



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

16.02.09

**Helse- og miljørisikovurdering av genmodifisert bomull
GHB614 fra Bayer CropScience
(EFSA/GMO/NL/2008/51)**

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), Thomas Bøhn, Askild Holck, Helge Klungland, Casper Linnestad, Richard Meadow, Anne I. Myhr, Audun Nerland, Ingolf Nes, Kåre M. Nielsen, Hilde-Gunn Opsahl Sorteberg, Odd E. Stabbetorp, Rose Vikse, Vibeke Thrane,

Koordinatorer fra sekretariatet:

Arne Mikalsen, Merethe Aasmo Finne

SAMMENDRAG

Helse- og miljørisikovurderingen av den herbicidtolerante bomullslinjen GHB614 fra Bayer CropScience (EFSA/GMO/NL/2008/51) 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 bomullslinjen GHB614 til import og prosessering, og til bruk i næringsmidler og fôrvarer. Søknaden gjelder ikke dyrking eller bruk av hele bomullsfrø som mat.

Risikovurderingen av den genmodifiserte bomullen er basert på dokumentasjon som er gjort tilgjengelig på EFSAAs nettside GMO EFSAAnet. I tillegg er det benyttet informasjon fra uavhengige vitenskapelige publikasjoner i vurderingen. GHB614 er risikovurdert i henhold til tiltenkt bruk og faggruppen har derfor ikke vurdert helse- og miljøeffekter knyttet til dyrking av bomullslinjen. Vurderingen er gjort i overensstemmelse med miljø- og helsekravene i genteknologiloven med forskrifter, først og fremst og fremst forskrift om konsekvensutredning etter genteknologiloven, samt kravene i EUs forordning 1829/2003/EF og utsettingsdirektiv 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 EFSAAs retningslinjer for risikovurdering av genmodifiserte planter (EFSA2006a) og Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) konsensusdokument for bomull (OECD 2004) 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.

Bomullslinjen GHB614 er fremkommet ved *Agrobacterium*-mediert transformasjon av planteceller fra den kommersielle bomullssorten 'Coker 312'. Bomullslinjen har fått satt inn en genkonstruksjon med et modifisert *epsps*-gen (*2mepsps*) fra mais. Genene *epsps* og *2mepsps* koder for enzymet 5-enolpyruvylsiki-3-fosfat-syntetase (EPSPS- og 2mEPSPS-enzym), som omdanner fosfoenolpyruvat og sikimat-3-fosfat til 5-enolpyruvylsiki-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 eget EPSPS-enzym er det modifiserte mais-enzymet 2mEPSPS også aktivt ved nærvær av glyfosat. De transgene plantene vil derfor tolerere høyere doser av herbicider med virkestoff glyfosat sammenlignet med konkurrerende ugras.

GHB614 har fått satt inn et modifisert *epsps*-gen (*2mepsps*) fra mais. *2mepsps*-genet ble dannet ved å klonere villtypemais *epsps*-genet inn i et plasmid og deretter introdusere to mutasjoner med *in vitro*-mutasjonsteknikk. Genet ble så klonet inn i den binære vektoren pTEM2. *2mEpsps*- og *epsps*- genene koder for enzymet 5-enolpyruvylsiki-3-fosfat-syntetase, som omdanner fosfoenolpyruvat og sikimat-3-fosfat til 5-enolpyruvylsiki-3-fosfat, en viktig metabolitt i syntesen av aromatiske aminosyrer. Bomullslinjen GHB614 uttrykker 2mEPSPS-proteinet som i motsetning til plantens eget EPSPS enzym er aktivt ved nærvær av N-fosfonometylglycin (glyfosat). N-fosfonometylglycin (glyfosat) hemmer generelt EPSPS-enzymet og blokkerer derved biosyntesen av aromatiske aminosyrer i planter. GHB614 inneholder ingen funksjonelle markørgener for antibiotikaresistens.

Bomullsfrø hvor bomullsfibrene er fjernet blir bearbeidet til fire hovedprodukter, olje (16 %), mel (45 %), frøskall (26 %) og "bomullshår/fiber"(lint) (9 %). Om lag 4 % går tapt ved prosessering av frøene (OECD 2004). Det er hovedsakelig olje fra bomullsfrø som brukes som menneskeføde, mens hele bomullsfrø og biprodukter som mel og kli fra oljeproduksjonen brukes som fôr. Etter det faggruppen kjenner til benyttes ikke bomullsfrøolje til produksjon av dyrefôr.

Analyser av ernæringsmessige viktige komponenter er utført i tråd med OECDs konsensusdokument for bomull (OECD 2004). Faggruppen anser analysene for å være tilstrekkelige for en vurdering av bomullslinjen GHB614 til bruk som fôr, samt for olje til bruk som mat. Det er påvist statistisk signifikante forskjeller for enkelte av komponentene som er analyserte, men forskjellene er ikke konsistente over forsøksfelt og verdiene ligger innenfor variasjonsområde for typiske verdier for andre bomullssorter som er rapportert i litteraturen.

Flere studier viser at 2mEPSPS-proteinet som blir uttrykt som følge av genmodifiseringen ikke er akutt toksisk eller allergent. Bayer CropScience har utført og henviser til akuttstudier på mus og fôringsforsøk på broilere med det aktuelle proteinet. Disse studiene viser at proteinet ikke fører til påvisbare helseeffekter på dyrene.

Faggruppen konkluderer med at det er lite sannsynlig at eksponering for 2mEPSPS-proteinet i seg selv, og i de mengder som tilføres via fôr fra den genmodifisert bomull fører til allergi eller toksiske effekter.

Faggruppe for genmodifiserte organismer konkluderer med at bomullsfrøolje og fôrvarer fra GHB614 er vesentlig lik olje og fôrvarer fra umodifiserte bomullsfrø, og finner at bruk av olje og fôrvarer fra den transgene bomullslinjen ikke utgjør noen større helserisiko enn kommersiell olje og fôrvarer fra umodifiserte bomullsplanter.

Søknaden gjelder godkjenning av bomullslinjen GHB614 for import, prosessering, mat og fôr. Faggruppen har derfor ikke vurdert mulige miljøeffekter knyttet til dyrking av bomullslinjen. Det er ingen indikasjoner på økt sannsynlighet for spredning, etablering og invasjon av bomullslinjen i naturlige habitater eller andre arealer utenfor jordbruksområder som resultat av frøspill i forbindelse med transport og prosessering. Bomull dyrkes ikke i Norge, og det er ingen stedege eller introduserte viltvoksende arter i den europeiske flora som bomull kan hybridisere med. Det er derfor ikke risiko for utkryssing med dyrkede sorter eller ville planter i Norge.

Samlet vurdering

Faggruppen finner det lite trolig at den omsøkte bruken av bomullslinjen GHB614 vil medføre endret risiko for helse og miljø i forhold til annen bomull.

NØKKEWORD

Bomull, *Gossypium hirsutum* L., genmodifisert bomull, GHB614, herbicidtoleranse, 2mepsps-gen, 2mEPSPS-protein, helsemessig trygghet, helse, miljø, forordning 1829/2003/EF, direktiv 2001/18/EF

INNHALDSFORTEGNELSE

BIDRAGSYTERE	2
Vurdert av.....	2
SAMMENDRAG.....	3
NØKKELOD.....	4
INNHALDSFORTEGNELSE.....	5
BAKGRUNN	6
OPPDRAK FRA DIREKTORATET FOR NATURFORVALTING OG MATTILSYNET.....	6
RISIKOVURDERING	7
1. Innledning.....	7
1.1. Beskrivelse av egenskaper(er) og virkningsmekanismer	7
2. Molekylær karakterisering	7
2.1. Transformasjonssystem og vektorkonstruksjon	7
2.2. Karakterisering av geninnsettingen/genkonstruksjonen.....	8
2.3. Informasjon vedr. uttrykk av introduserte gener og åpne leserammer (ORF)	9
2.4. Nedarving og stabilitet av innsatt DNA	10
2.5. Delkonklusjon	10
3. Komparative analyser.....	12
3.1. Valg av komparator og forsøksdesign.....	12
3.2. Analyser av ernæringsmessige komponenter	14
3.3. Agronomiske egenskaper	18
3.4. Delkonklusjon	19
4. Dokumentasjon av toksisitet og allergenisitet.....	19
4.1. Toksisitet	19
4.2. Allergenisitet	20
4.3. Delkonklusjon	20
5. Miljøriskovurdering	20
5.1. Potensiale for ikke tilsiktede effekter på fitness relatert til genmodifiseringen.....	20
5.2. Potensiale for genoverføring	21
5.3. Delkonklusjon	22
5.4. Vurdering av søkers dokumentasjon/kunnskapshull.....	22
KONKLUSJON	23
REFERANSER	24

BAKGRUNN

Faggruppe for genmodifiserte organismer i Vitenskapskomiteen for mattrygghet er blitt bedt av Mattilsynet og Direktoratet for naturforvaltning om å foreta en utredning av helse- og miljørisiko ved en eventuell godkjenning av den genmodifiserte bomullslinjen GHB614 fra Bayer CropScience (EFSA/GMO/NL/2008/51). Bomullslinjen er søkt omsatt i EU/EØS-området under Forordning (EF) No. 1829/2003 om genmodifiserte næringsmidler og fôrvarer (artiklene 3(1) og 15(1)). I henhold til Bayer CropScience omfatter søknaden bruksområdene import, prosessering, næringsmidler og fôrvarer, men omfatter ikke dyrking eller bruk av hele frø som mat.

Søknaden ble fremmet og anbefalt av nederlandske myndigheter i januar 2008. Dokumentasjonen knyttet til søknaden ble lagt ut på EFSA-nett 11. mars 2008, med frist på 90-dager for innspill fra EU- og EØS/EFTA-landene. Norge har ikke tidligere uttalt seg om bomullslinjen.

Utenfor EU/EØS-området er bomullslinjen GHB614 søkt godkjent for dyrking og omsetning i USA, og til bruk som mat, fôr og industriell bruk i Australia, New Zealand, Canada, Japan, Korea og Mexico (Bayer CropScience 2008).

OPPDRAK FRA DIREKTORATET FOR NATURFORVALTING OG MATTILSYNET

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/2008/51, genmodifisert bomull GHB614, ble lagt ut på EFSA-nett 11. mars 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 næringsmiddel og fôrvarer. Søknaden omfatter ikke dyrking.

Vurderingen av GHB614 skal utføres i henhold til tiltenkt bruk og i overensstemmelse med prinsippene som er nedfelt i EFSAAs 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") (EFSA2006a).

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 bomull, EFSA/GMO/NL/2008/51 (GHB614).

Unik kode: BCS-GHØØ2-5.

Status i EU: Søknad under 1829/2003/EF. EFSAAs frist for innspill er 11.06.08.

Ønsket svarfrist til Mattilsynet/DN: 8. juni 2008.

RISIKOVURDERING

1. Innledning

Helse- og miljørisikovurderingen av den genmodifiserte bomullslinjen GHB614 er basert på informasjon som er gjort tilgjengelig på EFSAAs nettside GMO EFSA.net. I tillegg er det benyttet uavhengige vitenskapelige publikasjoner med referee i vurderingene. 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 og prosessering utenfor EØS-området.

Faggruppen har vedtatt å benytte EFSAAs retningslinjer som gruppens retningslinjer for vurdering av genmodifiserte planter. Prinsippene som er lagt til grunn for vurderingen, er derfor hentet fra EFSAAs dokument "Guidance document of the scientific panel on genetically organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed" (EFSA2006a). Ved vurdering av vesentlig likhet har faggruppen lagt vekt på OECDs konsensusdokument for bomull (OECD 2004), som gir anbefalinger over hvilke parametere som bør undersøkes.

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

1.1. Beskrivelse av egenskaper(er) og virkningsmekanismer

Bomullslinjen GHB614 uttrykker et 2mEPSPS-enzym, som er resultat av introduksjon av et modifisert *epsps*-gen (*2mepsps*) fra mais. Genene *epsps* og *2mepsps* koder for enzymet 5-enolpyruvylsikimat-3-fosfatsyntetasen (EPSPS- og 2mEPSPS-enzym), som omdanner fosfoenolpyruvat og sikimat-3-fosfat til 5-enolpyruvylsikimat-3-fosfat, en viktig metabolitt i syntesen av aromatiske aminosyrer. N-fosfonometylglisic (glyfosat) hemmer generelt EPSPS-enzymet og blokkerer derved biosyntesen av aromatiske aminosyrer i planter. I motsetning til plantens eget EPSPS-enzym er det modifiserte mais-enzymet 2mEPSPS 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

2.1. Transformasjonssystem og vektorkonstruksjon

Bomullslinjen GHB614 er fremkommet ved *Agrobacterium*-mediert transformering. Det modifiserte *epsps*-genet (*2mepsps*) ble dannet ved at et *epsps*-gen fra mais fikk introdusert to mutasjoner med *in vitro*- mutasjonsteknikk. *2mepsps*-ekspresjonskassetten ble klonet inn i den binære vektoren pTEM2. pTEM2 inneholder foruten andre gener også antibiotikaresistensgenene *aadA*, som koder for streptomycin/spectinomycinresistens og *nptII* som koder for neomycinresistens. Den binære vektoren pTEM2 inneholder venstre og høyre grense T-DNA-sekvenser. Antibiotikaresistensgenene ligger utenfor T-DNA-sekvensene, og blir derfor ikke overført til bomullscellene. T-DNA-området inneholder *2mepsps*-ekspresjonskassetten som ble overført til bomullens genom av *Agrobacterium tumefaciens* under *in vitro* transformasjonsprosess. Det rekombinante DNA-fragmentet er på 3978 basepar. Foruten *2mepsps*-genet inneholder DNA-fragmentet en *Arabidopsis thaliana* histon H4

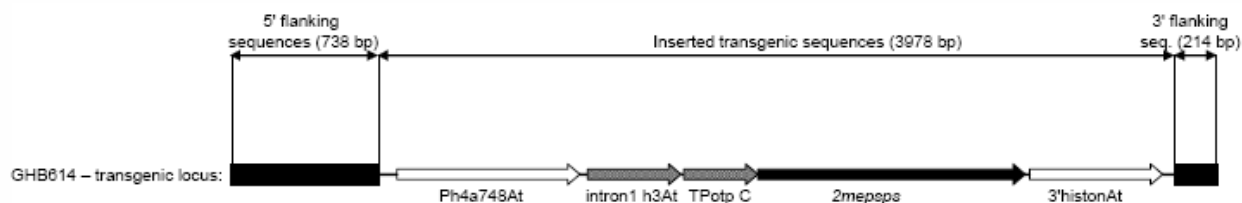
promoter (Ph4a748At) og *Arabidopsis thaliana* histon H3-intron (intron1 h3At), et optimalisert kloroplast overføringspeptid (TPotpC) og en *Arabidopsis thaliana* 3'-ende terminatorsekvens (3' histon At). Det rekombinante DNA-fragmentet inneholder ikke antibiotikaresistensen. Transformanter ble selektert ved at de overlevde og vokste i nærvær av glyfosat. Kutting av plante-DNA med restriksjonsenzymet *KpnI* og Southern blot analyse av kuttet DNA, viser at det rekombinante DNA-fragmentet er en del av et 14 kb store *KpnI* restriksjonsenzymfragmentet.

2.2. Karakterisering av geninnsettingen/genkonstruksjonen

Southern blot, PCR analyse og sekvensanalyse av PCR-fragmentene er benyttet til karakterisering av det rekombinante DNA-fragment i planten. Både innskutt DNA og flankerende genomisk DNA er blitt sekvensert. Molekylærbiolegisk karakterisering viser at det bare er satt inn en kopi av DNA-fragmentet i bomullens genom. DNA-fragmentene sitter på et 14 kilobasepar(kb) stort *KpnI*-restriksjonsenzymfragment (GHB614 rekombinant DNA fragment) (se figur 1). Genelementer i bomullsplantens rekombinante DNA-fragment er vist i tabell 1.

Tabell 1. Genelementer i 2mepsps- ekspresjonskassetten (Bayer CropScience 2008)

Symbol	Definition	Source	Size (bp)	Reference	Function
LB	Left border repeat	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	24	Zambryski, 1988	Cis-acting element for T-DNA transfer
Ph4a748At	Promoter	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1010	Chaboute <i>et al.</i> , 1987	High level constitutive expression, especially in the rapidly growing plant tissues
intron1 h3At	Intron	<i>Arabidopsis thaliana</i>	516	Chaubet <i>et al.</i> , 1992	
TPotpC	Transit peptide	<i>Zea mays</i> , <i>Helianthus annuus</i>	372	Lebrun <i>et al.</i> , 1997b	Targeting of the protein to the plastids
2mepsps	Glyphosate tolerance 2mepsps gene	<i>Zea mays</i>	1337	Lebrun <i>et al.</i> , 2003	Herbicide tolerance and selectable marker
3'histon At	Terminating signal of 2mepsps gene	<i>Arabidopsis thaliana</i>	742	Chaboute <i>et al.</i> , 1987	Stop signal
RB	Right border repeat	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	24	Zambryski, 1988	Cis-acting element for T-DNA transfer



Figur 1. Rekombinant DNA- fragment i GHB614 bomullens genom. DNA-fragmentet er på 3978 bp.

Den genmodifiserte bomullslinjen GHB614 uttrykker glyfosattoleranse ved at GHB614 har fått satt inn et modifisert *epsps*-gen fra mais (*2mepsps*). *2mepsps*-genet koder for enzymet 5-enolpyruvylsikumat-3-fosfat syntetase (2mEPSPS-enzym) I 2mEPSPS-proteinet er treonin 102 byttet ut med isoleusin og prolin 106 byttet ut med serin (Lebrun *et al.* 2003). EPSPS- og 2mEPSPS-enzymene omdanner fosfoenolpyruvat og sikimat-3-fosfat til 5-enolpyruvylsikumat-3-fosfat, som er en viktig metabolitt i syntesen av aromatiske aminosyrer. I motsetning til hos dyr, inneholder alle planter og mikroorganismer dette enzymet. Dyr må dermed få de aromatiske aminosyrene fra føden. Planters EPSPS-enzym er imidlertid sensitiv for glyfosat, mens endringene i proteinets aminosyresekvens medfører toleranse mot fosfonometylglycinherbicer, som glyfosat, sulfosat og fosametin.

Molekylærbiologiske analyser

For å få tilstrekkelig mengde 2mEPSPS protein til diverse analyser ble *2mepsps*-genet klonet inn i *E. coli*.

Molekylærbiologiske analyser viser at det rekombinante fragmentet på ca. 3978 bp i planten inneholder det samme genet og genelementer som er på det tilsvarende fragmentet i vektoren pTEM2. 2mEPSPS-proteinet som uttrykkes i bomullsblad er undersøkt med Western-blot analyse og densitometri, SDS-PAGE-analyse og densitometri, trypsindegradering og HPLC/elektrospray massespektrometri, N-ende sekvensanalyse, samt glykosyleringsanalyse og 2mEPSPS enzymaktivitets analyse. Enzymaktivitetsanalysen viser at 2mEPSPS-proteinet er funksjonelt lik det *E. coli*-produserte proteinet. Det ble ikke påvist glykoliseringssteder på proteinene.

Sammenlignende analyser av 2mEPSPS-protein fra henholdsvis plante og bakterie viser 427 av 445 aminosyrer i *E. coli*-produsert 2mEPSPS-protein, og 407 av 445 aminosyrer i planteprodusert 2mEPSPS. Analysene ble foretatt ved hjelp av trypsindegradering og HPLC/elektronspraymetode. Søkers forklaring på at det er funnet 20 færre aminosyrer i plante-2mEPSPS enn i bakterie-2mEPSPS er Edman-degradering, delvis trypsindegradering, kjemiske endringer under proteinrensing eller posttranslasjon-modifisering av proteinet. SDS-PAGE-analyse og Westernblot viser omtrentlig lik størrelse til de to proteinene.

Det er foretatt sekvenseringsanalyser av flankesekvensene til det rekombinante DNA fragmentet, 738 bp oppstrøms fra 5'-flanke-enden og 214 bp nedstrøms fra 3'-flanke-enden til DNA fragmentet. Sekvensanalysene av transgen homozygot bomull (BC₂F₅) og villtype (varietet FM966) viser at et fragment på 17 bp i villtypen er kuttet bort i den transgene linjen. Disse 17 bp-ene ble kuttet ut under integreringen av T-DNAet.

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

Ekspresjonen av *2mepsps*-mRNA og 2mEPSPS-protein ble analysert ved hjelp av henholdsvis Northern blot og ELISA. Konsentrasjon av 2mEPSPS-protein ble målt i prøver fra blad, stilk, rot, apikalt meristem (toppskudd/vekstpunkt), blomsterknopper og pollen. GHB614-plantene ble dyrket i veksthus, og det ble tatt ut prøver på fire ulike vekststadier. Som forventet ut fra at de regulatoriske elementene er aktive i meristematisk vev, ble det høyeste nivået av 2mEPSPS-protein funnet i raskt voksende plantedeler som blad og toppskudd, og lavest innhold i pollen. Konsentrasjonen av proteinet ble målt til $7,94 \pm 2,87$ µg/g råvekt i blad på et tidlig vekststadium, mens innholdet av 2mEPSPS ble målt til henholdsvis $5,47 \pm 0,22$ og $5,35 \pm 0,25$ µg/g råvekt i apikalt meristem og blomsterknopp ved blomstring. I frø ble nivået av 2mEPSPS-protein målt til $36,3 \pm 7,2$ (variasjonsbredde (VB)= 28,7 til 47,1) og $40,2 \pm 9,0$ (VB= 28,6 til 55,8) µg/g råvekt for henholdsvis usprøytet og sprøytet bomullsplante. I mel og frøskall ble det påvist henholdsvis $0,26 \pm 0,10$ (VB= 0,16 til 0,36) og $6,93 \pm 0,40$ (VB= 6,48 til 7,41) µg/g råvekt.

Ved sekvensering av hele DNA-fragmentet ble det påvist to åpne leserammer i 5'-flankerende sekvens, mens det ikke ble påvist åpne leserammer i 3'-flankerende sekvens. De to leserammene i 5' flankerende sekvens bestod av bomullssekvenser som ikke hadde elementer som trengs for

transkripsjon av DNA. I 5'- og 3'enden ble det ikke påvist kjente bomullsgener, mRNA, cDNA eller EST. Leserammer ble testet *in silico* for homologer til kjente toksiner og allergener, ingen slike homologer ble påvist. Northern blot analyse viste fravær av kryptisk ekspresjon.

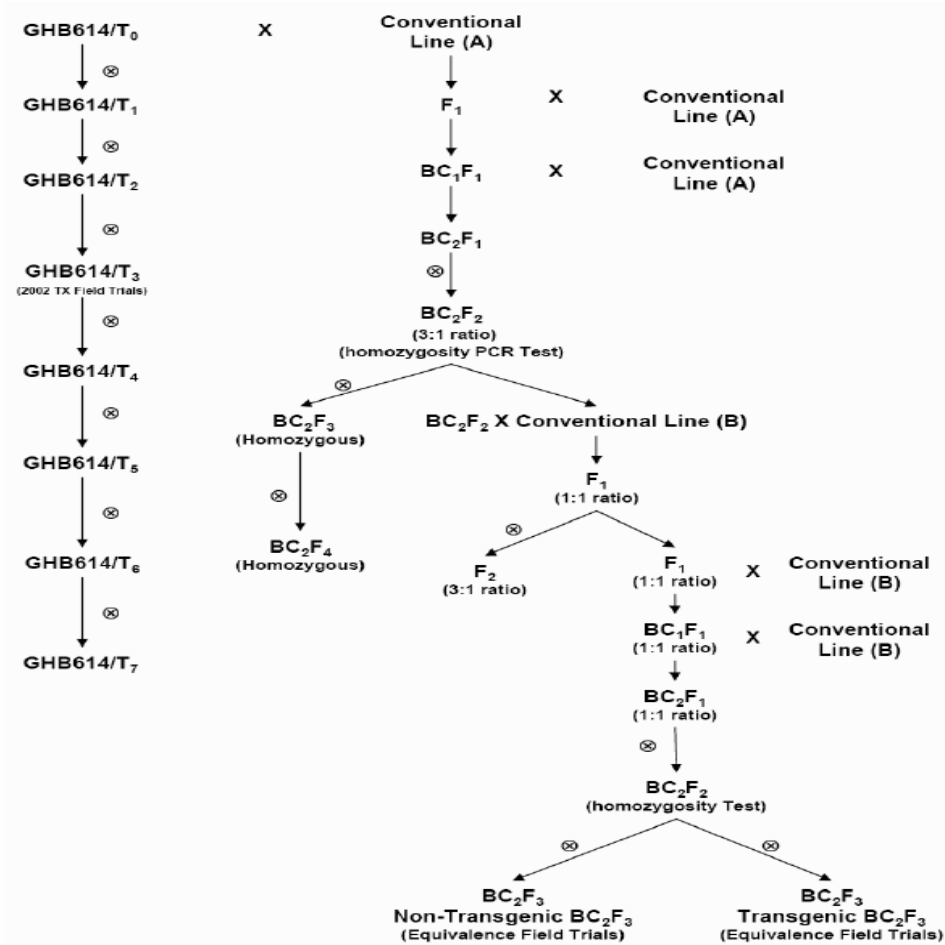
2.4. Nedarving og stabilitet av innsatt DNA

I henhold til dokumentasjonen fra Bayer CropScience er genotypisk og fenotypisk stabilitet vist ved Southern blot, samt analyser av proteinekspressjon og fenotypisk/agronomiske karakterer. Genetisk stabilitet ble evaluert i generasjonene T₃, T₄, T₅, T₆ og BC₂F₂ (se figur 2), der GHB614 var krysset inn i ulike genetisk bakgrunner (Coker 612, FiberMax966). Det ble også foretatt analyser av genomisk DNA fra planter dyrket på 6 ulike lokaliteter. Resultatene av Southern blot-analysene viser at det rekombinante DNA-innsluddet er stabilt integrert i genomet og nedarves stabilt over generasjoner under varierende dyrkingsbetingelser. Analyse av spaltingsdata fra fem ulike generasjoner viser forventet segregeringsmønster på henholdsvis 1:1, og 3:1 for det rekombinante DNA-fragmentet. Søker konkluderer med at nedarvingen av DNA-fragmentet følger mønsteret for mendelsk nedarving av et enkelt, dominant lokus. Analyser av stabiliteten av det innsatte fragmentet synes å være tilfredsstillende.

2.5. Delkonklusjon

Faggruppen har vurdert karakteriseringen av det rekombinante innskuddet i GHB614, de fysiske, kjemiske og funksjonelle karakteriseringene av proteinet til å være tilfredsstillende.

Figure 11 Breeding tree for the development of GlyTol cotton



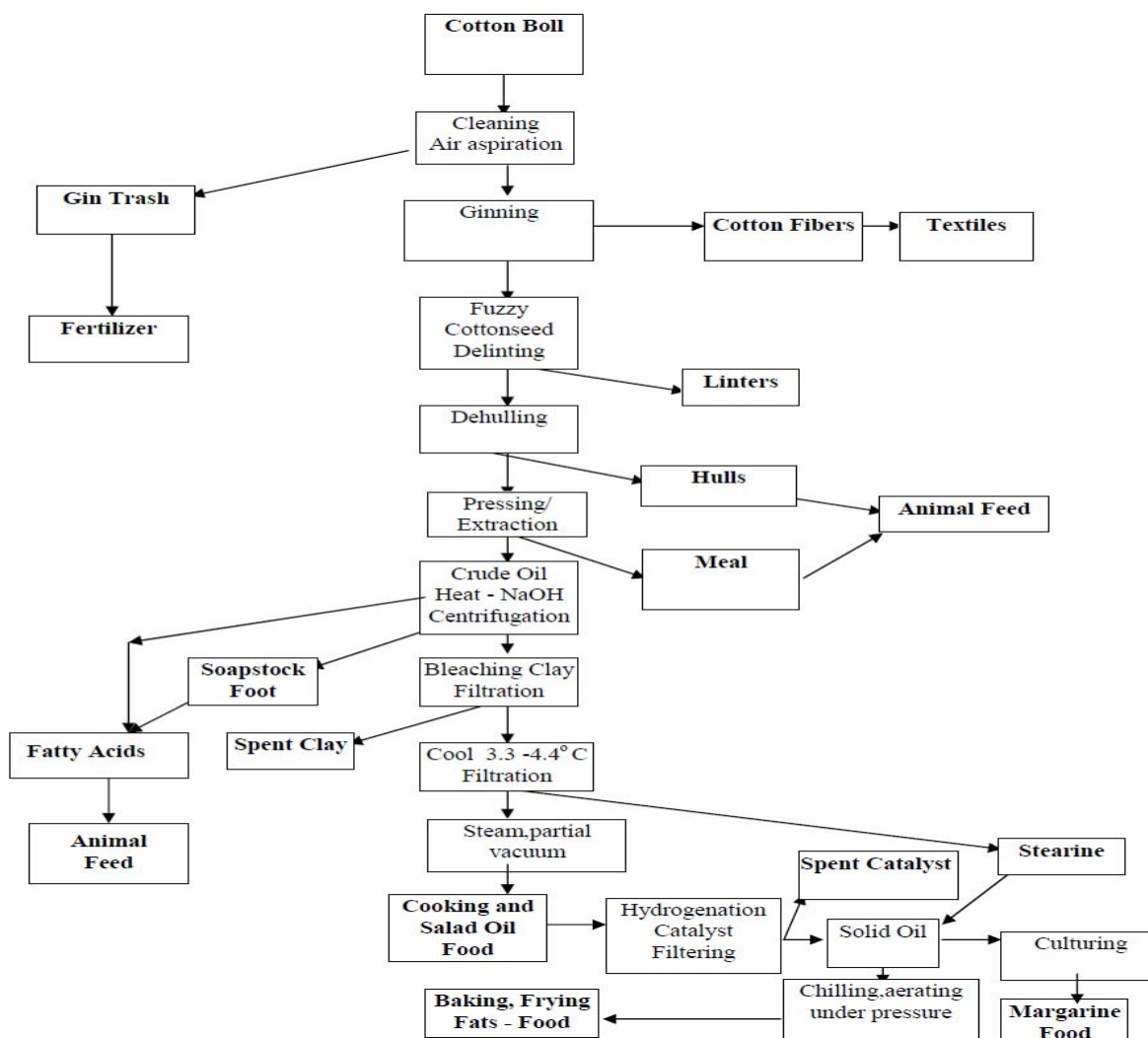
Notes for Figure 11.

- At each generation, plants were sprayed with glyphosate to eliminate those not expressing the *2mepsps* gene
- ⊗ = self-cross
- Homozygous T₃ plants were identified by planting 25 seed, spraying with glyphosate to identify segregating seed lots. Homozygosity PCR based Invader analysis was also performed as a secondary means of identifying homozygous plants.
- Selfed T₃ homozygous seed (no segregation for resistance) was used to produce homozygous T₄ seed and was the source of the lines that were used in early event agronomic and stability studies.
- Generation BC₂F₄ (homozygous) was used for detailed insert characterization and protein/RNA expression levels.
- Generations T₃, T₄, T₅, T₆ and BC₂F₂ were used for molecular stability analyses.
- Generation T₅ was used for seed composition analysis.
- Generations T₅ and BC₂F₃ were used for replicated agronomic field tests.
- Generation T₇ was used for analyses on absence/presence of vector backbone sequences.

Figur 2. Kryssingsskjema for genmodifisert bomullslinje GHB614 (Bayer CropScience 2008).

3. Komparative analyser

Bomullsfrø hvor bomullsfibrene er fjernet blir bearbeidet til fire hovedprodukter, olje (16 %), mel (45 %), frøskall (26 %) og ”bomullshår (lint)” (9 %), ca. 4 % går tapt ved prosessering av frøene (OECD 2004). Det er hovedsakelig olje fra bomullsfrø som brukes som menneskeføde, mens hele bomullsfrø og biprodukter som mel og kli fra oljeproduksjonen brukes som fôr (se figur 3).



Figur 3. Bearbeiding av bomullsfrø til bomullsfiber, fôr og olje. Diagrammet er fra OECDs konsensusdokument (OECD 2004).

3.1. Valg av komparator og forsøksdesign

I følge dokumentasjon fra Bayer CropScience er det er foretatt analyser av ernæringsmessige viktige komponenter og registreringer av agronomiske karakterer i en serie feltforsøk i sentrale dyrkingsområder for bomull i USA.

Undersøkelser av ernæringsmessige komponenter ble foretatt på 17 lokaliteter i 5 stater i vekstsesongene 2005 og 2006 (se tabell 2). Forsøksfeltene bestod av et fullstendig randomisert

blokkdesign med 3 gjentak, og inkluderte testlinjen GHB614 og en konvensjonell bomullssort ('cv. Coker 312') som tradisjonell kontroll. Det inngikk ikke kommersielle referansesorter i forsøkene. Forsøksruter med testlinjen ble behandlet med henholdsvis glyfosat eller annet konvensjonelt herbicid, mens det ble benyttet konvensjonelle sprøyteregimer på den umodifiserte kontrollen. Sprøytingene med glyfosat ble foretatt på henholdsvis 3, 12 og 16 bladstadiet.

Tabell 2. Oversikt over forsøkssteder for analyser av ernæringsmessige komponenter.

	Year	Site	County / State	EPA Region	Comparator	Treatment	Design	Replicates
Nutritional composition	2005	201	Tift, GA	II	Coker 312	A / B / C	RCBD	3
		302	Escambia, FL	III	Coker 312	A / B / C	RCBD	3
		403	Jackson, AR	IV	Coker 312	A / B / C	RCBD	3
		404	Crittenden, AR	IV	Coker 312	A / B / C	RCBD	3
		405	Drew, AR	IV	Coker 312	A / B / C	RCBD	3
		406	Tate, MS	IV	Coker 312	A / B / C	RCBD	3
		407	Tate, MS	IV	Coker 312	A / B / C	RCBD	3
		608	Wharton, TX	VI	Coker 312	A / B / C	RCBD	3
		809	Hockley, TX	VIII	Coker 312	A / B / C	RCBD	3
	2006	201	Tift, GA	II	Coker 312	A / B / C	RCBD	3
		302	Escambia, FL	III	Coker 312	A / B / C	RCBD	3
		403	Jackson, AR	IV	Coker 312	A / B / C	RCBD	3
		404	Crittenden, AR	IV	Coker 312	A / B / C	RCBD	3
		405	Drew, AR	IV	Coker 312	A / B / C	RCBD	3
		406	Tate, MS	IV	Coker 312	A / B / C	RCBD	3
		612	Wharton, TX	VI	Coker 312	A / B / C	RCBD	3
814	Hockley, TX	VIII	Coker 312	A / B / C	RCBD	3		

Trial design: complete randomized block design with three replications and three treatments:

- A) conventional cotton grown using conventional herbicide weed control,
- B) GHB614 cotton grown using conventional herbicide weed control,
- C) GHB614 cotton grown with glyphosate herbicide weed control (three applications, at the 3-leaf stage, the 12-leaf stage and 16-leaf stage, of 840 g a.i. glyphosate acid equivalent per hectare per application).

Kilde: Søknad EFSA/GMO/UK/2007/42

Analyser av variasjon i morfologiske og agronomiske karakterer er basert feltforsøk med bomullslinjen GHB614 i USA i 2004 og 2005. I tillegg ble karakterer knyttet til frøkvile og spireegenskaper testet ved hjelp av standardiserte spireanalyser. I vekstsesongene 2004 og 2005 ble det gjennomført fenotypiske registreringer på henholdsvis 8 og 12 lokaliteter i representative områder for bomullsdyrking i 5 ulike stater. De ikke-transgene linjene 'Coker312' og 'FM9740' ble benyttet som kontrollsorter i forsøkene. Forsøksfeltene i begge feltsesongene bestod både av et split-plot blokkdesign og fullstendig randomisert blokkdesign med 3 gjentak (se tabell 3).

Tabell 3. Oversikt over feltforsøk for registrering av agronomiske karakterer.

	Year	Region	County / State	Comparator	Design	Replicates	
Agronomic performance	2004	Southeast	Dillon, SC	Coker 312	split-plot	3	
			Jefferson, GA	Coker 312	split-plot	3	
			Halifax, NC	Coker 312	split-plot	3	
		Southwest	Lubbock, TX	Coker 312	split-plot	3	
			Swisher, TX	Coker 312	split-plot	3	
		Midsouth	Washington (2 sites), MS	Coker 312	split-plot	3	
			Cohoma, MS	Coker 312	split-plot	3	
		2005	Southeast	Bulloch, GA	Coker 312	split-plot	3
				Halifax, NC	Coker 312	split-plot	3
	Dillon, SC			Coker 312	split-plot	3	
	Dillon, SC			Coker 312, FM9740, BC ₂ F ₃ in FM9740 genetic background	RCBD	3	
	Southwest		Lubbock, TX (3 sites)	Coker 312	split-plot	3	
			Lubbock, TX	Coker 312, FM9740, BC ₂ F ₃ in FM9740 genetic background	RCBD	3	
	Midsouth		Washington (2 sites) MS	Coker 312	split-plot	3	
			Cohoma, MS	Coker 312	split-plot	3	
			Washington, MS	Coker 312, FM9740, BC ₂ F ₃ in FM9740 genetic background	RCBD	3	

RCBD – Randomized Complete Block Design

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 hele bomullsfrø, bomullsmel, skall, lint og olje

Valget av analyseparametre er gjort i henhold til OECDs konsensusdokument for bomull (OECD 2004). Det er foretatt ulike analyser av hovedkomponenter for de forskjellige produktene fra bomullsfrø.

Skall og lint

Analyser av skall og lint er utført i tråd med OECDs konsensusdokument, og omfatter aske, fett, protein, vann, ADF (acid detergent fibre), NDF (neutral detergent fibre) (se tabell 4). En sammenligning mot referanseverdier for lint er ikke mulig fordi, i henhold til Bayer, slike verdier ikke er tilgjengelige. Det er kun påvist signifikante forskjeller mellom GHB614 og kontroll for innhold av fett i skall og lint.

Tabell 4. Analyser av komponenter som det i henhold til OECDs konsensusdokument bør analyseres for i skall og lint.

Component (on a dry matter basis)	Crop/herbicide regime				
	Linters		Hulls		
	Coker 312/ Conventional Herbicide ^a	GHB614/ Glyphosate Herbicide ^a	Coker 312/ Conventional Herbicide ^a	GHB614/ Glyphosate Herbicide ^a	Reference Range from Literature
Moisture % FW	7.08	6.11	11.86	10.38	8.5 - 12.3
Protein %	6.31	6.54	15.74	14.49	4.0 - 13.1
Fat %	3.38	1.56	2.26	4.40	1.0 - 3.3
Ash %	3.75	2.76	4.77	4.80	2.39 - 3.97
Total carbohydrates % ^a	85.40	89.19	79.09	78.73	85.8 - 92.6
Crude Fiber %	74.80	79.14	42.21	38.61	41.5 - 56.2
Acid detergent fibre %	87.00	85.40	66.90	61.40	57.9 - 71.6
Neutral detergent fibre %	88.80	90.60	82.10	76.30	76.3 - 92.6

^a Total Carbohydrates calculated as 100% - (crude protein %DM + crude fat %DM + ash %DM)

Frø og olje

Analysene av frø ble foretatt i henhold til OECDs konsensusdokument, og inkluderte parametrene protein, fett, aske, vann, karbohydrater, ADF, NDF, total fiber (TDF), aminosyrer, fettsyrer (C8-C22), fosfor, kalsium, vitaminene E, tokoferoler, anti-næringsstoffet gossypol (fritt og totalt), syklopropenoide fettsyrer (malvalin-, sterkulin-, og dihydrosterkulin syre). I tillegg ble det analysert for innhold av jern, kalium, magnesium og sink. Av de 81 analyserte parametrene ble det påvist statistisk signifikante forskjeller for flere komponenter, men forskjellene er ikke konsistente over forsøksfelt.

Hovedkomponenter og fiber

Analysene av hovedkomponenter og fiber viste statistisk signifikante forskjeller mellom den transgene linjen og kontrollsorter innen enkeltlokaliteter, men ikke over alle (se tabell 5).

Tabell 5. Resultater fra variansanalyse (ANOVA) av hovedkomponenter og fiber.

Summary t-tests procedures [‡]	A vs B		A vs C	
	Significant	not significant	Significant	not significant
Moisture	4	13	2	15
Protein	1	16	1	16
Crude fat	2	15	1	16
Ash	1	16	1	16
Carbohydrates	-	17	-	17
Acid detergent fibre	-	17	2	15
Neutral detergent fibre	2	15	-	17

[‡] Number of sites with significant (p < 0.05) and not significant (p > 0.05) treatment differences

A = counterpart, control samples
B = GHB614 samples, not sprayed with glyphosate
C = GHB614 samples, sprayed with glyphosate

Mineraler og vitaminer

I henhold til dokumentasjonen fra søker er det foretatt analyser av følgende mineraler: fosfor, jern, kalium, kalsium, magnesium og sink. I OECDs konsensusdokument for bomull er det kun anbefalt analyser av kalsium og fosfor i bomull. For samtlige mineraler og vitamin E viste de statistiske analysene for de enkelte komponentene signifikante forskjeller for enkelte lokaliteter, men forskjellene er ikke konsistente over forsøksfelt (tabell 6).

I henhold til OECDs konsensusdokument er vitamin E det eneste vitaminet som anbefales analysert i bomullsolje og -frø. Bayer CropScience har målt totalinnhold av vitamin E i hele -, litted - og delitted frø, samt i uraffinert og raffinert olje. I tillegg er det også analysert for innhold av alfa- og gamma-tokoferol i uraffinert og raffinert olje. Det er ikke funnet store statistisk signifikante forskjeller for de fleste komponentene (tabell 6).

Tabell 6: Resultater fra variansanalyser (ANOVA) for mineraler, vitamin E, alfa- og gamma tokoferol i bomullsfør.

Summary t- test procedures *	A vs B		A vs C	
	significant	not significant	significant	not significant
Calcium	3	14	4	13
Phosphorus	2	15	-	17
Potassium	3	14	2	15
Magnesium	2	15	3	14
Iron	-	17	2	15
Zinc	1	16	-	17
Alpha Tocopherol	1	16	1	16
Gamma Tocopherol	-	17	1	16
Vitamin E (Tocopherols)	1	16	1	16

* Number of sites with significant ($p < 0.05$) and not significant ($p > 0.05$) treatment differences
A = counterpart, control samples
B = GHB614 samples, not sprayed with glyphosate
C = GHB614 samples, sprayed with glyphosate

Fettsyresammensetning i bomullsfør og olje

Fettsyresammensetningen i hele frø, samt uraffinert og raffinert olje fra GHB614 og umodifisert kontrollsort er målt i henhold til OECDs konsensusdokument for bomull. Det ble analysert for innhold av 13 ulike fettsyrer. Det er funnet statistisk signifikante forskjeller for flere fettsyrer (se tabell 7). I henhold til søker er det funnet flertydige resultater for palmitolsyre, og signifikante forskjeller for stearin-, olje- og linolsyre for begge sammenligningene. Søker hevder at imidlertid at variansanalysen (ANOVA) over lokaliteter ikke er gyldig fordi det ble påvist signifikante effekter av lokalitet og herbicidbehandling. Med unntak for linolensyre, der forskjellen var ca. 25 %, er de gjennomsnittlige forskjellene over alle lokalitetene for de øvrige fettsyrene på mindre enn ± 10 %. For råolje, rensert og deodorisert olje er det ikke funnet statistisk signifikante forskjeller. Det er imidlertid ikke påvist myristinsyre i rensert og deodorisert olje. Søker forklarer dette med at det ble gjort feil ved evaluering av kromatogrammet.

Tabell 7. Resultater fra variansanalyse (ANOVA) for fettsyrer i bomullsfør

Summary t-test procedures *	A vs B		A vs C	
	significant	not significant	significant	not significant
C14:0 Tetradecanoic (myristic)	-	17	3	14
C16:0 Hexadecanoic (palmitic)	5	12	4	13
C16:1 Hexadecanoic (palmitoleic)	8^a	9^a	8^a	9^a
C18:0 Octadecanoic (stearic)	11^a	6^a	12^a	5^a
C18:1 Octadecanoic (oleic)	13^a	4^a	13^a	4^a
C18:2 Octadecadienoic (linoleic)	12^a	5^a	13^a	4^a
C18:3 Octadecatrienoic (linolenic)	17^a	-	17^a	-
C20:0 Eicosanoic (arachidic)	6	10	5	11
C22:0 Docosanoic (behenic)	5	11	5	11
C22:5 Docosapentaenoic	-	8	2	6
C22:5 Docosapentaenoic ^b	-	17	2	15
C24:0 Tetracosanoic (lignoceric)	-	9	1	8
C24:0 Tetracosanoic (lignoceric) ^b	-	15	1	14

* Number of sites with significant (p < 0.05) and not significant (p > 0.05) treatment differences
A = counterpart, control samples
B = GHB614 samples, not sprayed with glyphosate
C = GHB614 samples, sprayed with glyphosate
^a figures in bold indicate that at the majority of sites were found significant differences
^b 'not significant' was also assumed if all samples of a site were equal or below the limit of quantification for the two respective treatments

Aminosyrer i bomullsfør

Det er analysert for innhold av både essensielle og ikke-essensielle aminosyrer i hele frø, samt i ubehandlet og varmebehandlet mel. Analysene er foretatt i henhold til OECDs retningslinjer. Det ble ikke funnet statistisk signifikante forskjeller over lokalitetene (se tabell 8). Verdiene avviker ikke utover ± 10 %, og for samtlige aminosyrer ligger verdiene innenfor typiske verdier som er rapportert i litteraturen.

Tabell 8. Resultater fra variansanalyse (ANOVA) for aminosyrer i frø.

Summary t-tests procedures *)	A vs B		A vs C	
	significant	not significant	significant	not significant
Alanine	1	16	1	16
Arginine	3	14	-	17
Aspartic Acid	2	15	1	16
Cystine	1	16	-	17
Glutamic acid	2	15	1	16
Glycine	1	16	1	16
Histidine	1	16	1	16
Isoleucine	1	16	1	16
Leucine	1	16	1	16
Lysine	1	16	-	17
Methionine	1	16	-	17
Phenylalanine	1	16	-	17
Proline	-	17	1	16
Serine	2	15	-	17
Threonine	2	15	1	16
Tryptophan	3	14	-	17
Tyrosine	3	14	-	17
Valine	1	16	1	16

* Number of sites with significant (p < 0.05) and not significant (p > 0.05) treatment differences
A = counterpart, control samples
B = GHB614 samples, not sprayed with glyphosate
C = GHB614 samples, sprayed with glyphosate

Antinæringsstoffer

Det ble påvist statistisk signifikante forskjeller for antinæringsstoffene som er analysert i 'lintet frø'. Resultatene viser relativt store signifikante forskjeller for variablene malvin-, sterkul- og dihydrosterkulsyre (se tabell 9). Statistiske analyser over forsøkssteder viser forskjeller på henholdsvis ca. 30 %, 25 % og 50 % for disse parametrene sammenlignet med den umodifiserte kontrollen 'Coker 312'. Søker hevder imidlertid at de statistiske undersøkelsen for malvalin- og sterkulsyre ikke er gyldige fordi ANOVA-analysen viser signifikante effekter av herbicidbehandling, lokalitet og år. Når det gjelder uraffinert olje ble det funnet signifikante forskjeller over 20 % mellom GHB614 og 'Coker 312' for innhold av total gossypol og dihydrosterkulsyre. Det ble ikke funnet signifikante forskjeller for raffinert olje.

Tabell 9. Resultater fra variasjonsanalyser (ANOVA) for antinæringsstoffer i frø

Summary t- test procedures *	A vs B		A vs C	
	significant	not significant	significant	not significant
Free Gossypol	2	15	1	16
(+) Gossypol	4	13	4	13
(-) Gossypol	4	13	2	15
Total Gossypol	1	16	4	13
Malvalic acid	10^a	4^a	9^a	5^a
Sterculic acid	9^a	7^a	10^a	6^a
Dihydrosterculic acid	3^a	-	3^a	-

* Number of sites with significant ($p < 0.05$) and not significant ($p > 0.05$) treatment differences

A = counterpart, control samples

B = GHB614 samples, not sprayed with glyphosate

C = GHB614 samples, sprayed with glyphosate

^a figures in bold indicate that at the majority of sites significant differences were found

Toksiner og allergener

I henhold til søkers dokumentasjon ble innholdet av aflatoksiner målt i røstet mel. Nivået aflatoksiner i melet, som ble benyttet i føringforsøk med kylling, var under 5 ppb. Den norske grenseverdien for totalinnhold av aflatoksiner i korn og kornprodukter er på 4 ppb.

Søker har videre undersøkt aminosyresekvenshomologi for 2mEPSPS-proteinet til kjente toksiner og allergener i offentlig tilgjengelige databaser. Kriterier som ble benyttet var 35 % homologi og et vindu på 80 aminosyrer. Det ble ikke funnet homologe sekvenser med kjente toksiner eller allergener.

Analyse av protein og DNA i raffinert bomullsolje.

Bayer CropScience har analysert raffinert bomullsolje for protein og DNA. Verken 2mEPSPS-protein eller DNA ble påvist over deteksjonsgrensen i raffinert olje. Deteksjonsgrense for DNA i olje er 0,1 µg/ml olje.

3.3. Agronomiske egenskaper

Forsøk 2004 (split-plot design)

Total 23 ulike fenotypiske karakterer ble evaluert i løpet av vekstsesongen 2004. Bayer opplyser at det er foretatt registreringer av egenskaper knyttet til reproduksjon, spredning, vekst og utvikling, morfologi, kvalitet (frø, fiber), sjukdoms- og insektsresistens, samt toleranse mot ulike abiotiske stressfaktorer. Det er foretatt statistiske analyser innen steder og kombinerte analyser over steder for hver karakter. De kombinerte analysene viser signifikante forskjeller ($p \leq 0,05$) mellom GHB614 og kontrollinjen for karakterene frøavling og fiberkvalitet. I følge søker er imidlertid gjennomsnittsverdiene for disse parametrene innenfor variasjonsområdene for referansessortene og 99 % toleranseintervall. For de øvrige karakterene ble det ikke funnet signifikante forskjeller.

Forsøk 2005 (split-plot design)

Totalt 23 ulike fenotypiske karakterer ble evaluert i løpet av vekstsesongen 2005, de samme variabler som i 2004. Statistiske analyser over steder viser signifikant ($p \leq 0,05$) lavere frøavling og fiberkvalitet hos testlinjen sammenlignet med kontrollen. Men igjen pekes det på at gjennomsnittsverdiene for denne karakteren ligger innenfor variasjonsområdene for referansessortene.

Forsøk 2005, (fullstendig randomisert blokkdesign)

På 3 ulike lokaliteter er forsøksoppsettet utført som fullstendig randomisert blokkdesign. Totalt er det undersøkt for 24 ulike fenotypiske karakterer. Det ble ikke benyttet glyfosat i disse forsøkene. De kombinerte analysene viser noen få signifikante forskjeller mellom GHB614 og kontrollinjen. I følge søker er imidlertid disse forskjellene regionale forskjeller og ikke konsistente over alle forsøkssteder.

3.4. Delkonklusjon

Analysene av ernæringsmessige komponenter er utført i tråd med OECDs konsensusdokument for bomull (OECD 2004). Analysene viser statistisk signifikante forskjeller for enkeltparametere, men forskjellene er ikke konsistente over forsøksfelt og ligger innenfor typiske verdier som er rapportert i litteraturen. Med unntak for dehydrosterulsyre, er forskjellene mellom testlinje og kontroll for samtlige komponenter mindre enn ± 20 %. Faggruppen anser at de forskjellene som er påvist ikke har helsemessig betydning.

Resultatene fra undersøkelsene av agronomiske og morfologiske karakterer viser at, med unntak av herbicidresistens, er det små eller ingen forskjeller mellom GHB614 og kontrollsorter.

4. Dokumentasjon av toksisitet og allergenitet

4.1. Toksisitet

Akuttforsøk på mus

Det er utført akuttstudie på mus med bakterielt produsert 2mEPSP-protein fra *E. coli*. Studiene er utført i henhold til U.S. E.P.A. Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.1100 (godkjent i 2002) og O.E.C.D.s Test Guideline 425 (godkjent i 2001), for oral akuttoksisitetsstudier (US EPA 2002, OECD 2001). Akuttstudien på mus ble utført i henhold til "Good Laboratory Practice" vedtekter fra US EPA 1989, OECD 1998, EU direktiv 2004/10/EC, Japan MAFF 2000 og fransk dekret N°98-1312. I hver av studiene inngikk 5 hunn-mus. Det ble benyttet 2mEPSPS-doser på 2000 mg/kg kroppsvekt. Som kontroll ble det benyttet bovint serumalbumin (2000 mg/kg kroppsvekt). Alle dyr ble observert daglig for kliniske tegn på forgiftning, mens kroppsvekten ble målt ukentlig. Etter 15 dager ble det ikke registrert tegn på toksisk påvirkning i noen av forsøkene. Dyrene ble avlivet og det ble ikke påvist organskader ved grov patologisk undersøkelse. Faggruppen finner disse studiene tilfredsstillende. Generelt, med unntak for allergene proteiner, er proteiner ikke akuttoksiske.

Føringsforsøk på broiler

Søknaden inneholder dokumentasjon fra 42-dagers føringsforsøk på broilere. Undersøkelsen inkluderte 420 dyr, fordelt på 3 grupper à 140 dyr. Dyrene ble fordelt på 14 bur med 10 broiler per bur (7 bur med hanner og 7 bur med hunner). Studien er utført i henhold til "Good Laboratory Practice" vedtekter fra US EPA, OECD og Japan MAFF. Dyrene ble føret med ca. 10 % røstet bomullsmel innblandet i standardfôr. Bomullsmålet var fra en kommersiell bomullssort, umodifisert kontroll 'Coker 312' og den transgene linjen GHB614. Statistisk analyse indikerer signifikante forskjeller mellom gruppene for flere testparametre. Majoriteten av forskjellene ble funnet mellom kommersiell bomull og umodifisert tradisjonelt motstykke. Ved testdag 42 ble det vist signifikante forskjeller mellom kommersiell, umodifisert bomull og umodifisert kontrollinje for flere av de undersøkte

parametrene. Det ble ikke påvist signifikante forskjeller ved føring med transgen bomullsmel og mel fra 'Coker 312'. Det var heller ingen signifikante forskjeller ved føring med mel fra transgen bomull og kommersiell umodifisert bomull. Søker konkluderer med at forskjellene som er påvist ikke kan relateres til genmodifiseringen.

Subkronisk føringsforsøk på rotter

Bayar CropScience har ikke foretatt 13 ukers føringsforsøk med rotter.

4.2. Allergenitet

Aminosyresekvensen til de fleste viktige allergener, deriblant matallergener, er kjent. De viktige IgE-bindingsepitopene, dvs. aminosyresekvenser på 5-7 aminosyrer der IgE binder seg, er kartlagt for mange allergener. Det er utført *in silico* søk for aminosyresekvenshomologi for 2mEPPSPS-proteinet til aminosyresekvenser i databasene Uniprot_Swissprot, Uniprot_TrEMBL, PIR, NRL-3D, DAD og GenPept. Disse basene inneholder aminosyresekvenser til kjente allergener og toksiner. Analysene av 2mEPPSPS proteinet er gjort i henhold til FAO/WHO sine retningslinjer (FAO/WHO 2001). Kriterier som er benyttet er oppdeling i overlappende blokker på 8 aminosyrer. Det ble ikke funnet sekvenshomologi til epitoper til kjente allergener. Det er også foretatt undersøkelser for potensielle O- og N-glykosyleringssteder siden disse ofte finnes i allergener. Det ble ikke funnet potensielle glykosyleringssteder i 2mEPPSPS-proteinet.

4.3. Delkonklusjon

Faggruppen konkluderer med at det på bakgrunn av disse forsøkene ikke er grunn til å anta at den ernæringsmessige kvaliteten til den genmodifiserte bomullen er forskjellig fra umodifisert bomull.

5. Miljørisikovurdering

Bayers søknad om godkjenning av den transgene bomullslinjen GHB614 under forordning 1829/2003/EF omfatter bruksområdene næringsmidler, fôrvarer, import og prosessering. Søknaden gjelder ikke dyrking. Miljørisikovurderingen av GHB614 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 føret med biprodukter fra transgene bomullsfrø representere en mulig kilde til uønsket genspredning.

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

Slekten *Gossypium* (*Malvaceae*) består av om lag 50 diploide og allotetraploide arter, av disse er *G. arboretum*, *G. barbadense*, *G. herbaceum* og *G. hirsutum* domestiserte og benyttet som landbruksplanter (Brubaker *et al.* 1999). *G. herbaceum* L. og *G. hirsutum* L. har vært dyrket i Sør-Europa siden 1800-tallet (EFSA 2006b). I dag er *G. hirsutum* L den arten som har størst dyrkingsomfang på verdensbasis, med India, Kina, USA og Pakistan som de største produsentlandene (FAOSTAT 2006). I Europa dyrkes det bomull i Hellas, Spania og noe i Bulgaria.

G. hirsutum L ('upland cotton') er opprinnelig en flerårig busk, men dagens kommersielle sorter dyrkes som ettårige kulturer. Bomullsplanten er tilpasset et subtropisk og tropisk klima og overvintring betinger månedlige gjennomsnittstemperaturer over 18 °C. *G. hirsutum* L er en tetraploid og overveiende selvbefruktende art. Pollenkornene er relativt store, tunge og klebrige, og eventuell pollenspredningen skjer primært med humler og bier som vektorer. Graden av utkryssing varierer mellom sorter og tilstedeværelse av pollinatorer, og skjer normalt ved lave frekvenser (0-25 %) (Xanthopoulos & Kechagia 2000; Turley & Kloth 2002). Det er ingen stedege eller introduserte viltvoksende arter i den europeiske flora som *G. hirsutum* L kan hybridisere med. Spredte forekomster

av forvillede planter fra *G. herbaceum* L. og *G. hirsutum* L. kan imidlertid forekomme (ref. EFSA 2006b).

Frø av dyrkede former av bomull har normalt ingen form for frøkvile (dormancy). Det er imidlertid kjent at ytre miljøbetingelser som lave jordtemperaturer og/eller fuktighet kan indusere sekundær (eksogen) frøkvile (OGTR 2002). Enkelte dyrkede sorter av bomull har endogen frøkvile, noe som skyldes forekomsten av 'harde frø'. Frøene må imidlertid ha mye sol og spirer bare under snevre klimatiske betingelser (optimal spiretemperatur 25 – 30 °C). Bomullsplanten krever en lang vekstsesong for frømodning (120-200 døgn), og under norske vekstforhold vil derfor eventuelle planter spirt fra spillfrø ikke kunne reproducere.

Spredning av bomull til andre habitater i Europa er i hovedsak begrenset av manglende frøkvile og liten toleranse for lave temperaturer. Det er ikke påvist forskjeller mellom den transgene bomullslinjen GHB614 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 bomull.

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 2004; 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 GHB614 skal kunne overføres til andre enn naturens kryssingspartnere ved detekterbare frekvenser i laboratoriestudier. Det er gjort forsøk som ser på stabilitet og opptak av DNA fra tarmkanalen hvor mus er oralt tilført M13 DNA. Det tilførte DNAet var sporbart i avføring opp til syv timer etter fôring. Svært små mengder av M13 DNA (< 0,1 %) kunne spores i blodbanene i en periode på maksimum 24 timer, mens M13 DNA ble funnet i opptil 24 timer i lever og milt (Schubbert *et al.* 1994). Ved oralt inntak av genmodifisert soya er det vist at DNA er mer stabilt i tarmen hos personer med utlagt tarm sammenlignet med kontrollgruppen (Netherwood *et al.* 2004). I kontrollgruppen ble det ikke påvist GM DNA i feces. Nielsen *et al.* (2000) og De Vries & Wackernagel (2002) har undersøkt persistens av DNA og opptak av GM DNA i jord. I disse laboratorieforsøkene ble det påvist svært små mengder DNA som var overført fra planter til bakterier. 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 det innsatte genet 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 GHB614 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 GHB614.

5.2.2. Vertikal genoverføring

Bomull dyrkes ikke i Norge, og arten har ikke viltvoksende populasjoner eller nærstående arter utenfor dyrking i Europa. Utsiktet 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 bomullslinjen GHB614 for import, prosessering og til bruk i næringsmidler og fôrvarer. Faggruppen har derfor ikke vurdert mulige miljøeffekter knyttet til dyrking av bomullslinjen. Det er ingen indikasjoner på økt sannsynlighet for spredning, etablering og invasjon av bomullslinjen i naturlige habitater eller andre arealer utenfor jordbruksområder som resultat av frøspill i forbindelse med transport og prosessering. Bomull 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.

5.4. Vurdering av søkers dokumentasjon/kunnskapshull

Ingen innspill fra FG3 til EFSA-nett.

KONKLUSJON

Analysen av ernæringsmessige viktige komponenter er utført i tråd med OECDs konsensusdokument for bomull (OECD 2004). Faggruppen anser analysene for å være tilstrekkelige for en vurdering av bomullslinjen GHB614 til bruk som fôr, samt for olje til bruk som mat.

Det er påvist statistisk signifikante forskjeller for enkelte komponenter, men forskjellene er ikke konsistente over forsøksfelt og verdiene ligger innenfor typiske verdier for andre bomullssorter som er rapportert i litteraturen.

Flere studier viser at 2mEPSPS-proteinet som blir uttrykt som følge av genmodifiseringen ikke er akutt toksisk eller allergent. Bayer CropScience har utført og henviser til akuttstudier på mus og fôringsforsøk på broilere med det aktuelle proteinet. Disse studiene viser at proteinet ikke fører til påvisbare helseeffekter på dyrene.

Faggruppen konkluderer med at det er lite sannsynlig at eksponering for 2mEPSPS-proteinet i seg selv, og i de mengder som tilføres via fôr fra den genmodifisert bomull fører til allergi eller toksiske effekter.

Faggruppe for genmodifiserte organismer konkluderer med at bomullsfrøolje og fôrvarer fra GHB614 er vesentlig lik olje og fôrvarer fra umodifiserte bomullsfrø, og finner at bruk av olje og fôrvarer fra den transgene bomullslinjen ikke utgjør noen større helserisiko enn kommersiell olje og fôrvarer fra umodifiserte bomullsplanter.

Søknaden gjelder godkjenning av bomullslinjen GHB614 for import, prosessering, mat og fôr. Faggruppen har derfor ikke vurdert mulige miljøeffekter knyttet til dyrking av bomullslinjen. Det er ingen indikasjoner på økt sannsynlighet for spredning, etablering og invasjon av bomullslinjen i naturlige habitater eller andre arealer utenfor jordbruksområder som resultat av frøspill i forbindelse med transport og prosessering. Bomull dyrkes ikke i Norge, og det er ingen stedegne eller introduserte viltvoksende arter i den europeiske flora som bomull kan hybridisere med. Det er derfor ikke risiko for utkryssing med dyrkede sorter eller ville planter i Norge.

Samlet vurdering

Faggruppen finner det lite trolig at den omsøkte bruken av bomullslinjen GHB614 vil medføre endret risiko for helse og miljø i forhold til annen bomull.

REFERANSER

- Bayer CropScience (2008). Søknad EFSA/GMO/NL/2008/51.
- Bensasson, D., Boore, J. L. & Nielsen, K. M. (2004). Genes without frontiers. *Heredity*, **92**, 483-489.
- Brubaker, C.L., Bourland, F.M. & Wendel, J.E. (1999). The origin and domestication of cotton. *In*: C.W. Smith, J.T. Cothren, eda Cotton: Origin, History, Technology and Production. John Wiley and Sons, Inc., New York, pp 3-31.
- de Vries, J. & Wackernagel, W. (2002). Integration of foreign DNA during natural transformation of *Acinetobacter* sp. by homology-facilitated illegitimate recombination. *The Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **99**, 2094-2099.
- EFSA (2004). Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on the use of antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified plants. *The EFSA Journal*, **48**, 1-18. http://www.efsa.europa.eu/en/science/gmo/gmo_opinions/384.html
- EFSA (2006a). *Guidance document of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed*. ISBN: 92-9199-019-1. European FOOD Safety Authority, Parma, Italy. 100 p. http://www.efsa.europa.eu/en/science/gmo/gmo_guidance/660.html
- EFSA (2006b). Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on an application (Reference EFSA-GMO-NL-2005-13) for the placing on the markets of Glufosinate-tolerant genetically modified LLCotton 25, for food and feed uses, and import and processing under Regulation (EC) No 1829/2003 from Bayer Crop Science (Question No EFSA-Q-2005-047). *The EFSA Journal*, **429**, 1-19.
- FAOSTAT (2006). Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://faostat.fao.org>
- Lebrun, M., Sailland, A., Freyssinet, G. & Degryse, E. (2003). Mutated 5- enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase, gene coding for said protein and transformed plants containing said gene. US patent US6566587B1 (20-MAY-2003). BAYER CROPSCIENCE SA (FR).
- 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*, **1**, 96-149.
- OECD (2001). Organization for Economic Co-operation and Development (O.E.C.D) Guideline for Testing of Chemicals, Test Guideline N°425: Acute Oral Toxicity — Up-and- Down Procedure. December 17. 2001,

- OECD (2004). *Consensus Document on Compositional Consideration for New Varieties of Cotton (Gossypium hirsutum and Gossypium barbadense): Key Food and Feed Nutrients and Anti-nutrients.*, No. 11, Series on Safety of Novel Foods and Feeds.
- OGTR (2002). Office of the Gene Technology Regulator, Department of Health and Ageing, Austrian Government. The Biology and Ecology of cotton (*Gossypium hirsutum*) in Australia. 30 p. <http://www.ogtr.gov.au/pdf/ir/biologycotton.pdf>
- 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.
- Turley, R.B. & Kloth, R.H. (2002). Identification of a Third Fuzzless Seed Locus in Upland Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *The Journal of Heredity*, **93**, 359-364.
- U.S. E.P.A (2002). United States Environmental Protection Agency 1998. Prevention, Pesticides and Toxic Substances (7101), Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.1100, *Acute Oral Toxicology*, EPA 712-C-98-190, December 2002.
- 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.
- Xanthopoulos, F.P. & Kechagia, U.E. (2000). Natural crossing in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Australian Journal of Agricultural Research*, **51**, 970-983.