. Hensikten med genmodifiseringen er først å fremst å øke mengden av den enumettede fettsyren oljesyre (C18:1) i frøet. Soyalinje 305423 er også tolerant mot ALS-inhiberende herbicider med virkestoff sulfonyleurea. Et 591 bp *gm-fad2-1* genfragment fra kodings-området til ω -6 desaturase gen 1 er satt inn i genomet til soyaen. Genfragmentet er koblet bak og dermed regulert av KTi3 promoteren som preferensielt medfører transkripsjon i soyabønner. Gentranskriptet koder ikke for et funksjonelt enzym, men hemmer uttrykk (gene silencing) av det endogene *FAD2-1* gen, som koder for ω -6-desaturase-enzym. Dette enzymet blir normalt uttrykt hovedsakelig i frøene. Hemming av enzymet fører til økt nivå av oljesyre (C18:1), samt nedsatt nivå av linol- (C18:2)- og linolensyre (C18:3) i frøene. I soyaens genom er det også satt inn et *gm-hra*-gen. GM-HRA-enzymet som uttrykkes er et syntetisk acetolaktatsyntase enzym (ALS), noe som medfører at ALS-herbicider ikke kan binde seg til og inaktivere enzymet.

Foreldrelinjen RR40-3-2 er produsert ved biolistisk transformasjon av soyaceller fra den kommersielle sorten "A5403". RR40-3-2 har fått satt inn ett *cp4 epsps*-gen som koder for enzymet 5-enolpyruvylsikumat-3-fosfatsyntetase. CP4 EPSPS-enzymet omdanner fosfoenolpyruvat og sikimat-3-fosfat til 5-enolpyruvylsikumat-3-fosfat, en viktig metabolitt i syntesen av aromatiske aminosyrer. I motsetning til plantens enzym er det bakterielle enzymet også aktivt ved nærvær av N-fosfonometyl glycin (virkestoffet glyfosat). De transgene plantene vil derfor tolerere høyere doser av herbicider med virkestoff glyfosat sammenlignet med konkurrerende ugras.

305423 x 40-3-2 inneholder ingen markørgener for antibiotikaresistens.

Olje fra hybriden 305423x40-3-2 er primært tiltenkt brukt i matvareindustrien. I forbindelse med fritering og steking er det ønskelig å benytte matoljer som ikke må herdes. Det er hovedsakelig olje, mel, proteinisolat og bønne fra soya som brukes som menneskeføde og fôr. I følge OECD nyttes omlag 93 % av oljen som næringsmiddel, mens ca. 97 % av soyamelet brukes som fôr (OECD 2001).

Analysene av ernæringsmessige viktige komponenter ble vurdert. Valget av analyseparametere er gjort i henhold til OECDs konsensusdokument for soya (OECD 2001). Det er funnet til dels store statistiske forskjeller for enkelte komponenter. Dette har sammenheng med at soya 305423x40-3-2 har et høyt innhold av fettsyren oljesyre og forholdsvis lavt innhold av fettsyrene linol- og linolensyre. For flertallet av komponentene er imidlertid de statistiske forskjellene ikke konsistente over forsøksfelt.

Faggruppen anser analysene for å være tilstrekkelige for en vurdering av soyalinjen 305423 til bruk som mat og fôr. Proteinet som blir uttrykt som følge av genmodifiseringen har ingen likheter med kjente allergener eller egenskaper som tilsier at de er allergener

Faggruppen konkluderer med at mat og fôrvarer fra soya 305423x40-3-2 ikke er vesentlig lik mat og fôrvarer fra umodifiserte soya. Dette fordi hybridene har høyt innhold av fettsyren oljesyre og forholdsvis lavt innhold av fettsyrene linol- og linolensyre. Faggruppen finner at 305423x40-3-2 brukt som mat og fôrvarer utgjør en ubetydelig helserisiko, og at helserisikoen ikke er større enn for umodifiserte soyabønner. Faggruppen finner det ikke sannsynlig at matolje fra soya 305423x40-3-2 utgjør en større helserisiko enn matolje fra umodifisert soya, når oljen benyttes i matvareproduksjon der matolje fra konvensjonell soya må herdes.

Søknaden gjelder godkjenning av soyalinjen 305423x40-3-2 for import og prosessering under direktiv 2001/18/EF del C og til bruk i næringsmidler og fôrvarer under forordning (EF) 1829/2003. Faggruppen har derfor ikke vurdert mulige miljøeffekter knyttet til dyrking av soyalinjen. Det er ingen indikasjoner på økt sannsynlighet for spredning, etablering og invasjon av soyalinjen i naturlige habitater eller andre arealer utenfor jordbruksområder som resultat av frøspill i forbindelse med transport og prosessering. Soya dyrkes ikke i Norge, og det er ingen stedegne eller introduserte viltvoksende arter i den europeiske flora som soya kan hybridisere med.

Samlet vurdering

Faggruppe for genmodifiserte organismer finner det lite trolig at bruk av soyalinjen 305423x40-3-2 vil medføre endret risiko for helse i forhold til annen soya, men påpeker muligheten for rekombinasjoner knyttet til den påviste ustabiliteten i genomet til foreldrelinjen 305423. Faggruppen påpeker også at det er kunnskapshull knyttet til redusert nivå av trypsinhemmer.

Faggruppen finner det lite trolig at bruk av soyalinjen 305423 vil medføre endret risiko for miljø i forhold til annen soya.

NØKKELORD

Soya, *Glycine max* (L.) Merr, genmodifisert soyalinje 305423x40-3-2, 305423, RR 40-3-2, herbicidtoleranse, oljesyre, *gm-fad2-1*, ω-6-desaturase, GM-HRA-protein (ALS protein), acetolactatsyntase (ALS), CP4 EPSPS-protein, glyfosattoleranse, helsemessig trygghet, helse, miljørisiko, forordning 1829/2003/EF

INNHALDSFORTEGNELSE

BIDRAGSYTERE	2
Vurdert av.....	2
SAMMENDRAG.....	3
NØKKEWORD.....	4
INNHALDSFORTEGNELSE.....	5
BAKGRUNN	6
OPPDRAG FRA MATTILSYNET OG DIREKTORATET FOR NATURFORVALTING	6
RISIKOVURDERING	8
1. Innledning.....	8
1.1. Beskrivelse av egenskap(er) og virkningsmekanismer	8
2. Molekylær karakterisering	9
2.1 Evaluering av foreldrelinjer	9
2.2. Hybriden 305423 x 40-3-2	17
3. Komparative analyser.....	19
3.1. Valg av komparator og forsøksdesign.....	19
3.2. Analyser av ernæringsmessige komponenter	19
3.3. Agronomiske egenskaper	21
3.4. Delkonklusjon	21
4. Dokumentasjon av toksisitet, allergenisitet og næringsverdi.....	21
4.1. Toksisitet.....	21
4.2. Allergenisitet	22
4.4. Delkonklusjon	23
4.3. Ernæringsmessig vurdering av den genmodifiserte soyalinjen 305423 x 40-3-2	23
5. Miljøriskovurdering	24
5.1. Potensiale for ikke intenderte effekter på fitness relatert til genmodifiseringen.....	24
5.2. Potensiale for genoverføring	24
5.3. Delkonklusjon	25
6. Vurdering av søkers dokumentasjon	26
KONKLUSJON	27
REFERANSER	28

BAKGRUNN

Faggruppe for genmodifiserte organismer i Vitenskapskomiteen for mattrygghet er bedt av Mattilsynet og Direktoratet for naturforvaltning om å foreta en vitenskapelig vurdering av helse- og miljørisiko ved en eventuell godkjenning av den genmodifiserte soyalinjen 305423x40-3-2 fra Pioneer Hi-Bred International (EFSA/GMO/NL/2007/47). 305423x40-3-2 er søkt omsatt i EU/EØS-området under forordning (EF) Nr. 1829/2003 om genmodifiserte næringsmidler og fôrvarer (artiklene 5,17,3(1c) og 15(1c), og i overensstemmelse med direktiv 2001/18/EF, del C. Søknaden omfatter bruksområdene import, prosessering, næringsmidler og fôrvarer, og ble fremmet og anbefalt av nederlandske myndigheter i juni 2007. Søknaden ble lagt ut på EFSA-nett 19. februar 2008, med frist på 90-dager for innspill fra EU- og EØS/EFTA-landene. Norge har ikke tidligere uttalt seg om hybrid 305423 x 40-3-2.

305423 x 40-3-2 er søkt notifisert i Canada og USA for alle bruksområder, inkludert dyrking (Pioneer 2008). Videre foreligger det søknad til Mexico for import til alle bruksområder.

Foreldrelinjen RR 40-3-2, notifikasjonsnummer C/UK/94/M3/1, er tidligere godkjent for import, videreprosessering, mat og fôr under henholdsvis direktiv 2001/18/EF og direktiv 90/220/EF. Godkjenningen av RR 40-3-2 gikk ut i mars 2007, og Monsanto har søkt om fornyet godkjenning fram til 2017. Dossieret til søknaden (EFSA-GMO-RX-40-3-2) om mat, fôr, import, prosessering og dyrking er lagt ut på EFSA-nett med frist 16. juni 2008 for innspill til EFSA-nett. Soya RR 40-3-2 ble også søkt godkjent for dyrking under forordning 1829/2003/EF i 2005.

Foreldrelinjen 305432 ble søkt godkjent for import, videreprosessering, mat og fôr under forordning 1829/2003/EF i juni 2007 (EFSA/GMO/NL/2007/45).

Faggruppe for genmodifiserte organismer har tidligere foretatt vurderinger av begge foreldrelinjene med hensyn på eventuelle helseeffekter ved bruk som mat og fôr (VKM 2007; 2008).

OPPDRAK FRA MATTILSYNET OG DIREKTORATET FOR NATURFORVALTING

Mattilsynet og Direktoratet for naturforvaltning har i brev datert 12.5.2006 (ref. 2006/17817) og 23.4.2008 (ref. 2008/4367 ART-BI-BRH) gitt Vitenskapskomiteen for mattrygghet i oppdrag å foreta løpende risikovurderinger av genmodifiserte næringsmidler og fôrvarer som faller inn under EUs forordning 1829/2003/EF. VKM er bedt om å vurdere helse- og miljøaspekter ved slike produkter, og på bakgrunn av vurderingene gi innspill til EFSA-nett.

Søknad EFSA/GMO/NL/2007/47, genmodifisert soya 305423x40-3-2 ble lagt ut på EFSA-nett 19. februar 2008. Faggruppe for genmodifiserte organismer skal i tråd med oppdragsbrev utarbeide helse- og miljørisikovurdering av bomullslinjen til import og industriell prosessering, samt til bruk som mat og fôr. Søknaden omfatter ikke dyrking.

Vurderingen av 305423x40-3-2 skal utføres i henhold til tiltenkt bruk og i overensstemmelse med prinsippene som er nedfelt i EFSA-s retningslinjer for vurdering av genmodifiserte planter ("Guidance document of the scientific panel on genetically modified organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed") (EFSA 2006).

I henhold til oppdragsbrev fra DN skal VKM primært fokusere på miljørisiko i EØS-området, og på miljørisiko som er spesifikke for Norge. Det skal også gis en samlet konklusjon om miljørisiko i tråd med kravene i forskrift om konsekvensutredning etter genteknologiloven, vedlegg 2 C.

Produktet som ønskes vurdert:

Genmodifisert soya, EFSA/GMO/NL/2007/47 (soya 305423x40-3-2)

Unik kode: DP-305423-1xMON-04032-6.

Status i EU: Søknad under forordning (EF) Nr. 1829/2003/. EFSA's frist for innspill er 19.05.08.

Ønsket svarfrist til Mattilsynet/DN: 19.05. 2008.

RISIKOVURDERING

1. Innledning

Helse- og miljøvurderingen av den transgene soyalinjen 305423 x 40-3-2 er basert på dokumentasjon som er gjort tilgjengelig på EFSAs nettside GMO EFSA.net. I tillegg er det benyttet uavhengige vitenskapelige publikasjoner med referee i vurderingen. Vurderingen er gjort i henhold til tiltenkt bruk og i overensstemmelse med miljø- og helsekravene i genteknologiloven med forskrifter, først og fremst forskrift om konsekvensutredning etter genteknologiloven. Videre er kravene i EUs forordning 1829/2003/EF og utsetningsdirektiv 2001/18/EF med annekser lagt til grunn for vurderingen.

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

Faggruppen har vedtatt å benytte EFSAs retningslinjer som gruppens retningslinjer for vurdering av genmodifiserte planter. Prinsippene som er lagt til grunn for vurderingen, er derfor hentet fra EFSAs dokument "Guidance document of the scientific panel on genetically modified organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed" (EFSA 2006). Ved vurdering av vesentlig likhet har Faggruppen lagt vekt på OECDs konsensusdokument for soya (OECD 2001), som gir anbefalinger over hvilke parametere som bør undersøkes.

Det er kun medlemmene i Faggruppen som har vurdert den genmodifiserte soyaen.

1.1. Beskrivelse av egenskap(er) og virkningsmekanismer

Soyalinjen 305423 x 40-3-2 er dannet ved konvensjonell kryssing mellom avkom av de genmodifiserte soyalinjene 305423 og RR 40-3-2.

Foreldrelinjen 305423 er fremkommet ved at celler fra den kommersielle sorten "Jack" ble transformert ved hjelp av partikkelakselerasjonsmetoden. Linjen har fått satt inn to genkonstruksjoner med gensekvenser fra soyaplantens eget genom. Det ene rekombinante DNA-fragmentet inneholder *gm-fad2-1*, som er et genfragment fra kodingsområdet til *omega-6 desaturase 1* (ω -6 desaturase 1). Gentranskriptet koder ikke for et funksjonelt enzym, men hemmer uttrykk ('gene silencing') av det endogene *FAD2-1*-genet. Et lavere uttrykk av FAD-2 i planten medfører et økt nivå av oljesyre (C18:1), og redusert konsentrasjon av flerumettede fettsyrer som linolsyre (C18:2) og linolensyre (C18:3) i frøene. Den andre genkonstruksjonen inneholder *gm-hra*-genet, en modifisert utgave av enzymet som uttrykket enzymet acetolaktatsyntase (ALS). Proteinene gir plantene toleranse mot herbicider med virkestoffene tifensulfuron og klorimuron.

Foreldrelinjen RR 40-3-2 er produsert ved biolistisk transformasjon av soyaceller fra den kommersielle sorten "A5403". RR 40-3-2 har fått satt inn ett *cp4 epsps*-gen fra bakterien *Agrobacterium tumefaciens*. Genet koder for enzymet 5-enolpyruvylsikat-3-fosfatsyntetasen (CP4 EPSPS), som omdanner fosfoenolpyruvat og sikimat-3-fosfat til 5-enolpyruvylsikat-3-fosfat, en viktig metabolitt i syntesen av aromatiske aminosyrer. N-fosfonometylglycin (glyfosat) hemmer generelt EPSPS-enzymet og blokkerer derved biosyntesen av aromatiske aminosyrer i planter. I motsetning til plantens enzym er det bakterielle enzymet også aktivt ved nærvær av glyfosat. De transgene plantene vil derfor tolerere høyere doser av herbicider med virkestoff glyfosat sammenlignet med konkurrerende ugras.

2. Molekylær karakterisering

Oversikt over analyser som er utført på soya 305423x40-3-2 er presentert i vedlegg 1 på side 30. I tabellens kolonne "Relevant section of application" henvises det kapittel III i EFSA's retningslinjer for risikovurdering av GMO (EFSA 2006). Kapittel III er delt inn i underkapitler som er nummerert fra A t.o.m. D.

2.1 Evaluering av foreldrelinjer

2.1.1 Foreldrelinje 305423

Transformasjonssystem og vektorkonstruksjon

De to lineære rekombinante DNA fragmentene PHP19340A og PHP17752A ble, ved hjelp av restriksjonsenzymet *Asc I*, klippet ut av henholdsvis plasmidene PHP19340 og PHP17752, og deretter rensset (eluert fra agarosegel). DNA-fragmentene inneholder ikke antibiotikaresistensgen.

PHP19340A (2924 bp) inneholder et 591 bp *gm-fad2-1* genfragment fra kodingsområdet til ω -6 desaturase gen 1. Genfragmentet er koblet bak og dermed regulert av KTi3 promoteren. KTi3 promoteren fører preferensielt til transkripsjon i soyabønner (dvs. frøene). Gentranskriptet koder ikke for et funksjonelt enzym, men hemmer uttrykket (gene silencing) av det endogene *FAD2-1* genet, som koder for ω -6-desaturase-enzym. Dette enzymet blir normalt uttrykt hovedsakelig i frøene. Hemming av enzymet fører til økt nivå av oljesyre (C18:1), samt nedsatt nivå av linol (C18:2)- og linolensyre (C18:3) i frøene. PHP17752A (4512 bp) inneholder *gm-hra* genet (1971 bp). GM-HRA er et syntetisk acetolaktatsyntase enzym (ALS) som ikke hemmes av herbicider som hemmer enzymer i ALS-familien.

Begge fragmentene ble ko-transformerte inn i soyaceller fra foreldresorten ved hjelp av partikkelakselerasjonsmetoden. Transformanter ble selektert ved at de overlevde og vokste i nærvær av klorsulfuron.

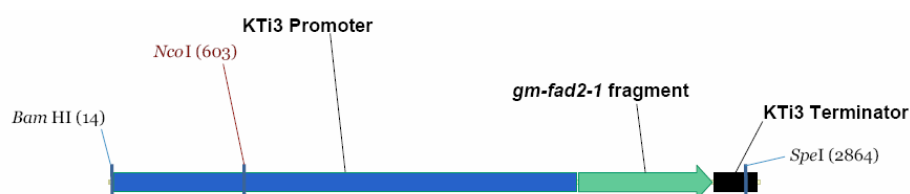
Karakterisering av geninnsettingen og genkonstruksjonen

Southern blot og PCR har blitt benyttet for å karakterisere de rekombinante DNA-fragmentene i planten. Molekylærbiologisk karakterisering viser at det er satt inn flere intakte og trunkerte kopier av det rekombinant DNA-fragmentet PHP19340A og et enkelt intakt kopi av det rekombinante DNA-fragmentet PHP17752A i soyaens genom.

De opprinnelige fragmentene fra plasmidene inneholder:

GM-FAD2-1 ekspressjonskassetten inneholder et 2924 bp lineært DNA fragment PHP19340A:

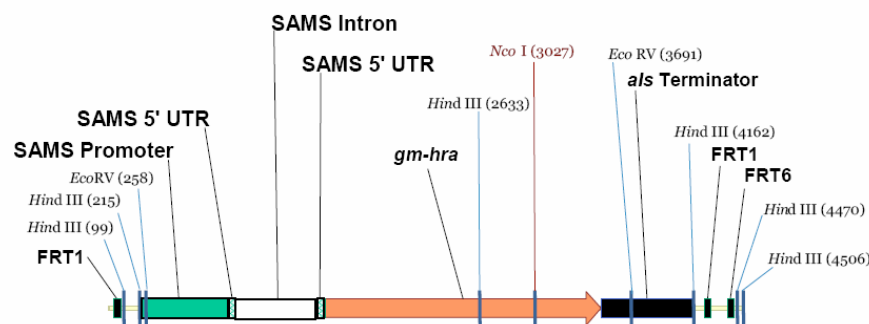
- | | |
|---------------------|--|
| a) <i>KTi3P</i> | promoter fra soya Kunitz trypsinhemmer gen 3 |
| b) <i>gm-fad2-1</i> | fragment på 597 bp fra soya mikrosomal ω -6-desaturasegen <i>FAD2-1</i> |
| c) <i>KTi3T</i> | terminator fra soya Kunitz trypsinhemmer gen 3 |



Figur 1. Rekombinant PHP19340A DNA-fragment brukt til modifisering av soyaens genom.

GM-HRA ekspresjonskassetten inneholder et 4512 bp lineært DNA fragment PHP17752A:

- a) *SAMS-P* promoter fra S-adenosyl-L-metioninsyntetase (SAMS) fra soyabønne
- b) *SAMS-5'UTR* øker transkripsjonen, fra soyabønne
- c) *SAMS-I* SAMS-intron, fra soyabønne
- d) *SAMS-5'UTR* øker transkripsjonen, fra soyabønne
- e) *gm-hra* en optimalisert form av endogent soyabønneacetolaktatsyntase gen (*gm-als*), inneholder overføringssekvenser til kloroplaster,
- f) *gm-als-T* endogen terminator fra *als*-genet, fra soyabønne.



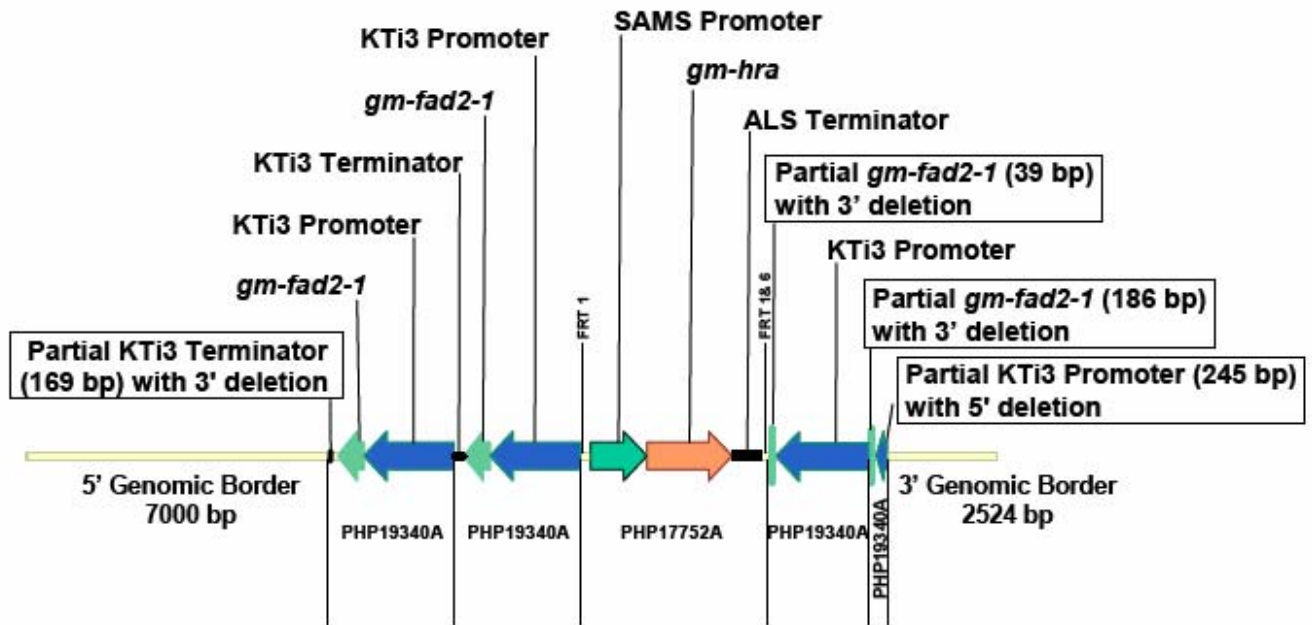
Figur 2. Rekombinant PHP197752A DNA fragment brukt til å modifisere soyaens genom.

Hele genomet fra soya 305423 ble kuttet med restriksjonsenzymene *Hind* III eller *Mbo* I. Fragmentene fra restriksjonskuttingen ble klonet inn i en cosmidvektor for å lage et cosmidbibliotek. Biblioteket ble undersøkt med en probe som bestod av et fragment fra KTi3 promoteren. Totalt ble det påvist tre unike kloner (51-21, 51-9 og H3IIBB19) fra *Hind* III-biblioteket, og to (mbo30 og mbo22) fra *Mbo* I-biblioteket. Disse molekylærbiologiske analysene viser at det er satt inn flere intakte og trukerte kopier av det rekombinant DNA-fragmentet PHP19340A (Innskuddsområdene 1, 2, 3, 4) og et enkelt intakt kopi av det rekombinante DNA-fragmentet PHP17752A (Innskuddsområde 1) i soyaens genom. De rekombinante fragmentene i planten inneholder de samme gener og/eller genelementer som er på det tilsvarende DNA fragmentet i plasmidene.

GM-HRA proteinet som uttrykkes i soya er undersøkt med Western-blot analyse og densitometri, SDS-PAGE og densitometri, trypsinbehandling av proteinet og peptidkartlegging med MALDITOF massespektrometri, Southern blot, analyse av N-enden til proteinet, samt glykosyleringsanalyse. Proteinene er undersøkt for enzymaktivitet. Analysene viser at GM-HRA proteinet er strukturelt og funksjonelt likt det *E. coli*-produserte proteinet som senere ble brukt i toksikologistudier på mus. Det ble ikke påvist glykosyleringssteder på proteinet. Southern-blot analysene er utført på DNA renses ut fra blad, og analysene er utført på generasjonene T4, T5 og F2.

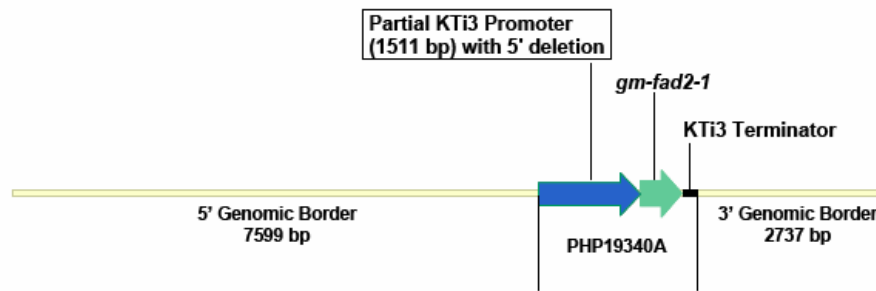
Karakterisering av de forskjellige innskuddsområdene

Innskuddsområde 1



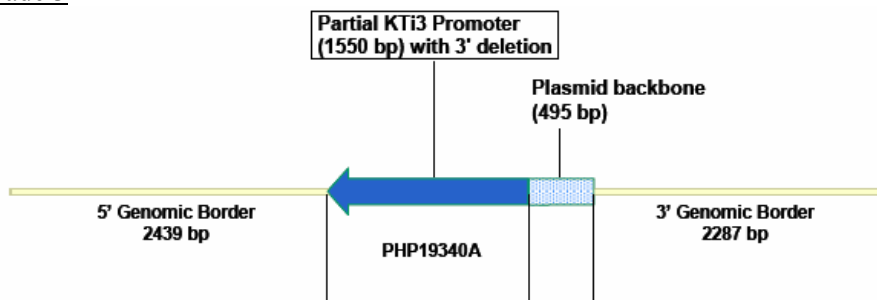
For dette innskuddsområde ble 22452 bp av soya 305423s genomsekvenser karakterisert med PCR, kloning av PCR-produktene og sekvensering. Karateriseringen omfatter 7000 bp genomisk DNA fra innskuddet 5'-flankeområdet og 2524 bp genomisk DNA fra 3'-flankeområde, samt 12928 bp av innsatt rekombinant DNA. Innskuddet inneholder ett intakt PHP19340A fragment og et enkelt intakt PHP17752A fragment, og tre trunkerte PHP19340A fragmenter. Det første trunkerte PHP19340A fragmentet inneholder en intakt KTi3 promoter, et intakt *gm-fad2-1* fragment, og en partiell KTi3 terminator (169 bp) med en 27 bp delesjon i 3' enden. Det andre trunkerte PHP19340A fragmentet inneholder en intakt KTi3 promoter, og et partielt *gm-fad2-1* fragment (39 bp) med en 558 bp delesjon i 3' enden. Det tredje trunkerte PHP19340A fragmentet inneholder en partiell KTi3 promoter (245 bp) med en 1839 bp delesjon i 5' enden, og et partielt *gm-fad2-1* fragment (186 bp) med en 411 bp delesjon i 3' enden.

Innskuddsområde 2



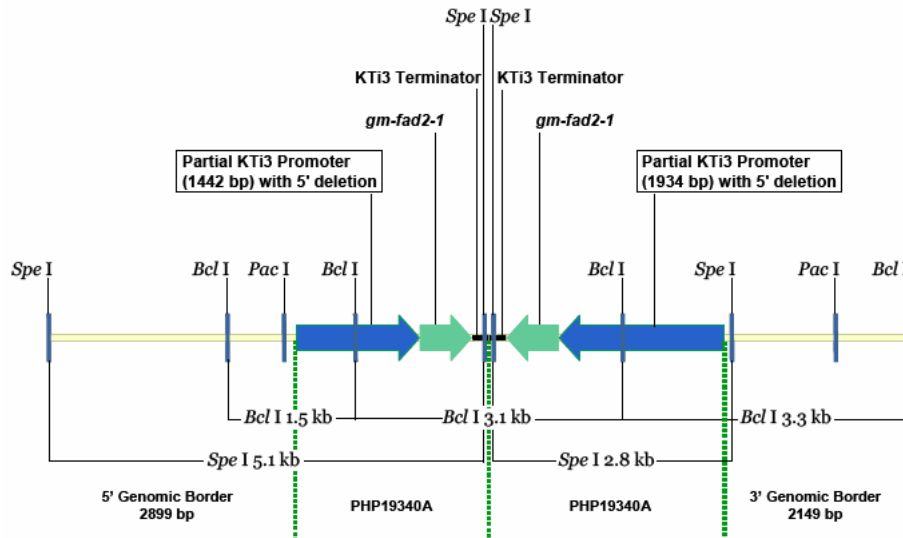
For dette innskuddsområde ble 12667 bp av soya 305423s genomsekvenser karakterisert med PCR, kloning av PCR-produktene og sekvensering. Karakteriseringen omfatter 7599 bp genomisk DNA fra innskuddet 5'-flankeområdet og 2737 bp genomisk DNA fra 3'-flankeområde, samt 2331 bp av innsatt rekombinant DNA. Innskuddet inneholder ett trunkert PHP19340A fragment: deler av KTi3 promoter (1511 bp) med en 573 bp delesjon i 5' enden, et intakt *gm-fad2-1* fragment (597 bp), og en intakt KTi3 terminator (196 bp).

Innskuddsområde 3



For dette innskuddsområde ble 6789 bp av soya 305423s genomsekvenser karakterisert med PCR, kloning av PCR-produktene og sekvensering. Karakteriseringen omfatter 2439 bp genomisk DNA fra innskuddet 5'-flankeområdet og 2287 bp genomisk DNA fra 3'-flankeområde, samt 2063 bp av innsatt rekombinant DNA. Innskuddet inneholder ett trunkert PHP19340A fragment: deler av KTi3 promoter (1550 bp) med en 534 bp delesjon i 3' enden og et 495 bp ikke-funksjonelt plasmid fragment. Dette plasmidfragmentet inneholder ikke replikasjonsorigo (*ori*) eller hygromycinresistensen (*hyg*).

Innskuddsområde 4



For dette innskuddsområde ble 10058 bp av soya 305423s genomsekvenser karakterisert med PCR, kloning av PCR-produktene og sekvensering. Karateriseringen omfatter 2899 bp genomisk DNA fra innskuddet 5'-flankeområdet og 2149 bp genomisk DNA fra 3'-flankeområde, samt 5010 bp av innsatt rekombinant DNA. Innskuddet inneholder to trunkerte PHP19340A fragmenter. Det trunkerte fragmentet som går fra 5' til 3' inneholder deler av KTi3 promoter (1442 bp) med en 642 bp delesjon i 5' enden, ett intakt *gm-fad2-1* fragment (597 bp) og en intakt KTi3 terminator (196 bp). Det andre trunkerte fragmentet som går 3' til 5' inneholder deler av KTi3 promoter (1934 bp) med en 150 bp delesjon i 5' enden, ett intakt *gm-fad2-1* fragment (597 bp) og en intakt KTi3 terminator (196 bp).

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

Søker opplyser om at nivået av uttrykk av GM-HRA-protein ble målt i prøver fra blad, røtter, hel plante og bønne fra feltforsøk i USA, Canada, Chile og Argentina. Forsøkene ble utført på henholdsvis fire og to lokaliteter i USA og Canada i 2005, og fire og to lokaliteter i Chile og Argentina i vekstsesongen 2005-2006. Det ble tatt ut fire prøver fra hvert feltforsøk. GM-HRA-proteinet ble detektert i alle undersøkte vev og organer. I de nordamerikanske forsøkene ble nivået av GM-HRA-protein i bønner fra usprøytede planter i gjennomsnitt målt til $2,5 \pm 1,1$ µg/g tørrvekt (variasjonsbredde = 0 – 4,9). I prøver fra herbicidbehandlede planter ble proteinmengden målt til gjennomsnittlig $2,5 \pm 0,54$ µg/g tørrvekt (variasjonsbredde = 1,7 – 3,5). Nivået av GM-HRA-protein i bønne fra ubehandlede planter ble målt til $2,1 \pm 0,46$ µg/g tørrvekt (variasjonsbredde = 1,0 – 2,9) i prøver fra feltforsøkene i Sør-Amerika. I prøver fra planter behandlet med herbicider ble innholdet av GM-HRA-protein målt til gjennomsnittlig $2,1 \pm 0,44$ µg/g tørrvekt (variasjonsbredde = 1,4 – 3,1).

Sekvenser til 5' og 3' genomisk grenseområde til innskuddsområdene 1, 2, og 3 til soya 305423 ble med PCR og sekvensering vist å være lik genomsekvenser som finnes i kontrollplantene. BLASTn analyse av 5' og 3' flankeområdene til disse innskuddene viser stor identitet til soya-genomsekvenser som foreligger i offentlige og proprietære databaser. Det ble påvist 27 åpne leserammer (ORF). Teoretisk sett uttrykker 25 av disse leserammene peptider som har 100 eller færre aminosyrer. To åpne leserammer større enn 100 aminosyrer ble påvist i områdene som omfatter forbindelsen mellom genomsekvenser og innskuddenes sekvenser. Genomisk 5'-flankesekvenser i innskuddsområde 4 viste stor likhet til 3 proprietære gensekvenser, mens sekvensering av 3' flankeområdet viste likhet til en proprietær gensekvens. Det ble ikke påvist ORF i flankesekvensene til innskudd 4.

BLASTn søkene er utført for om mulig å identifisere og undersøke for potensielle allergener, toksiner og proteiner av antinærings karakter er blitt utført. Teoretiske analyser av mulige polypeptider fra hver

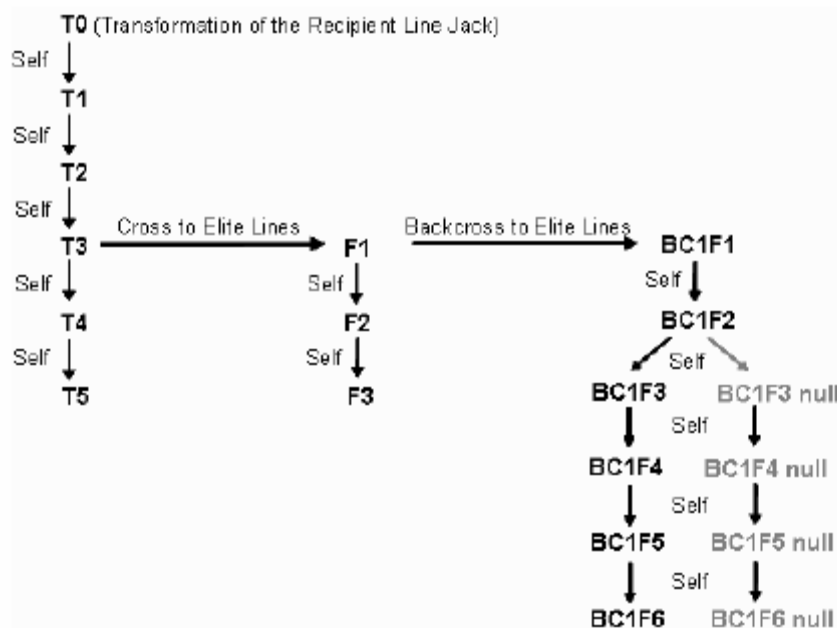
leseramme v.h.a. databasene allergen (FARRP6 database fra Nebraska universitet)- og toksin (NCBI-proteindatabase, SWISS-PROT, PIR, PRF, PDB) viser ingen biologisk relevante strukturelle likheter til allergener, antinæringsproteiner eller toksiner. Resultatene fra disse teoretiske analysene viser at det er lite sannsynlig at dersom noen av disse leserammene skulle bli transkribert vil det resultere i polypeptider som medfører potensielle toksiske, allergene eller uheldige helsemessige konsekvenser.

Hemming av endogent *KTi3* gen

Northern blot analyse viser at endogent *KTi3* gen hemmes av den rekombinante *KTi3* promoteren som er satt inn i soyaens genom. Analyser av trypsinhemmerproteinene viser at mengden av proteinet er statistisk lavere enn i umodifisert soya, gjennomsnittlig ca. 35 %.

Nedarving og stabilitet av innsatt DNA

I henhold til Pioneer har Southern blot vist at de rekombinante DNA-innskuddene er stabilt integrerte i genomet og også stabilt nedarvet over flere generasjoner (se figur 3). Basert på Southern blot-analyser og sekvensering er det påvist, intakt eller trunkert, åtte kopier av *KTi3* promoteren, syv kopier av *gm-fad2-1*-genfragment, fem kopier av *KTi3* terminator, samt én kopi av intakt PHP17752A rekombinant fragment. Spaltingsdata fra F2- generasjonen viste et forventet segregeringsmønster på 3:1 for innhold av oljesyre. Av de 100 undersøkte plantene ble det imidlertid påvist endret hybridiseringsmøter til *gm-hra* proben hos en enkelt plante. Undersøkelser med prober for SAMS og *als* terminator indikerer at i denne planten er hele *gm-hra* kassetten og deler av *KTi3* promoteren blitt fjernet, antageligvis ved rekombinasjon mellom to påfølgende *KTi3* promoterelementer som står foran *gm-hra* ekspresjonskassetten (se figuren i avsnittet Innskuddsområde 1). Pioneer har derfor undersøkt stabiliteten til de to ekspresjonskassettene i 305423. Det ble foretatt analyser av over 1000 planter over tre generasjoner (BC1F2, BC2F2 og BC3F2). De to ekspresjonskassettene ble påvist i alle plantene.



Figur 3. Kryssingsskjema for genmodifisert soyalinje 305423

Krysning over fem generasjoner viser at rekombinant *gm-fad2-1*, *gm-hra* og trunkerte fragmenter sannsynligvis er stabilt inkorporert i soyagenomet.

Delkonklusjon

Faggruppen har vurdert de fysiske, kjemiske og funksjonelle karakteriseringene av innskuddene og GM-HRA-proteinet, og finner at informasjonen er tilstrekkelig. Faggruppen konkluderer at karakteriseringen av det rekombinante innskuddet i soya 305423 er tilfredsstillende. På bakgrunn av påvist ustabilitet i genomet til soya 305423 mener imidlertid faggruppen at det må kreves av Pioneer å diskutere muligheten for om det kan skje andre genrekombinasjoner enn den påviste, og om slike eventuelt kan medføre endret helserisiko.

2.1.2 Foreldrelinje RR 40-3-2

Transformasjonssystem og vektorkonstruksjon

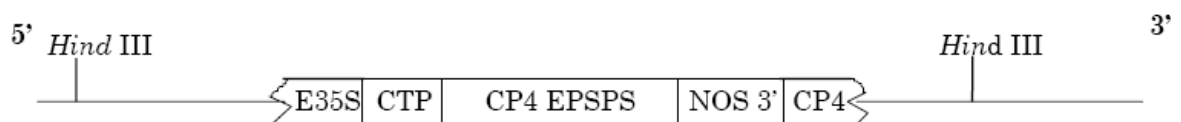
Monsantos soyalinje RR 40-3-2 er fremkommet ved at soyaceller fra den kommersielle sorten "A5403" er transformert ved hjelp av partikkelakselerasjon. I følge søkers dokumentasjon ble plasmidet PV-GMGT04 benyttet til transformasjonen av "A5403". Plasmidet inneholder tre ekspresjonskassetter, to kassetter av det syntetiske *cp4 epsps*-genet og en *uidA* kasett, som koder for β -D-glucuronidase(GUS) proteinet. Celler som hadde tatt opp det rekombinante fragmentet ble selektert på medium med glukuronid.

Karakterisering av geninnsettingen og genkonstruksjonen

Den molekylærbiologiske karakteriseringen viser at det er satt inn ett rekombinant DNA-fragment i soyaen. Fragmentet inneholder kun en ekspresjonskasett.

CP4 EPSPS-ekspresjonskasett (figur 4)

- E35S* promoter fra blomkål mosaikkvirus, 354 basepar(bp) fra 5'-enden er blitt fjernet ved innsetting av DNA-fragmentet
- CTP* kloroplast overføringspeptid-sekvens, basert på CTP-sekvens isolert fra *Petunia hybrida 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase* (*epsps*) gen.
- cp4 epsps* syntetisk versjon av glyfosat resistensgenet *cp4 epsps* fra den gram-positive jordbakterien *Agrobacterium* sp. strain CP4. Genet *cp4 epsps* uttrykker proteinet CP4 EPSPS.
- NOS3* terminatorsekvens fra *nopalinsyntase* genet
- CP4* 250 bp innskudd som ikke er funksjonelt



Figur 4. Rekombinant DNA fragment i planten, funksjonelt innskudd.

Molekylærbiologiske analyser viser at det rekombinante fragmentet i planten inneholder det samme genet og deler av andre genelementer som er på den ene av *cp4 epsps*-ekspresjonskassetten i plasmidet PV-GMGT04. RR 40-3-2 inneholder én funksjonell kopi av det innsatte rekombinante DNA-fragmentet. Ekspresjonskassetten på det rekombinante DNA-fragmentet i RR 40-3-2 uttrykker CP4 EPSPS-protein som er identisk med proteinet som uttrykkes i bakterien. Undersøkelse av 5'-flankesekvenser fra innsettingsstedet viser at *cp4 epsps*-kassetten ikke er integrert i et kodingsområde eller område med regulatoriske sekvenser. Analyser med Northern blot og hybridiseringsprober for om mulig å plukke ut spesifikke transkripsjonsenheter fra flankeområdene ved innsettingsstedet, viser at det ikke blir transkribert fra disse områdene. Analyser med Northern blot og *cp4 epsps* hybridiseringsprobe indikerer at et sekundære RNA transkript på 7,4 kb samt noen mindre transkript, kan bli transkribert fra E35S-promoterens gjennom NOS 3' terminatoren i 3'-enden av det rekombinante DNA-fragmentet, og inn i 40-3-2s genomområde. I henhold til Monsanto er det ved bruk av sensitiv Western blot analyse ikke påvist andre proteiner eller polypeptider enn det forventede 46 kDa CP4 EPSPS-protein.

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

Ekspresjonen av CP4 EPSPS-protein er målt i bønne og blad i feltforsøk i USA og Europa i perioden 1992 til 1998. Konsentrasjonen av proteinet varierer med vekstområde og årstid. I feltforsøkene som ble utført i EU i 1998 ble nivået av CP4 EPSPS-protein målt til henholdsvis 0,167 µg/g råvekt (variasjonsområde 0,086-0,270) og 0,502 µg/g råvekt (variasjonsområde 0,321-0,618) i blad og bønne. Analyse av CP4 EPSPS-protein i soyaprodukter påviser ikke proteinet i olje.

Søker har utført studier for å påvise åpne leserammer fra DNA-fragmentet og fragmentene på 72 kb og 250 kb. Det ble påvist flere åpne leserammer. Homologi til de hypotetiske uttrykte aminosyresekvensene som kan stamme fra disse åpne leserammene ble sammenlignet med aminosyresekvenser i sekvensdatabasene ALLPEPTIDE, TOXIN4 og UPDATE2 for homologi til proteiner. Det er ikke funnet sekvenshomologier til kjente toksiner og allergener. Resultater fra bioinformasjonsanalyser av DNA-sekvensene som flanker 72 bp og *cp4 epsps* fragmentene viser at genelementer som er nødvendige for transkripsjon av mRNA enten ikke er tilstede eller ut av kontekst for funksjonalitet. Dersom hypotetiske uttrykte polypeptider kan avskrives enten fra 72 bp eller fra *cp4 epsps* fragmentene og de respektive tilstøtende flankerende sekvensene, har ikke disse polypeptidene immunologiske relevante sekvenser, strukturelle homologier til kjente allergener eller sekvenser som er strukturelt homologe med toksiner eller andre proteiner assosiert med dyr og human helserisiko. Monsanto har på anmodning fra EFSA utført i 2007 og 2008 BLASTX og BLASTn analyser av 5'- og 3'-flankeender til *cp4 epsps* – og 72 bp fragmentet for om mulig å påvise om endogene åpne leserammer er blitt splittet. Monsanto hevder at så ikke er skjedd.

Nedarving og stabilitet av innsatt DNA

Pioneer har undersøkt stabiliteten til *CP4 EPSPS*-ekspresjonskassetten i RR 40-3-2. I henhold til dokumentasjonen har Southern blot, Northern blot, ELISA og PCR vist at det rekombinante DNA-fragmentet er stabilt integrert i genomet og at det er stabilt nedarvet over flere generasjoner.

Analyserer av stabilitet av det rekombinante DNA-fragmentet og 72bp-fragmentet over en femårs periode viser at DNA-innskuddene er stabilt integrert i RR 40-3-2 genomet, og at de har vært til stede siden planten ble klonet. Det anføres også at det er utviklet over ett tusen sorter av utgangslinjen Resnick 40-3-2 BC/F2 fram til i dag. Produktet har derfor en relativ lang historie med tilsynelatende sikker kommersiell bruk.

Cp4 epsps-genets funksjon i soya.

Cp4 epsps-genet som koder for enzymet EPSPS (5-enol-pyruvylsikat-3-fosfat syntetase) er isolert fra bakterien *Agrobacterium* sp. Alle planter, bakterier og sopp inneholder EPSPS-enzymet. CP4 EPSPS er ikke nært beslektet i aminosyrehomologi til andre beskrevne EPSPS-enzymet. CP4 EPSPS er ikke mer enn 51.1 % lik og 26.0 % identisk med EPSPS i planter og 59.3 % lik og 41.1 % identisk med EPSPS i andre bakterier. EPSPS er et av enzymene i den aromatiske aminosyrebiosynteseveien,

og enzymet er essensielt i syntese av proteiner. EPSPS-enzymet omdanner fosfoenolpyruvat og sikimat-3-fosfat til 5-enolpyruvylsikimat-3-fosfat, en viktig metabolitt i syntesen av aromatiske aminosyrer. I motsetning til plantens enzym er det bakterielle enzymet også aktivt ved nærvær av N-fosfonometylglucosylamin (virkestoffet glyfosat). Herbicidet glyfosat er en kompetitiv hemmer for fosfoenolpyruvat på det aktive setet til andre EPSPS enzymer. EPSPS er det eneste målproteinene for glyfosat i planter, og glyfosat hemmer dette enzymet slik at planten ikke kan danne aromatiske aminosyrer. De transgene plantene vil derfor tolerere høyere doser av herbicider med virkestoff glyfosat sammenlignet med konkurrerende ugras.

Metabolisme av glyfosat i planter

Studier viser at glyfosatmetabolismen er den samme i glyfosattolerante- og nontolerante planter (Komōβα *et al* 1992). Glyfosat (N-fosfonometylglucosylamin) metaboliseres i planter til aminometyl-fosforsyre (AMPA) og glycolysyre. Innhold av AMPA i planter er fra 7-50 % av glyfosatmengden, avhengig av plantevevet. AMPA konjugeres til lave, men sporbare mengder N-acetyl-AMPA, N-glyceryl-AMPA, N-metyl-AMPA og N-malonyl-AMPA. Ingen av disse metabolittene kan påvises i større mengder enn 2 %. Studier viser at et karbonfragment som inneholder ett karbon, inkorporeres i naturlige bestanddeler i planten, eksempelvis aminosyrer og organiske syrer (Komōβα *et al* 1992).

Undersøkelser av olje fra både soyabønne og raps viser at verken glyfosat, AMPA eller dets konjugater kan påvises i oljen. ¹⁴C-merket glyfosat viser at et karbonfragmentet som inneholder ett karbon, inkorporeres i palmitin-, linol-, linolen- og oljesyre. Det antas at metabolitter av glyfosat omdannes videre til acetyl-CoA, som derved bygges inn i plantens byggesteiner.

2.2. Hybriden 305423 x 40-3-2

Molekylær karakterisering

Soyalinjen 305423x40-3-2 er dannet ved konvensjonell kryssing mellom soyalinjene 305423 og RR 40-3-2. Molekylærbiologiske analyser viser at de rekombinante fragmentene i planten inneholder de samme gener og genelementer som er i foreldrelinjene 305423 og RR 40-3-2. Ekspresjonen av både CP4 EPSPS- og GM-HRA-proteinene i soyaen er undersøkt med Northern-blot analyse, protein-ekspresjonsanalyse (ELISA-blot) og analyse av agronomiske karakterer. Northern blot analysen med *gm-fad2-1* og *KTi3* riboprober viser at endogent *FAD2-1* og *KTi3* gentranskripsjon blir effektivt hemmet. Northern blot analysen viser også at uttrykket av genene *FAD2-2* og *FAD3* ikke hemmes av *gm-fad2-1* fragmentet. Southern blot og event-spesifikk PCR analyse utført på 65 planter av 305423 x 40-3-2 viser at de respektive innsatte gener og genelementer er stabilt inkorporert i soyaens genom. Southern analyser med *cp4 epsps*-genprobe viser ingen binding til DNA fra 305423 og umodifisert kontroll. Flankerende sekvenser til de rekombinante DNA-fragmentene i 305423 x 40-3-2 er ikke sekvensert. Siden 354023 x 40-3-2 er fremkommet ved konvensjonell kryssing mellom 354023 og RR 40-3-2 hevder Pioneer at sekvensene i og rundt de respektive fragmentene er uendret. For andre analyser for eksempel åpne leserammer henviser Pioneer til de respektive søknadene for 305423 og 40-3-2.

Analyser av enzymatisk aktivitet av CP4 EPSPS-proteinet som er dokumentert i søknad for RR 40-3-2 viser ingen forskjell mellom plante- og bakterieprodusert protein. For fordøyelighetstest viser Pioneer til OECDs konsensusdokument om gener og enzymer som gir toleranser overfor glyfosat (OECD 1999). I OECD-dokumentet henvises det til at CP4 EPSPS-proteinet fordøyes raskt i simulert mage- og tarmsaft. For GM-HRA henvises det til søknaden om markedsføring av 305423.

Informasjon vedr. uttrykk av introduserte gener

Søker opplyser om at uttrykk av proteinene GM-HRA og CP4 EPSPS ble målt i fire feltforsøk i USA og to feltforsøk i Canada i 2005. Forsøkene ble lagt ut på 6 ulike lokaliteter i form av fullstendig randomiserte blokkdesign med 3 gjentak. En ikke-transgen soya med tilsvarende genetisk bakgrunn ble brukt som kontroll. I tillegg var foreldrelinjene 305423 og RR 40-3-2 inkludert i forsøkene. Det ble

foretatt analyser av prøver fra fôr, blad, røtter, og frø på til sammen 4 ulike utviklingsstadier. I tillegg er det tatt ut prøver fra planter sprøytet med glyfosat, ALS-hemmende herbicider samt glyfosat + ALS-hemmende herbicider. I følge dokumentasjon fra søker var nivåene av målte proteinprodukter i vegetativt vev og frø i overensstemmelse med variasjonsområdene for de respektive foreldrelinjene. Nivåer av GM-HRA- og CP4 EPSPS-protein i frø er vist i tabell 1.

	Mean protein expression level (ng/mg tissue dry weight) ^a	Standard deviation	Min/max range (ng/mg tissue dry weight)
GM-HRA protein			
Non-sprayed 305423x40-3-2 soybean	3.1	0.85	1.9 – 4.6
305423x40-3-2 soybean + glyphosate	2.9	1.1	1.8 – 6.1
305423x40-3-2 soybean + ALS-inhibiting herbicides	2.8	0.86	1.9 – 5.1
305423x40-3-2 soybean + glyphosate + ALS-inhibiting herbicides	2.7	1.0	1.8 – 5.9
Non-sprayed 305423 soybean	2.5	1.1	0 – 4.9
305423 soybean + ALS-inhibiting herbicides	2.5	0.54	1.7 – 3.5
CP4 EPSPS protein			
Non-sprayed 305423x40-3-2 soybean	410	70	320 – 520
305423x40-3-2 soybean + glyphosate	410	90	300 – 670
305423x40-3-2 soybean + ALS-inhibiting herbicides	380	50	310 – 460
305423x40-3-2 soybean + glyphosate + ALS-inhibiting herbicides	400	70	310 – 550
Non-sprayed 40-3-2 soybean	320	50	220 – 430
40-3-2 soybean + glyphosate	340	70	230 – 500

^aValues are means across all six sites.

Tabell 1. Ekspresjonsnivå av proteinene GM-HRA og CP EPSPS i hybriden 305423 x 40-3-2, og foreldrelinjene 305423 og RR 40-3-2 med ulike herbicidregimer.

Nedarving og stabilitet av innsatt DNA

Søker viser til spaltingsdata fra kryssinger over flere generasjoner med foreldrelinjene 305423 og RR 40-3-2 og resultater fra en kryssingsgenerasjon med hybridene for å demonstrere genetisk stabilitet. Videre viser Southern analyser av de rekombinante innskuddene i 305423 x 40-3-2-genomet at det er molekylær ekvivalens og identisk kopitall med de rekombinante DNA- innskuddene i foreldrelinjene. Det er ikke påvist tilsvarende instabilitet av *gm-hra* ekspresjonskassetten som påvist i soya 305423.

Delkonklusjon

Hybridene 305423 x 40-3-2 er dannet ved konvensjonell kryssing mellom soyalinjene 305423 og 40-3-2. Spaltingsdata, Northern- og Southern-analyser indikerer at de innsatte strukturene nedarves stabilt, og at antall, struktur og organisering av disse genkonstruksjonene er ekvivalent med de som finnes i foreldrelinjene. Nivåene av GM-HRA- og CP4 EPSPS-proteiner i vegetativt vev og frø er sammenlignbare med uttrykk av tilsvarende proteinprodukter i foreldrelinjene.

Faggruppen har vurdert de fysiske, kjemiske og funksjonelle karakteriseringene av innskuddene og GM-HRA-proteinet, og finner at informasjonen er tilstrekkelig. Faggruppen konkluderer at karakteriseringen av de rekombinante innskuddene i soya 305423 x 40-3-2 er tilfredsstillende.

3. Komparative analyser

3.1. Valg av komparator og forsøksdesign

I følge dokumentasjon fra Pioneer er det foretatt analyser av ernæringsmessige viktige komponenter og registreringer av agronomiske karakterer i feltforsøk med hybridlinjen 305423 x 40-3-2 i USA og Canada i 2005. I tillegg ble agronomiske karakterer vurdert i forsøk i Argentina og Chile vekstsesongen 2005-2006. De nordamerikanske forsøkene var lagt ut på fire lokaliteter i USA og to lokaliteter i Canada. Hvert forsøksfelt bestod av et fullstendig randomisert blokkdesign med fire blokker. I tillegg ble det benyttet en ikke-transgen soyalinje som kontroll. I disse forsøkene ble det ikke foretatt analyser mht ernæringsmessige komponenter av foreldrelinjene 305423 og 40-3-2.

I forsøksfeltene i USA og Canada ble testlinjen behandlet med herbicider to ganger i løpet av vekstsesongen (henholdsvis vekststadium V2 og V5). På disse feltene ble det benyttet henholdsvis glyfosat, klorimuron + tifensulfuron, og en blanding av glyfosat, klorimuron og tifensulfuron. Det ble tatt ut prøver til analyser av ernæringsmessige komponenter fra tre av fire blokker fra hvert forsøksfelt. Prøver fra den fjerde blokken ble benyttet til studier av ekspresjon av proteinene GM-HRA og CP4 EPSPS.

I tillegg henviser søker til en rekke studier av foreldrelinjene 305423 og RR 40-3-2 i felt, samt at det har vært kommersiell dyrking av RR 40-3-2 i en rekke land siden 1996.

Statistiske analyser

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

3.2. Analyser av ernæringsmessige komponenter

Hovedkomponenter i soyabønne og fôr

Valget av analyseparametre er gjort i henhold til OECDs konsensusdokument for soya (OECD 2001). Søker har foretatt forskjellige analyser av hovedkomponenter av fôr- og bønne-fraksjonen. Når det gjelder fôr ble det analysert for innhold av aske, fett, protein, total fiber, ADF (acid detergent fibre), NDF (neutral detergent fibre), og karbohydrater. For bønne ble det analysert for følgende parametre: protein, fett, aske, karbohydrater, ADF, NDF, total fiber, karbohydrater, aminosyrer, fettsyrer (C8-C22), fosfor, jern, kalium, kalsium, kobber, magnesium, mangan, natrium, sink, vitaminene B1, B2, totalt E, α -tokoferol, β -tokoferol, δ -tokoferol, γ -tokoferol og folinsyre, isoflavonene genistin, genistein, malonylgenistin, acetylgenistin, daidzin, daidzein, malonyldaidzin, acetyldaidzin, glycitin, glycitein, malonylglycitin, acetylglycitin, oligosakkaridene sukrose, raffinose og staktyose, samt de sekundære metabolittene og anti-næringsstoffene coumestrol, lektiner, trypsinhemmer og fytinsyre. Analysene ble utført under god laboratoriepraksis (GLP).

Det ble funnet signifikante forskjeller for komponentene aske, protein, total fiber, og karbohydrater i bønnefraksjonen.

Fettsyresammensetning i soyabønne

Fettsyresammensetningen i soya 305423 x 40-3-2 ble målt i henhold til OECDs konsensusdokument for soya. Søker har analysert innhold av totalt 25 fettsyrer. Av disse ble 10 ekskludert fra de statistiske analysene fordi mengdene var lavere enn deteksjonsgrensene. Hensikten med genmodifiseringen av soya 305423 er å øke mengden av oljesyre. Oljesyre (C18:1) danner linolsyre (C18:2) ved at ω -6-desaturase danner en dobbeltbinding i C18:1-fettsyren, mens linolsyre danner linolensyre (C18:3) ved danning av enda en dobbeltbinding. Hemming av syntesen av linolsyre fører dermed til økt innhold av oljesyre, og nedsatt mengde av både linol- og linolensyre. Det er forventet og funnet store signifikante forskjeller i innholdet av olje- og linolsyre i 305423 x 40-3-2 sammenlignet med kontroll. Innholdet av oljesyre i 305423 x 40-3-2 er gjennomsnittlig økt med 350 % i forhold til umodifisert kontroll, mens linolsyre og linolensyre er redusert med henholdsvis ca. 90 % og ca. 40 %. Statistiske analyser over lokaliteter viser, med unntak av en fettsyre, signifikante forskjeller mellom testlinje og kontroll. For fettsyrene myristin-, palmitin-, heptadekan (C17:0)-, heptadeken (C17:1)-, stearin-, olje-, linol-, linolen- og eikosamonoensyre ble det påvist signifikante forskjeller i alle seks feltene. Alle verdiene, med unntak for heptadekan-, heptadeken-, olje- og linolsyre, ligger imidlertid innenfor typiske verdier for andre soyasorter som er rapportert i litteraturen.

Pioneer har vurdert biologisk betydning og foretatt eksponeringsvurdering av C17:0- og C17:1- syrene i olje fra soya 305423 x 40-3-2, og sammenlignet inntaket av disse fettsyrene fra soya 305423 x 40-3-2 med det generelle inntaket i vegetabilsk olje, smør, ost og kjøtt. Pioneer konkluderer med at mengdene av disse fettsyrene i soya 305423 x 40-3-2 er lik eller lavere enn i disse matvarene. Inntak av disse fettsyrene fra olje fra 305423 x 40-3-2 utgjør således ikke økt inntak i forhold til det generelle inntaket fra vegetabiliske oljer, smør, ost og kjøtt.

Aminosyrer i soyabønne

Både essensielle og ikke-essensielle aminosyrer ble analysert. Analysene ble gjort i henhold til OECDs konsensusdokument for soya (OECD 2001). Med unntak for asparaginsyre ble det ikke funnet statistiske signifikante forskjeller mellom testlinje og kontroll. De forskjellene som er påvist i asparaginsyre, ble påvist bare i ett av seks forsøksfelt.

Vitaminer

I følge OECDs konsensusdokument er det ikke nødvendig å analysere for innhold av vitaminer i soya. OECD henviser til USDA Nutrient Database for Standard Reference, Release 13 (USDA-ARS 1999). I henhold til dokumentasjon fra søker er det foretatt analyser av følgende vitaminer: B1, B2, totalmengde vitamin E, α -tokoferol, β -tokoferol, δ -tokoferol, γ -tokoferol og folinsyre. Det ble funnet statistisk signifikante forskjeller for B2, totalmengde vitamin E og γ -tokoferol. De statistiske forskjellene ble observert på henholdsvis tre, tre og fire lokaliteter av de seks lokalitetene. For de fleste vitaminene som er målt ligger verdiene innenfor typiske verdier som er rapportert i litteraturen.

Mineraler

I følge OECDs konsensusdokument for soya er det ikke nødvendig å analysere for innhold av mineraler i soya. OECD henviser til USDA Nutrient Database for Standard Reference, Release 13 (USDA-ARS 1999).

Søker oppgir at det er foretatt analyser av mineralene fosfor, jern, kalium, kalsium, kobber, magnesium, mangan, natrium og sink. Det er påvist statistisk signifikante forskjeller mellom test- og kontrolllinje for innhold av kalsium. Det er imidlertid ikke funnet statistiske forskjeller innenfor tre av seks lokaliteter. Verdiene for alle mineralene ligger innenfor typiske verdier som er rapportert i litteraturen.

Sekundære metabolitter og antinæringsstoffer

Valget av analyseparametere er gjort i henhold til OECDs konsensusdokument for soya (OECD 2001). Det ble påvist statistisk signifikante forskjeller mellom testlinje og kontroll for parameteren

trypsinhemmer, om lag 30 % lavere innhold i 305423 x 40-3-2. Verdiene ligger imidlertid innenfor typiske verdier som er rapportert i litteraturen. Nivået av coumesterol var lavere enn påvisningsgrensen. Det ble ikke påvist statistisk signifikante forskjeller for lektiner og fytinsyre.

Isoflavoner

Valget av analyseparametere er gjort i henhold til OECDs konsensusdokument for soya (OECD 2001). Nivåene av acetyldaidzin, acetylgenistin og acetylglycitin var under påvisningsgrensene. For parameterne genistin, genistein, malonylgenistin, daidzin, daidzein, malonyldaidzin og glycitein ble det ikke påvist statistisk signifikante forskjeller mellom testlinje og kontroll, mens det ble funnet statistisk signifikante forskjeller for glycitin og malonylglycitin på henholdsvis fem og to av de seks lokalitetene.

Oligosakkarider

Valget av analyseparametere er gjort i henhold til OECDs konsensusdokument for soya (OECD 2001). Det ble ikke funnet statistisk signifikante forskjeller for oligosakkaridene sukrose, raffinose og stakiose.

3.3. Agronomiske egenskaper

Søker opplyser om at det er foretatt observasjoner av agronomiske karakterer i feltforsøk med soyalinjen 305423 x 40-3-2 på 6 lokaliteter i USA og Canada i 2005, og 6 lokaliteter i Argentina og Chile i vekstsesongen 2005-2006. For øvrig beskrivelse av forsøksmetodikk og sprøyteregimer, se kap. 3.1. I henhold til søkers dokumentasjon er det foretatt registreringer av en rekke karakterer knyttet til reproduksjon, spredning, vegetativ vekst, samt sjukdoms- og insektsresistens. Det er foretatt statistiske analyser innen steder og separate kombinerte analyser over steder for forsøkene i henholdsvis Nord- og Sør-Amerika. Analyser fra forsøkene i Canada og USA viste signifikante forskjeller mellom den transgene linjen og kontrollsorten med hensyn på spireprosent ($p \leq 0,05$). I følge søker ligger imidlertid gjennomsnittsverdien for denne parameteren innenfor forventet variasjonsområde for soya. Det ble ikke funnet signifikante forskjeller mellom 305423 x 40-3-2 og kontrollinjen i de søramerikanske forsøkene.

3.4. Delkonklusjon

Analysene av ernæringsmessige viktige komponenter viser statistiske signifikante forskjeller i enkeltparametre. Foreldrelinjen 305423 er modifisert for høyt innhold av fettsyren oljesyre, noe som fører til forholdsvis lavt innhold av fettsyren linolsyre og redusert mengde linolensyre. Verdiene for de fleste andre analyserte komponentene ligger imidlertid innenfor typiske verdier for andre soyasorter som er rapportert i litteraturen. Resultatene fra undersøkelsene av agronomiske karakterer viser små eller ingen forskjeller mellom 305423 x 40-3-2 og kontrollinjer.

Faggruppen mener at endringen i fettsyreprofil medfører en matolje med betydelig endret næringsverdi. Faggruppen anser at disse forskjellene ikke har noen negativ helsemessig konsekvens.

4. Dokumentasjon av toksisitet, allergisitet og næringsverdi

4.1. Toksisitet

Når det gjelder toksisitetssudier med CP4 EPSPS-protein henviser Pioneer til studier som er dokumentert i OECDs konsensusdokument om gener og tilhørende uttrykte proteiner som gir toleranse mot glyfosat (OECD 1999).

Akutt oral fôringsstudie på mus med renfremstilt GM-HRA protein.

Pioneer utførte i 2005 akutt oral fôringsstudier på mus med renfremstilt GM-HRA produsert av *E. coli*. Undersøkelsene er dokumentert i søknaden for foreldrelinjen 305423 (EFSA/GMO/NL/2007/45). Studiene er utført i henhold til retningslinjene fra EPA (OPPTS 870.1100), EEC (B.1) og OECD (akutt toksisitetstest nr. 401). I studiene ble det benyttet 5 hann- og 5 hunnmus. Som kontroll ble det benyttet serumalbumin. GM-HRA- og serumalbumindosen var på henholdsvis 582 og 2000 mg/kg kroppsvekt. Etter en 14-dagers observasjonsperiode ble alle dyrene avlivet. Patologiske undersøkelser viste ingen testrelaterte skader på dyrene.

Fôringsforsøk på mus 28 dager

GM-HRA

Pioneer hevder at fordi GM-HRA enzymet er svært lik de fleste ALS-enzymene er det ingen grunn til å foreta 28-dagers fôringsforsøk på mus.

Fôringsforsøk på broiler

Søknaden inneholder dokumentasjon på et 42-dagers fôringsforsøk på hann- og hunnbroilere, 720 dyr, fordelt i seks grupper á 120 dyr. Dyrene ble fôret med soyamel fra henholdsvis 305423 x 40-3-2 uten herbicidbehandling, 305423 x 40-3-2 sprøytet med en blanding av glyfosat, klorimuron og tifensulfuron, en umodifisert kontrollsort (0911) og tre kommersielle, umodifiserte referansesorter (93B86, 93B15, 93M40). Fuglene ble observert daglig, og vektøkning, fôrintak og fôrutnyttelse ble målt. Etter 6 uker, da fuglene er ferdig med vekstfasen, ble dyrene avlivet. Major og minor pectoralis fra høyre side, samt buk fettet ble tatt ut og veid. Der ble ikke påvist signifikante forskjeller mellom gruppene med hensyn på brystmuskelvekt og buk fettvekt, enten som absolutt vekt eller relatert til kroppsvekt. Det ble ikke påvist andre statistisk signifikante endringer ved fôring med soyabønne fra soya 305423x40-3-2 med og uten herbicidbehandling, sammenlignet med referansesorter og umodifisert kontroll.

Subkronisk fôringsforsøk på rotter

Søker har ikke utført 13 ukers fôringsforsøk med fôr fra hybrid 305423x40-3-2.

Det er imidlertid utført et 13 ukers fôringsforsøk med foreldrelinjen 305423. Studien omfattet 3 grupper med hann- og hunnrotter, á 12 rotter/kjønn. Dyrene ble fôret med henholdsvis 20 % soyamel samt 1,5 % malt søyabønnebelg fra henholdsvis 356043, 356043 sprøytet med glyfosat/klorimuron og thifensulfuron (= 356043+Gly/SU), en umodifisert kontrollsort (091) og tre kommersielle umodifiserte referansesorter (93B86, 93B15, 93M40). Det ble utført makroskopiske og mikroskopiske undersøkelser av organene, samt klinisk-patologisk undersøkelser av urin og blod fra alle dyrene i hver gruppe. Det ble ikke påvist noen statistisk signifikante endringer i de undersøkte parametrene. Det funnet signifikante forskjeller for 356043+Gly/SU mht MCV og MCH for hunnrotter på testdag 96/97 sammenlignet med kontrollsoya 091, og for hannrotter mht blod-urea-notrogen (BUN) på testdag 94/95 sammenlignet med kontrollsoya 091. Tilsvarende endringer er ikke påvist hos hannrotter (MCV og MCH) og hos hunnrotter (BUN). Fôringsforsøket er blitt utført i henhold til GLPS (U.S. EPA FIFRA 40 CFR part 160), OECDs retningslinjer nummer 408 subkroniske tester på dyr (Guidelines for Testing of Chemicals, Health Effects Test Guidelines, Section 408), U.S. EPA, OPPTS 870.3100 90-Day Oral Toxicity in Rodents, Health Effects Test Guidelines (1998) og Commission Directive 2001/59/EC, Part B.26, Methods for the Determination of Toxicity (2001).

Tilsvarende henviser søker til 13 ukers fôringsforsøk, og 15 ukers fôringsstudie med foreldrelinjen 40-3-2 for se på immunologiske parametere.

4.2. Allergenitet

Pioneer henviser til søknad om markedsføring av foreldrelinjene 305423 (EFSA/GMO/NL/2007/45) og RR 40-3-2 (EFSA/GMO/NL/2005/24) for undersøkelser av allergenitet. Studier har vist at i 305423 og RR 40-3-2 er de endogene allergenene ikke blitt endret. Siden 305423x40-3-2 er

fremkommet ved tradisjonell kryssing hevder Pioneer at det ikke kan forventes endring i endogene allergener i 305423x40-3-2.

Fordøyelighetstester av GM-HRA og CP4 EPSPS viser at proteinene fordøyes raskt i simulert magesaft og tarmsaft. Proteinene degraderes fullstendig i løpet av 15 sekunder. Generelt er stabiliteten til allergene proteiner lenger enn 2 minutter i simulert magesaft. De fleste allergene proteiner er vanligvis stabile i minst 60 minutter. Det ble konkludert med at hybridlinjen 305423x40-3-2 ikke er mer allergen enn de respektive foreldrelinjene.

4.4. Delkonklusjon

Soyalinjen 305423 x 40-3-2 uttrykker et nytt protein, og faggruppen mener, med unntak av ett medlem, at det bør utføres sub-kronisk føringsforsøk på rotter.

4.3. Ernæringsmessig vurdering av den genmodifiserte soyalinjen 305423 x 40-3-2

Vurdering vedrørende endring av fettsyreprofil

For at soyaolje fra umodifisert soya skal være egnet til industriell steking og fritering, for eksempel til chips, må den herdes (hydrogeneres). Ved herdingsprosessen dannes det transfettsyrer. Transfettsyrer dannes også ved oppheting til høye temperaturer. Økt mengde oljesyre i soyaolje viser at oljen blir mer varme- og oksydasjonsstabil i forhold til vanlig soyaolje.

Kontrollerte intervensjonsstudier på mennesker indikerer at inntak av mat som inneholder transfettsyrer konsekvent leder til forhøyede nivåer av blodlipider, spesielt LDL-kolesterol (low-density-lipoprotein-kolesterol) sammenlignet med cis-monoumettet (for eksempel oljesyre) og cis-polyumettet fett (for eksempel linolensyre) (EFSA 2004b). Det er vist at forøket LDL-kolesterol i blodet har sammenheng med økt forekomst av hjerte- og karsykdom (EFSA 2004b). Ved å erstatte transfett med enumettet fett (i hovedsak oljesyre) og flerumettet fett (både vegetabiliske og marine flerumettede fettsyrer) senkes forholdet mellom konsentrasjonene av LDL-kolesterol og HDL-kolesterol (high-density-lipoprotein-kolesterol) i serum (LDL/HDL-ratio) og slik reduseres risikoen for å utvikle hjerte- og karsykdom (Alexander *et al.* 2006). Ved bruk av soyaoljer med økt innhold av oljesyre i matvareproduksjon, for eksempel til steking og fritering, antyder denne dokumentasjonen at i forhold til bruk av konvensjonell soya som må herdes, vil inntak av stekt/fritert mat produsert av soyaolje med høyere innhold av oljesyre sannsynligvis føre til nedsatt mengde LDL-kolesterol og dermed gunstig effekt på LDL/HDL-ratio i blod.

Faggruppe for genmodifiserte organismer konkluderer med ved fritering vil olje fra soya 305423x40-3-2 medføre redusert nivå av transfettsyrer sammenlignet med olje fra umodifisert soya.

5. Miljørisikovurdering

Pioneer Hi-Bred Int. sin søknad om godkjenning av den transgene soyalinjen 305423x40-3-2 under forordning 1829/2003/EF omfatter bruksområdene næringsmidler, fôrvarer, import og prosessering. Søknaden gjelder ikke dyrking. Miljørisikovurderingen av 305423x40-3-2 er derfor avgrenset til mulige effekter av utilsiktet frøspredning i forbindelse med transport og prosessering til mat, fôr og industrielle formål. I tillegg vil indirekte eksponering gjennom gjødsel fra husdyr fôret med genmodifisert soya representere en mulig kilde til uønsket genspredning.

5.1. Potensiale for ikke intenderte effekter på fitness relatert til genmodifiseringen

Soya (*Glycine max* (L.) Merr.) er stedegen i nordlige - og sentrale deler Kina, og regnes som en av verdens eldste kulturplanter (OECD 2000). Planten dyrkes kommersielt i over 35 land, med USA, Kina, Nord- og Sør-Korea, Brasil og Argentina som de dominerende produsentlandene (FAOSTAT 2006). I Europa dyrkes det soya først og fremst i Italia, Romania, Frankrike, Ungarn og Østerrike. Det er ingen produksjon av soya i Norge.

Dyrket soya er en ettårig art med nesten utelukkende selvbefruktning (~99 %) (Lu 2005). Frø av dyrkede former av soya har normalt ingen form for frøkvile. Lav frosttoleranse, predasjon, råte og spiring gjør at soyafrøene normalt ikke vil overleve til neste vekstsesong. Kravet til spiretemperatur er høyt og frøplantene er dessuten svært sensitive for lave temperaturer. Planten krever lang vekstsesong for frømodning. Under norske vekstforhold vil derfor eventuell planter spirt fra spillfrø ikke kunne reproducere.

Til tross for omfattende dyrking over mange år i Europa og USA er det ikke påvist noen risiko knyttet til spredning, etablering og invasjon av naturlige habitater eller andre arealer utenfor jordbruksområder. Det er ingen stedegne eller introduserte viltvoksende arter i den europeiske flora som soya kan hybridisere med (OECD 2000). Soya hybridiserer med andre ettårige arter i underslekten *Soya*, dvs. den viltvoksende arten *G. soja* og ugrasformen *G. gracilis*. Begge artene er endemiske i Asia, og det er ikke observert forekomster av naturaliserte populasjoner verken i Europa eller Amerika (OECD 2000). Det er ikke rapportert om spontant hybridisering mellom soya og flerårige arter i underslekten *Glycine*.

Spredning av soya til andre habitater i Europa er i hovedsak begrenset av manglende frøkvile, liten toleranse for lave temperaturer og dårlig konkurransevne. Det er ikke påvist forskjeller mellom soyalinje 305423 og konvensjonelle sorter med tilsvarende genetisk bakgrunn for disse karakterene, og det er ikke grunn til å anta at den introduserte egenskapen vil medføre økt fitness utenfor dyrkingsmiljø i forhold til ikke-transgene sorter av soya.

5.2. Potensiale for genoverføring

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

5.2.1. Horisontal genoverføring

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

Ut fra dagens vitenskapelig innsikt med hensyn til barrierer for genoverføring mellom ubeslektede arter og flere års forskning for om mulig å framprovosere tilfeldig overføring av genetisk materiale fra planter til mikroorganismer er det lite som tyder på at transgenene i 305423x40-3-2 skal kunne overføres til andre enn naturens kryssingspartnere ved detekterbare frekvenser i laboratoriestudier. Det er gjort forsøk som ser på stabilitet og opptak av DNA fra tarmkanalen hvor mus er oralt tilført M13 DNA. Det tilførte DNAet var sporbart i avføring opp til syv timer etter føring. Svært små mengder av M13 DNA (<0.1 %) kunne spores i blodbanene i en periode på maksimum 24 timer, mens M13 DNA ble funnet i opptil 24 timer i lever og milt (Schubbert *et al.* 1994). Ved oralt inntak av genmodifisert soya er det vist at DNA er mer stabilt i tarmen hos personer med utlagt tarm sammenlignet med kontrollgruppen (Netherwood *et al.* 2004). I kontrollgruppen ble det ikke påvist GM DNA i feces. Nielsen *et al.* (2000) og De Vries & Wackernagel (2002) har undersøkt persistens av DNA og opptak av GM DNA i jord. I disse laboratorieforskene ble det påvist svært små mengder DNA som var overført fra planter til bakterier. Forutsetningen for at dette kunne skje var sekvenshomologi mellom plantetransgenet og mottagerbakterien. I hvilken grad det forekommer tilfeldig sekvenshomologi mellom plantetransgener og naturlig forekommende bakterier er usikkert, men siden de fleste transgenene inneholder rekombinerte DNA sekvenser fra jordbakterier kan dette ikke utelukkes (Bensasson *et al.* 2004)

Med bakgrunn i opprinnelse og karakter/egenskaper av de innsatte genene og mangel på seleksjonspress i fordøyelseskanal og/eller miljøet, er sannsynligheten for at horisontal genoverføring vil gi selektive fordeler eller økt fitness på mikroorganismer svært liten (Nielsen 2003). Det er derfor usannsynlig at gener fra soya 305423x40-3-2 vil etableres stabilt i genomet til mikroorganismer i miljøet eller i fordøyelseskanalen hos mennesker eller dyr. Ut fra tilgjengelig kunnskap er det ikke grunn til å forvente at det vil skje horisontal genoverføring av DNA-materiale fra 305423x40-3-2.

5.2.2. Vertikal genoverføring

Soya dyrkes ikke i Norge, og arten har ikke viltvoksende populasjoner eller nærstående arter utenfor dyrking i Europa. Utisiktet frøspredning i forbindelse med transport, håndtering og prosessering vil derfor ikke medføre risiko for spredning av transgener til økologiske eller konvensjonelt dyrkede sorter, eller til ville populasjoner og arter utenfor jordbruksområder.

5.3. Delkonklusjon

Søknaden gjelder godkjenning av soyalinjen 305423x40-3-2 for import, prosessering og til bruk i næringsmidler og fôrvarer, og omfatter ikke dyrking. Med bakgrunn i tiltenkt bruksområde er miljørisikovurderingen avgrenset til mulige effekter av utisiktet frøspredning i forbindelse med transport og prosessering, samt indirekte eksponering gjennom gjødsel fra husdyr fôret med genmodifisert soya.

Det er ingen indikasjoner på økt sannsynlighet for spredning, etablering og invasjon av soyalinjen i naturlige habitater i naturlige habitater eller andre arealer utenfor jordbruksområder. Soya dyrkes ikke i Norge, og arten har ikke viltvoksende populasjoner eller nærstående arter utenfor dyrking i Europa. Det er derfor ikke risiko for utkryssing med dyrkede sorter eller ville planter i Norge.

6. Vurdering av søkers dokumentasjon

På bakgrunn av den påvist ustabilitet i genomet til foreldrelinjen 305423 mener faggruppe for GMO at det må kreves av Pioneer å diskutere muligheten for om det kan skje andre genrekombinasjoner enn den påviste, og om slike eventuelt kan føre til endret helserisiko.

Faggruppen påpeker også kunnskapshull knyttet til redusert nivå av trypsinhemmer.

Soyalinjen 305423 x 40-3-2 uttrykker et nytt protein, og faggruppen mener derfor, med unntak av ett medlem, at det bør utføres sub-kronisk fôringsforsøk på rotter.

KONKLUSJON

Analysen av ernæringsmessige komponenter er utført i tråd med OECDs konsensusdokument for soya.

Det er påvist statistisk signifikante forskjeller mellom soyalinjen 305423 x 40-3-2 og kontroll i enkeltparametere. 305423x40-3-2 er modifisert for høyt innhold av fettsyren oljesyre, noe som fører til forholdsvis lavt innhold av fettsyren linolsyre og redusert mengde linolensyre. Verdiene av de fleste andre analyserte komponentene ligger innenfor typiske verdier for andre soyasorter som er rapportert i litteraturen. Faggruppe for genmodifiserte organismer mener at endringen i fettsyreprofil medfører en matolje med betydelig endret næringsverdi. Faggruppen anser at disse forskjellene ikke har noen negativ helsemessig konsekvens.

Flere studier viser at proteinene CP4 EPSPS og GM-HRA ikke fører til akutt eller kronisk toksisitet. Faggruppen konkluderer med at det er lite sannsynlig at eksponering for disse proteinene i seg selv, og i de mengder som tilføres via genmodifisert soya, er helsemessig betenkelig.

På bakgrunn av den påviste ustabiliteten i genomet til soya 305423 x 40-3-2 mener faggruppen at det må kreves av Pioneer å diskutere muligheten for om det kan skje andre genrekombinasjoner enn den påviste, og om slike eventuelt kan føre til endret helserisiko.

Søknaden gjelder godkjenning av soyalinjen 305423 x 40-3-2 for import, prosessering og til bruk i næringsmidler og fôrvarer. Faggruppen har derfor ikke vurdert mulige miljøeffekter knyttet til dyrking av soyalinjen. Det er ingen indikasjoner på økt sannsynlighet for spredning, etablering og invasjon av soyalinjen i naturlige habitater eller andre arealer utenfor jordbruksområder som resultat av frøspill i forbindelse med transport og prosessering. Soya dyrkes ikke i Norge, og arten har ikke viltvoksende populasjoner eller nærstående arter utenfor dyrking i Europa. Det er derfor ikke risiko for utkryssing med dyrkede sorter eller ville planter i Norge. Faggruppen finner det derfor lite trolig at bruk av soyalinjen 305423 x 40-3-2 vil medføre endret risiko for miljø i forhold til annen soya.

Samlet vurdering

Faggruppe for genmodifiserte organismer finner det lite trolig at bruk av soyalinjen 305423 x 40-3-2 vil medføre endret risiko for helse i forhold til annen soya, men påpeker muligheten for rekombinasjoner knyttet til den påviste ustabiliteten i genomet til foreldrelinjen 305423. Faggruppen påpeker også at det er kunnskapshull knyttet til redusert nivå av trypsinhemmer.

Faggruppen finner det lite trolig at bruk av soyalinjen 305423 vil medføre endret risiko for miljø i forhold til annen soya.

REFERANSER

- Alexander, J., Frøyland, L., Hemre, G.-I., Koster Jacobsen, B., Lund, E., Meltzer, H.M., Utne Skåre, J. (2006). *Et helhetssyn på fisk og annen sjømat i norsk kosthold*. VKM rapport. 171 s.
- Bensasson, D., Boore, J.L. & Nielsen, K.M. (2004). Genes without frontiers. *Heredity*, **92**, 483-489.
- de Vries, J. & Wackernagel, W. (2002). Integration of foreign DNA during natural transformation of *Acinetobacter* sp. by homology-facilitated illegitimate recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **99**, 2094-2099.
- EFSA (2004a). Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on the use of antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified plants. *The EFSA Journal*, **48**, 1-18. http://www.efsa.europa.eu/en/science/gmo/gmo_opinions/384.html
- EFSA (2004 b). Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission related to the presence of trans fatty acids in foods and the effect on human health of the consumption of trans fatty acids. *The EFSA Journal*, **81**, 1-49.
- EFSA (2006). *Guidance document of the scientific panel on genetically organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed*. ISBN: 92-9199-019-1. European Food Safety Authority, Parma, Italy. 100 p.
http://www.efsa.europa.eu/en/science/gmo/gmo_guidance/660.html
- FAOSTAT (2006). <http://faostat.fao.org>
- Komoβa, D., Gennity, I. & Sandermann, H., (1992) Plant Metabolism of Herbicides with C-P Bonds: Glyphosate. *Pesticide Biochem. Physiol.*, **43**, 85-94.
- Lid, J. & Lid, D.T. (2005). Norsk flora. Det Norske Samlaget, Oslo. 7. utgave. 1230 s. ISBN:82-521-6029-8.
- Lu, B.R. (2005). Multidirectional gene flow among wild, weedy and cultivated soybeans. *In: (Gressel J ed.): Crop Fertility and Volunteerism*. CRC- Taylor and Friends (Boca Raton): 137-147.
- Netherwood, T., Martín-Orúe, S.M., O'Donnell, A.G., Gockling, S., Graham, J., Mathers, J.C. & Gilbert, H.J. (2004). Assessing the survival of transgenic plant DNA in the human gastrointestinal tract. *Nature Biotechnology*, **22**, 204-209.
- Nielsen, K.M., van Elsas, J.D. & Smalla, K. (2000). Transformation of *Acinetobacter* sp. 13 (pFG4deltanptII) with transgenic plant DNA in soil microcosms and effects of kanamycin on selection of transformants. *Applied Environmental Microbiology*, **66**, 1237-42.
- Nielsen, K.M. (2003). An assessment of factors affecting the likelihood of horizontal transfer of recombinant plant DNA to bacterial recipients in the soil and rhizosphere. *Collection of Biosafety Reviews (Italy)*, Vol. 1. pp. 96-149.
- OECD (1999). Consensus Document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to Glyphosate herbicide, No. 10. *Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology*.

- OECD (2000). Consensus Document on the Biology of *Glycine max* (L.) Merr. (Soybean). *Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology, No. 15, Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology*.
- OECD (2001). Consensus Document on Compositional Consideration for New Varieties of Soybean: Key Food and Feed Nutrients and Anti-nutrients., No. 2. *Series on Safety of Novel Foods and Feeds*.
- Schubbert, G.W., Lettmann, C. & Doerfler, W. (1994). Ingested foreign (phage M13) DNA survives transiently in the gastrointestinal tract and enters the bloodstream of mice. *Molecular & General Genetics*, **242**, 495-504.
- TemaNord (1998). *Safety Assessment of Novel Food Plants: Chemical Analytical Approaches to the Determination of Substantial Equivalence*. TemaNord 1998:591. ISBN 92-893-0263-1.
- USDA-ARS (1999). United States Department of Agriculture, Agriculture Research Service (USDA-ARS). November 1999. USDA Nutrient Database for Standard Reference, Release 13. Nutrient Data Laboratory Home Page, <http://www.nal.usda.gov/fnic> Washington D.C.
- VKM (2005). *Report from an Ad Hoc Group appointed by the Norwegian Scientific Panel on Genetically Modified Organisms and Panel on Biological Hazards – An assessment on potentially long-term health effects caused by antibiotic resistance marker genes in genetically modified organisms based on antibiotic usage and resistance patterns in Norway*. Opinion 05/302-1-final. Norwegian Scientific Committee for Food Safety, Oslo. 62 p.
- VKM (2007). *Uttalelse om Monsanto's genmodifiserte RoundUp Ready soya GTS40-3-2, (EFSA/GMO/NL/2005/24)*. (06/314). Vitenskapskomiteen for mattrygghet, Oslo, Norge.
- VKM (2008). *Helse- og miljørisikovurdering av genmodifisert soyalinje 305423 fra Pioneer Hi-Bred International Inc.(EFSA/GMO/NL/2007/45)*. (08/305). Vitenskapskomiteen for mattrygghet, Oslo, Norge.

Vedlegg 1. Oversikt over analyser som er utført på soya 305423. Tabellen er fra Pioneers søknad til EFSA om markedsføring av soyalinjen.

Analysis		Relevant section of application	305423 soybean	Non-GM control soybean
Southern analysis and genetic stability		Points D.2. and D.5.	T4, T5, F2	Jack and elite line
Northern analysis		Point D.3.	T4	Jack
42-d broiler study		Point D.7.	BC1F6	BC1F6 null and 3 commercial varieties
GM-HRA protein concentration	USA and Canada locations	Point D.3.	BC1F5	BC1F5 null
	Chile and Argentina locations	Point D.3.	BC1F6	BC1F6 null
Compositional assessment	USA and Canada locations	Point D.7.	BC1F5	BC1F5 null and 4 commercial varieties
	Chile and Argentina locations	Point D.7.	BC1F6	BC1F5 null and 4 commercial varieties