



**Helse- og miljørisikovurdering av genmodifisert
bomullslinje MON 15985 x MON 1445 fra Monsanto
(EFSA/GMO/UK/2008/58)**

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

10.12.08

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, Jihong Liu Clarke, 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

Koordinatorer fra sekretariatet:

Arne Mikalsen, Merethe Aasmo Finne

SAMMENDRAG

Helse- og miljørisikovurderingen av den genmodifiserte insektsresistente og herbicidtolerante bomullshybriden MON 15985 x MON 1445 fra Monsanto (EFSA/GMO/UK/2008/58) 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 bomullshybriden MON 15985 x MON 1445 til import og prosessering, og til bruk i næringsmidler og fôrvarer. Søknaden gjelder ikke dyrking. Monsanto søkte opprinnelig om godkjenning av bomullshybriden i 2005, men søknaden ble trukket og erstattet av vedlagte søknad i 2008. I forbindelse med forrige søknadsrunde vurderte faggruppen helseaspekter knyttet til bruk av MON 1595 x MON 1445 som mat og fôr (VKM 2005a).

Risikovurderingen av den genmodifiserte bomullen er basert på dokumentasjon som er gjort tilgjengelig på EFSAs nettside GMO EFSA-net. I tillegg er det benyttet informasjon fra uavhengige vitenskapelige publikasjoner i vurderingen. MON 15985 x MON 1445 er risikovurdert i henhold til tiltenkt bruk og faggruppen har derfor ikke vurdert helse- og miljøeffekter knyttet til dyrking av bomullshybriden. Vurderingen er gjort i overensstemmelse med miljø- og helsekravene i genteknologiloven med forskrifter, først og fremst forskrift om konsekvensutredning etter genteknologiloven, samt kravene i EU-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 EFSAs retningslinjer for risikovurdering av genmodifiserte planter (EFSA 2006a) og Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) konsensusdokument for bomull (OECD 2004) lagt til grunn for risikovurderingen.

Den vitenskapelige vurderingen omfatter transformeringsprosess og vektorkonstruksjon, karakterisering og nedarving av det transgene konstruktet, komparativ analyse av ernæringsmessig kvalitet, mineraler, kritiske toksiner, antinæringsstoffer, allergener og nye proteiner. Videre er agronomiske egenskaper, potensiale for utilsiktede effekter på fitness, genoverføring og effekter på ikke-målorganismer vurdert. Bomullslinjen omsettes under handelsnavnet Bollgard II®/Roundup Ready® Cotton.

MON 15985 x MON 1445 er dannet ved tradisjonell kryssing mellom foreldrelinjene MON 1445 og MON 15985. MON 15985 er fremkommet ved biolistisk transformasjon av meristemceller fra den genmodifiserte bomullslinjen MON 531. MON 531 uttrykker Cry1Ac- og NPTII-protein, og inneholder også et ikke-funksjonelt *aadA*-gen. Bomullslinjen MON 15985 inneholder fire ekspresjonskassetter som, i tillegg til Cry1Ac- og NPTII, uttrykker Cry2Ab2- og GUS-protein. De bakterielle genene *cry1Ac* og *cry2Ab2* er isolert fra *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, og koder for δ -endotoksiner som gir plantene toleranse mot enkelte arter i ordenen *Lepidoptera*, eksempelvis *Helicoverpa armigera* ('cotton bollworm'), *Heliothis virescens* ('tobacco budworm') og *Pectinophora gossypiella* ('pink bollworm'). β -D-glukuronidase (GUS)-enzym fra *E. coli* muliggjør visuell identifikasjon av plantemateriale som har fått innsatt *cry2Ab2* under transformeringsprosessen av MON 15985. Antibiotikaresistensgenet *nptII* fra bakterien *E. coli* danner enzymet neomycin fosfotransferase (APH(3')II), som uttrykker resistens mot antibiotika som kanamycin og neomycin.

Foreldrelinjen MON 1445 er fremkommet ved *Agrobacterium*-mediert transformasjon av celler fra den kommersielle maissorten 'Coker 312'. Det rekombinante DNA-fragmentet inneholder to ekspresjonskassetter med henholdsvis ett *cp4-epsps*-gen og ett *nptII*-gen i hver kassett. DNA-fragmentet i MON 1445 inneholder også et *aadA*-gen, men dette genet uttrykkes ikke i planten. *Cp4 epsps*-genet koder for enzymet 5-enolpyruvylsikumat-3-fosfatsyntetase, som omdanner fosfoenolpyruvat og sikimat-3-fosfat til 5-enolpyruvylsikumat-3-fosfat, en viktig metabolitt i syntesen av aromatiske aminosyrer. N-fosfonometylglycin (glyfosat) hemmer generelt EPSPS-enzym og blokkerer derved biosyntesen av aromatiske aminosyrer i planter. I motsetning til EPSPS-enzym i

mais er bakterie CP4 EPSPS-enzymet aktivt ved nærvær av glyfosat. De transgene plantene vil derfor tolerere høyere doser av herbicider med virkestoff glyfosat sammenlignet med konkurrerende ugras. *Cp4-epsps*-genet stammer fra jordbakterien *Agrobacterium tumefaciens* stamme CP4.

Bomullsfør 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 bomullsfør som brukes som menneskeføde, mens hele bomullsfør og biprodukter som mel og kli fra oljeproduksjonen brukes som fôr. Etter det faggruppen kjenner til benyttes ikke bomullsførølje til produksjon av dyrefør. Søknaden under forordning 1829/2003/EF omfatter ikke bruk av hele frø til mat.

Analysene av ernæringsmessige viktige komponenter i frø ble vurdert. Det ble bemerket at noen av de komponenter som OECDs konsensusdokument (OECD 2004) anbefaler analysert for bomull ikke er utført. Det er funnet statistisk signifikante forskjeller for enkelte komponenter, men forskjellene er ikke konsistente over forsøksfeltene. Faggruppen anser analysene for å være tilstrekkelige for en vurdering av MON 15985 x MON 1445 til bruk som mat og fôr.

Informasjon vedrørende allergenisitet viser at for de parametere som er målt, har ikke det uttrykte proteinet likheter med kjente allergener eller egenskaper som tilsier at det er allergenet.

Faggruppe for genmodifiserte organismer konkluderer med at bomullsførølje fra MON 15985 x MON 1445 er vesentlig lik olje fra umodifisert bomull, og finner ikke at oljen fra bomullslinjen utgjør noen større helserisiko enn kommersiell olje fra umodifiserte bomullplanter.

Nivået av antinæringsstoffet gossypol er signifikant høyere i MON 15985 x MON 1445 sammenlignet med kontrollinjen. Faggruppen påpeker at økt innhold av gossypol er en uønsket egenskap ved planten, men konkluderer med at så lenge innholdet av antinæringsstoffet er oppgitt og at mengden i kraftfôr er i henhold til fôrvareforskriften, skulle dette ikke medføre noen helsefare for dyr.

De innsatte antibiotikaresistensmarkørgenene (ARMG) *nptII* og *aadA* koder for resistens mot enkelte aminoglykosider som benyttes i norsk landbruk (VKM 2005b). De tilgjengelige data tyder på at forekomsten av *nptII*-genet i patogene bakterier i Norge er lav. Kunnskap om forekomsten av *nptII*-genet i miljøet er imidlertid mangelfull. En studie fra 2004 påviser 21 % forekomst av *aadA*-genet blant 136 *E. coli*-isolater fra kjøttprøver i Norge (NORM/NORM-VET 2004). Forekomsten av streptomycinresistens i *Salmonella* fra dyr er imidlertid rapportert til 0 % i samme studie. Kunnskapen om forekomsten av *aadA*-genet i relevante bakteriepopulasjoner, som vil eksponeres via dyrefor, er derfor varierende.

Flertallet i faggruppen konkluderer med at tilstedeværelse av nptII-gener i mat og fôr produsert fra den genmodifiserte bomullshybriden MON 15985 x MON 1445 ikke er en signifikant kilde til nptII-gener i bakterier som lever i menneskets og dyrs tarmsystem, sammenlignet med de nptII-genene som allerede er tilstede i bakteriepopulasjonen i tarmen. Medlemmene finner også at på bakgrunn av den påviste tilstedeværelsen av aadA-genet og andre streptomycinresistensgener hos bakterier i Norge vil et eventuelt bidrag til resistensnivået fra MON 15985 x MON 1445 være neglisjerbart og ikke innebære noen økt risiko.

Et mindretall i faggruppen (K. M. Nielsen, C. Linnestad, A. Myhr, T. Bøhn, O. Stabbetorp, H. Klungland) påpeker store forskjeller i geografisk utbredelse av antibiotikaresistens i Europa, samt at det mangler publisert dokumentasjon på forekomsten av nptII-genet i Norge. En enkeltstudie indikerer høy forekomst av aadA-genet i E. coli fra kjøttprøver, men ingen forekomst i Salmonella. I fravær av vitenskaplig dokumentasjon, antas genforekomsten til nptII i Norge å være lav, og forekomsten til aadA-genet til å være varierende med lite datagrunnlag. Det påpekes at neomycin og streptomycin benyttes i norsk landbruk, og at et seleksjonstrykk på eventuelle sjeldne transformanter derfor ikke kan utelukkes. Antibiotikaene, som genene nptII og aadA gir resistens imot, er klassifisert av European Medicines Agency (EMA 2007) og WHO (2005) som ”critically important”. Manglende

datagrunnlag gjør at mindretallet ikke ønsker å konkludere med hensyn på risiko knyttet til bruk av nptII-genet som ARMG, og det påpekes usikkerhet i datagrunnlaget for aadA- forekomsten i relevante husdyrpopulasjoner.

Søknaden gjelder godkjenning av bomullslinjen MON 15985 x MON 1445 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 helse- og 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.

Samlet vurdering

Faggruppe for genmodifiserte organismer konkluderer med at bomullsfrøolje fra MON 15985 x MON 1445 er vesentlig lik olje fra umodifiserte bomullsfrø, og finner ikke at bruk av matoljen, isolert sett, utgjør noen større helserisiko enn kommersiell olje fra umodifiserte bomullsplanter. Manglende datagrunnlag gjør at et mindretall av medlemmene i faggruppen (K. M. Nielsen, C. Linnestad, A. Myhr, T. Bøhn, O. Stabbetorp, H. Klungland) ikke ønsker å konkludere med hensyn på risiko knyttet til tilstedeværelse av *nptII*-genet.

En samlet faggruppe finner det lite trolig at den omsøkte bruken av bomullslinjen MON 15985 x MON 1445 vil medføre endret risiko for miljø i forhold til annen bomull.

NØKKELORD

Bomull, *Gossypium hirsutum* L., genmodifisert bomull, MON 15985 x MON 1445, insektsresistens, herbicidtoleranse, Cry1Ac, Cry2Ab2, CP4 EPSPS, *nptII*-gen, *aadA*-gen, helsemessig trygghet, helse, miljø, forordning 1829/2003/EF, direktiv 2001/18/EF

INNHALDSFORTEGNELSE



.....	1
BIDRAGSYTERE	2
Vurdert av.....	2
SAMMENDRAG.....	3
NØKKELOD.....	5
INNHALDSFORTEGNELSE.....	6
BAKGRUNN	8
OPPDRA FRA DIREKTORATET FOR NATURFORVALTING OG MATTILSYNET	8
RISIKOVURDERING	10
1. Innledning.....	10
1.1. Beskrivelse av egenskap(er) og virkningsmekanismer	10
2. Molekylær karakterisering	11
2.1. Evaluering av foreldrelinje MON 15985	11
2.2. Evaluering av foreldrelinje MON 1445	14
3. Komparative analyser.....	18
3.1. Valg av komparator og forsøksdesign.....	18
3.2. Analyser av ernæringsmessige komponenter	19
3.3. Agronomiske egenskaper	21
3.4. Delkonklusjon	21
4. Dokumentasjon av toksisitet og allergenisitet.....	21
4.1. Toksisitet	21
4.2. Allergenisitet	23
4.3. Delkonklusjon	24
5. Miljørisikovurdering	24
5.1. Potensiale for ikke tilsiktede effekter på fitness relatert til genmodifiseringen.....	24
5.2. Potensiale for genoverføring	25
5.4. Potensiale for samspill mellom GMP og ikke-målorganismer	26
5.5. Potensiale for samspill med abiotisk miljø og eventuelle effekter på biogeokjemiske prosesser.....	27
5.6. Overvåking	27

5.7. Delkonklusjon	27
6. Vurdering av søkers dokumentasjon/kunnskapshull.....	28
KONKLUSJON	29
REFERANSER	31

BAKGRUNN

Faggruppe for genmodifiserte organismer i Vitenskapskomiteen for mattrygghet (VKM) er blitt bedt av Mattilsynet og Direktoratet for naturforvaltning om å foreta en vitenskapelig vurdering av helse- og miljørisiko ved en eventuell godkjenning av den genmodifiserte bomullshybriden MON 15985 x MON 1445 fra Monsanto Europe S.A. (EFSA/GMO/UK/2008/58). MON 15985 x MON 1445 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 britiske myndigheter i april 2007. Søknaden omfatter ikke bruk av hele frø som mat.

Monsanto leverte første søknad om godkjenning av MON 15985 x MON 1445 til mat og fôr under forordning 1829/2003/EF i 2005 (EFSA/GMO/UK/2005/10). Denne søknaden, som også inkluderte bomullslinjen MON 15985, ble trukket tilbake av søker i juli 2008 og erstattet av søknad EFSA/GMO/UK/2008/58.

Søknaden ble lagt ut på EFSA-nett 20. august 2008, med frist på 90-dager for innspill fra EU- og EØS/EFTA-landene. I forbindelse med forrige søknadsrunde vurderte faggruppen helseaspekter knyttet til MON 15985 x MON 1445 (VKM 2005a)

MON 15985 x MON 1445 er notifisert som eksisterende produkt under forordning 1829/2003/EF, artikkel 8 og 20. Godkjenningen av bomullslinjen gikk ut i april 2007, og Monsanto har søkt om fornyet godkjenning fram til 2017. Søknaden EFSA/GMO/RX/MON 15985 x MON 1445 omfatter bruksområdene fôrstoffer og tilsetningsstoffer til mat og fôr, og er nå til behandling i EFSA. Søknaden ble ikke vurdert av VKM i denne søknadsrunden.

I Norge ble MON 15985 x MON 1445 innmeldt som prosessert fôrvarer under den nasjonale overgangsordningen for eksisterende GM-produkter 15. mars 2006 (jfr. fôrvarerforskriftens § 7a), og var tillatt å omsette på det norske markedet fram til 15. september 2008. Det er foreløpig uklart om overgangsordningen forlenges i påvente av innlemmelse av EUs rettsakter i EØS-avtalen. Notifiseringen gjelder fôrvarer både til landdyr og til oppdrettsfisk.

http://www.mattilsynet.no/mattilsynet/multimedia/archive/00034/Tillatte_eksisterend_34512a.pdf

MON 15985 x MON 1445 er godkjent for dyrking i Australia og USA, og for omsetning som mat og/eller fôr i Japan, Korea, Mexico og Filippinene (Agbios 2008; Monsanto 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/UK/2008/58, genmodifisert bomullslinje MON 15985 x MON 1445, ble lagt ut på EFSA-nett 20. august 2008. Faggruppe for genmodifiserte organismer skal i tråd med oppdragsbrev utarbeide helse- og miljørisikovurdering av bomullshybriden til import og industriell prosessering, samt til bruk som næringsmiddel og fôrvarer. Søknaden gjelder ikke dyrking. Vurderingen 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 2006a).

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/UK/ 2008/58, MON 15985 x MON 1445.

Unik kode: MON-15985-7 x MON-Ø1445-2.

Status i EU: Søknad under forordning 1829/2003/EF. EFSA's frist for innspill er 26.11.08.

Ønsket svarfrist til Mattilsynet/DN: 23. 11. 08.

RISIKOVURDERING

1. Innledning

Helse- og miljøvurderingen av den genmodifiserte bomullshybriden MON 15985 x MON 1445 er basert på dokumentasjon som er gjort tilgjengelig på EFSAAs 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 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 EU/EØS-området.

Faggruppen har vedtatt å benytte EFSAAs retningslinjer som 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 modified organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed" (EFSA 2006a). 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 Faggruppe for genmodifiserte organismer som har vurdert den genmodifiserte bomullen.

1.1. Beskrivelse av egenskap(er) og virkningsmekanismer

MON 15985 x MON 1445 er dannet ved tradisjonell kryssing mellom foreldrelinjene MON 1445 og MON 15985.

Foreldrelinjen MON 15985 er fremkommet ved transformasjon av den genmodifiserte linjen MON 531. MON 531 uttrykker Cry1Ac- og NPTII- proteiner, og inneholder også et ikke-funksjonelt *aadA*-gen. Et lineært rekombinant DNA fragment på 6092 basepar ble satt inn i meristemceller fra MON 531 ved hjelp av partikkelakselerasjonsmetoden. Det rekombinante DNA-fragmentet stammer fra plasmidet PV-GHBK11, og inneholder genene *cry2Ab2* og *uidA*. MON 15985 inneholder dermed fire ekspresjonskassetter, som uttrykker Cry1Ac-, Cry2Ab2-, GUS- og NPTII-protein. Den ene ekspresjonskassetten inneholder også et *aadA*-gen, men dette uttrykkes ikke i planten. De bakterielle genene *cry1A.c* og *cry2Ab2* er isolert fra *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaci*, og koder for δ -endotoksiner som gir plantene toleranse mot enkelte arter i ordenen *Lepidoptera*, eksempelvis *Helicoverpa armigera* ('cotton bollworm'), *Heliothis virescens* ('tobacco budworm') og *Pectinophora gossypiella* ('pink bollworm'). β -D-glukuronidase (GUS) enzym fra *E. coli* muliggjør visuell identifikasjon av det plantematerialet som har fått innsatt *cry2Ab2* under transformeringsprosessen av MON 15985. Antibiotikaresistensgenet *nptII* fra bakterien *E. coli* danner enzymet neomycin fosfotransferase (APH(3')II), som gir resistens mot antibiotika som kanamycin og neomycin.

Foreldrelinjen MON 1445 er fremkommet ved *Agrobacterium*-mediert transformasjon av celler fra den kommersielle maissorten 'Coker 312'. Det rekombinante DNA-fragmentet på 5734 basepar fra PV-GHGT07-plasmidet inneholder to ekspresjonskassetter med henholdsvis ett enkelt *cp4-epsps*-gen og ett *nptII*-gen i hver kassett. *Cp4 epsps*-genet koder for enzymet 5-enolpyruvylsikimat-3-fosfatsyntetase, som omdanner fosfoenolpyruvat og sikimat-3-fosfat til 5-enolpyruvylsikimat-3-fosfat, en viktig metabolitt i syntesen av aromatiske aminosyrer. *Cp4-epsps*-genet stammer fra jordbakterien *Agrobacterium tumefaciens* stamme CP4. N-fosfonometylglycin (glyfosat) hemmer generelt EPSPS-enzymet og blokkerer derved biosyntesen av aromatiske aminosyrer i planter. I motsetning til EPSPS-enzym i mais er CP4 EPSPS-enzymet også aktivt ved nærvær av glyfosat. MON 1445 uttrykker både CP4 EPSPS- og NPTII-protein. Det rekombinante DNA-fragmentet inneholder også et ikke-funksjonelt *aadA*-gen.

2. Molekylær karakterisering

2.1. Evaluering av foreldrelinje MON 15985

2.1.1. MON 531

Bomullslinjen MON 15985 er fremkommet ved biolistisk transformasjon av meristemceller fra den genmodifiserte bomullslinjen MON 531.

MON 531 inneholder et rekombinant DNA-fragment på 7916 basepar fra PV-GHBK04-plasmidet. DNA-fragmentet inneholder to ekspresjonskassetter, med henholdsvis ett *cryIAC*-gen med regulatoriske områder og ett *nptII*-gen med regulatoriske områder (figur 1). I henhold til dokumentasjonen fra Monsanto inneholder fragmentet to ikke-funksjonelle genelementer.

CryIAC-ekspresjonskassetten:

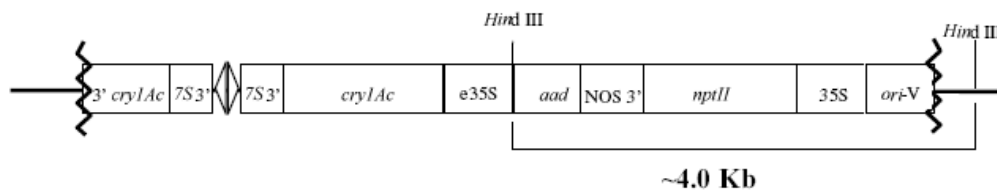
- a) *e35s* promoter fra blomkålmosaikkvirus med forsterker(CaMV),
- b) *cryIAC* et modifisert *cryIAC*-gen som finnes i én kopi i genomet. *CryIAC*-genet stammer fra jordbakterien *Bacillus thuringiensis*.
- c) 7S3' terminatorsekvens fra soya

nptII- ekspresjonskassetten:

- d) 35s promoter fra blomkålmosaikkvirus (CaMV)
- e) *nptII* antibiotikaresistensgen, danner enzymet neomycin fosfotransferase (APH(3')II), stammer fra transposon Tn5 fra *E. coli*,
- f) *ble* trunkert bleomycinresistensgen, består av 153 basepar
- g) *NOS3* terminator for *nptII* gen, stammer fra pTiT37 plasmidet,
- h) *Ori-V* replikasjonsorigo for *Agrobacterium*, stammer fra plasmidet RK2

Ikke-funksjonelle fragmenter:

- a) *aadA* et 3''-(9)-O-aminoglycosidadenylyltransferase, aminoglycosid modifiserende enzyme,
- b) *OR-ori-V* replikasjonsorigon fra plasmid RK2
- c) *T-7S* transkripsjonsterminator fra soya 7S gen
- d) 3'-*cryIAC* trunkert 3'-del av kodende sekvens fra *cryIAC* gen



Figur 1: Funksjonelt cryIAc/nptII - rekombinant DNA fragment i bomullsplanten

Analysene viser at det er satt inn et trunkert fragment på 242 basepar som inneholder deler av 7s3' elementet og deler av cryIAc genet. De molekylærbioologiske analysene er basert på genom "walking", cosmidkloning, PCR, Southern blot og sekvensering. Faggruppen har vurdert det rekombinante innskuddet i MON 531 i søknaden MON 531 x MON 1445 (VKM 2005c). Faggruppen fant at dokumentasjonen var tilstrekkelig for en vurdering av det rekombinante innskuddet.

2.1.2 MON 15985

Transformasjonssystem og vektorkonstruksjon

MON 15985 er fremkommet ved transformasjon av den genmodifiserte linjen MON 531. Et lineært rekombinant DNA-fragment på 6092 basepar, som er kuttet med restriksjonsenzymet *KpnI*, er satt inn meristemceller fra MON 531 ved hjelp av partikkelakselerasjonsmetoden. Det rekombinante DNA-fragmentet stammer fra plasmidet PV-GHBK11. Det lineariserte fragmentet, som er satt inn i bomullsplanten MON 531, inneholder to ekspresjonskassetter. Den ene ekspresjonskassetten inneholder et cry2Ab2-gen, den andre ekspresjonskassetten inneholder et uidA-gen. Den genmodifiserte linjen MON 531 inneholder et rekombinant DNA-fragment på 7916 basepar fra PV-GHBK04-plasmidet. Dette rekombinante DNA fragmentet inneholder to ekspresjonskassetter. Den ene inneholder ett cryIAc-gen med regulatoriske områder og den andre inneholder med regulatoriske områder et neomycin fosotransferase II (*nptII*) gen og et 3''-(9)-O-aminoglycoside adenyltransferase (*aadA*) gen.

Transformanter ble selektert ved at de vokste i nærvær av p-nitrofenyl-β-D-glukuronid. Ved hydrolyse av p-nitrofenyl-β-D-glukuronid omdannes glukuronid til et blått pigment. Pigmentet virker som en visuell seleksjonsmarkør av celler som har tatt opp det rekombinante fragmentet.

Karakterisering av geninnsettingen og genkonstruksjonen

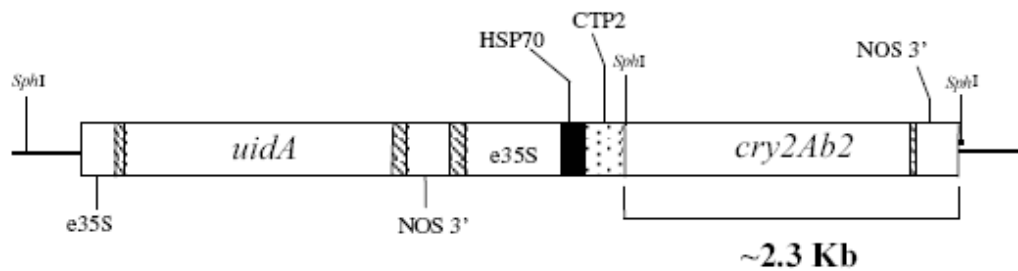
Det rekombinante fragmentet MON 15947 inneholder følgende genelementer, se figur 2:

uidA kassett:

- a) *e35* promoter fra blomkålmosaikkvirus med forsterker (CaMV),
- b) *uidA* DNA sekvens som koder for β-D-glukuronidase (GUS) enzym fra *E. coli*
- c) *NOS3* terminator for *uidA* genet, stammer fra pTiT37 plasmidet,

cry2Ab2:

- d) *e35s* promoter fra blomkålmosaikkvirus med forsterker (CaMV),
- e) *HSP70* "heat shock 70" ledersekvens fra petunia
- f) *ctp2* DNA sekvens som koder for N-terminalt kloroplast overføringspeptid, fra *Arabidopsis thaliana epsps* gen
- g) *cry2Ab2* gen, stammer fra jordbakterien *Bacillus thuringiensis*. Koder for et syntetisk Cry2Ab2 protein.
- h) *NOS3* terminator for *cry2Ab2* genet, stammer fra pTiT37 plasmidet



Figur 2: Rekombinant DNA fragment MON 15947 med funksjonelle uidA/cry2Ab2-ekspressjonskassetter

Dette innskuddet inneholder en fullstendig kopi av cry2Ab2-kassetten lenket til en kopi av uidA-kassetten. CaMV 35s promoteren i uidA-kassetten mangler ca. 260 bp i 5'enden. I uidA-genet i planten er det en aminosyre-endring i N-enden. Endringen er fra glutamin til lysin. Endringen påvirker ikke det aktive området og den tredimensjonale strukturen av proteinet. Monsanto har analysert 1894 baser oppover fra 5'-enden og 763 baser nedover fra 3'-enden av innskuddet. Analyser av disse flankerende sekvensene viser ingen homologi med gener i bomullsplanten. Monsanto har påvist at 388 baser i 5'-enden viser homologi til kloroplast DNA.

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

Monsanto viser til at konsentrasjonen av Cry1Ac, Cry2Ab2, NPTII og GUS er målt i prøver fra feltforsøk på fem lokaliteter i sentrale dyrkingsområder for bomull i USA vekstsesongen 2001. Forsøket inkluderte hybridene MON 15985 x MON 1445, begge foreldrelinjene, samt en ikke-transgen kontroll (SG125NT). Konsentrasjoner av proteinene Cry1Ac, Cry2Ab2, NPTII og GUS ble målt i frø og unge blad. Konsentrasjoner av disse proteinene er dokumentert i tabellene Table 3 og Table 4 i kapittel 2.3.

Søker har også lagt ved dokumentasjon for forsøk utført i 1998. I disse forsøkene ble nivået av uttrykk av proteinene Cry1Ac, Cry2Ab2, NPTII, GUS og AADA analysert i prøver fra feltforsøk i USA. Forsøkene ble lagt ut på åtte lokaliteter i form av blokkdesign med fire gjentak, og inkluderte testlinjen MON 15985, den umodifiserte kontrollsorten DP50, samt en transgen kontrollinje (MON 531). Det ble tatt prøver av blad og frø på alle forsøksfeltene, mens prøver av pollen og hel plante ble hentet fra to av lokalitetene. Konsentrasjonen av Cry1Ac- og Cry2Ab2 ble målt i blad, frø, hel plante og pollen, mens nivået av NPTII og GUS ble analysert i prøver fra blad og frø. Analyser vha Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) viser gjennomsnittlige konsentrasjoner av Cry1Ac i blad, frø, hel plante og pollen på henholdsvis $2,75 \pm 1,32 \mu\text{g/g}$ råvekt (0,39-4,19)¹, $3,35 \pm 0,63 \mu\text{g/g}$ råvekt (2,21-4,84), $0,17 \pm 0,08 \mu\text{g/g}$ råvekt (0,10-0,32) og $0,02 \pm 0,01 \mu\text{g/g}$ råvekt (0,01-0,02). Tilsvarende ble nivået av Cry2Ab2 målt til $23,8 \pm 6,3 \mu\text{g/g}$ råvekt (10,1-33,3), $43,2 \pm 5,7 \mu\text{g/g}$ råvekt (31,8-50,7), $8,80 \pm 1,20 \mu\text{g/g}$ råvekt (7,28-10,46) i henholdsvis blad, frø og hel plante. Nivået av Cry2Ab2 i pollen var under deteksjonsgrensen (LOQ² <0,25). Konsentrasjonen av NPTII i blad og frø ble målt til henholdsvis $16,6 \pm 5,2 \mu\text{g/g}$ råvekt (7,53-33,7) og $10,8 \pm 1,2 \mu\text{g/g}$ råvekt (8,88-13,2), mens tilsvarende tall for GUS er $106 \pm 32 \mu\text{g/g}$ råvekt (51,7-176) og $58,8 \pm 13,0 \mu\text{g/g}$ råvekt (37,2-82,3). Nivåene av Cry1Ac og NPTII i MON 15985 er i overensstemmelse med nivået i MON 531. Det ble ikke påvist AADA-protein verken i testlinjen eller kontrollen MON 531.

¹ Variasjonsområde

² LOQ = limit of quantitation

³ LOD = limit of detection

Det er gjort en studie for å påvise åpne leserammer ved *uidA/cry2Ab2*-innskuddet. Det er listet opp 12 antatte åpne leserammer, 6 åpne leserammer hver fra henholdsvis 5' og 3' enden av det rekombinante innskuddet. Fra 5' enden er det påvist fem åpne leserammer, 5_1, 5_3, 5_4, 5_5 og 5_6, som teoretisk fører til avskrivning av tilstrekkelig lange polypeptider fra stopkodon til stopkodon. Fra 3' er det påvist 6 åpne leserammer, 3_1, 3_2, 3_3, 3_4, 3_5, 3_6, som teoretisk fører til tilstrekkelige lange polypeptider (80 aminosyrer) fra stopkodon til stopkodon. Homologi til de hypotetiske uttrykte aminosyresekvensene som kan stamme fra disse åpne leserammene ble sammenlignet med aminosyresekvenser i basene Allpeptides, Toxin5 og Allergen3. I søkene etter homologi ble det bruket et vindu på 6, 7 og 8 aminosyrer. FAO/WHO anbefaler et vindu på 6 aminosyrer. Søkene med vindu på 6 og 7 aminosyrer ga et svært stort antall falske positive treff, og Monsanto besluttet derfor å benytte et vindu på 8 aminosyrer. Det ble påvist 31 antatt homologier til forskjellige proteiner. Ingen av disse polypeptidene har mer enn 35 % homologi med et vindu på 80 aminosyrer, som anbefalt av FAO/WHO.

Nedarving og stabilitet av innsatt DNA

I henhold til dokumentasjon fra Monsanto er genetisk stabilitet undersøkt ved analyse av genomisk DNA fra generasjonene R₁, R₂, R₃ og R₄, i tillegg til to generasjonslinjer med tilbakekryssing (BC₂F₂). Resultatene av Southern blot-analysene viser at de rekombinante DNA-innskuddene er stabilt integrert i genomet, og nedarves stabilt over generasjoner.

Fenotypisk stabilitet er vist ved spaltingsdata fra kryssinger over flere generasjoner. Segregasjonsanalysene (chi-kvadrat-test) viser forventet spaltningstall på 3:1 for Cry2Ab2-protein. Dette viser at det rekombinante DNA-fragmentet følger mønsteret for mendelsk nedarving av et enkelt, dominant locus.

Delkonklusjon

Molekylærbiologiske analyser viser at de rekombinante fragmentene i planten inneholder de samme gener og genelementer som er på de tilsvarende fragmentene i de to bakteriestammene. Genene på de rekombinante DNA-fragmentene i MON 15985 uttrykker Cry1Ac-, Cry2Ab2-, GUS- og NPTII-protein, som er identisk med proteinene som uttrykkes i de bakteriestammene som inneholder disse genelementer. *AadA*-genet uttrykkes ikke i bomullslinjen MON 15985. Faggruppen konkluderer med at de fysiske, kjemiske og funksjonelle karakteriseringene av de rekombinante DNA-innskuddene i bomullslinjen MON 15985 er tilfredsstillende.

2.2. Evaluering av foreldrelinje MON 1445

Transformasjonssystem og vektorkonstruksjon

Den genmodifiserte bomullslinjen MON 1445 uttrykker glyfosattoleranse pga. bakterieenzymet 5-enolpyruvylsikumat-3-fosfatsyntetase (CP4 EPSPS), som uttrykkes av *cp4-epsps*-genet. Enzymet omdanner fosfoenolpyruvat og sikimat-3-fosfat til 5-enolpyruvylsikumat-3-fosfat, som er en viktig metabolitt i syntesen av aromatiske aminosyrer. Alle planter og mikroorganismer inneholder dette enzymet, noe som dyr ikke gjør. De må dermed få aromatiske aminosyrer fra føden. *Cp4-epsps*-genet fra jordbakterien *Agrobacterium tumefaciens*, stamme CP4 ble klonet inn i plasmidet PV-GHGT07. Det rekombinante DNA-fragmentet på 5734 basepar fra PV-GHGT07-plasmidet inneholder to ekspresjonskassetter med henholdsvis ett *cp4-epsps*-gen og ett *nptII*-gen i hver kassett.

Den molekylærbiologiske karakteriseringen viser at det er satt inn ett rekombinant DNA-fragment i MON 1445. Dette fragmentet inneholder følgende ekspresjonskassetter:

Cp4 epsps-ekspresjonskassett:

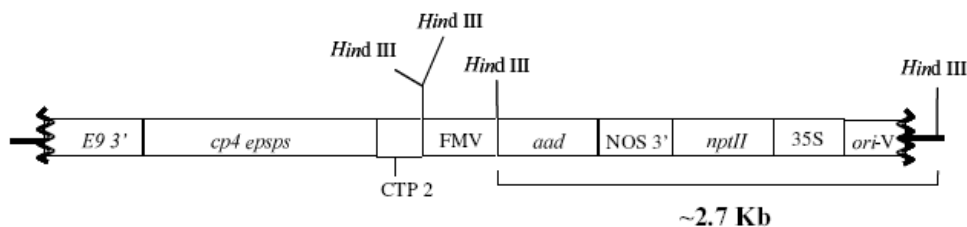
- a) *FMV* promoter, 35S promoter fra "figwort" mosaikkvirus,
- b) *cp4 epsps* gen fra *Agrobacterium tumefaciens* stamme CP4 (1,4 kb)gen
- c) *cpt2* DNA sekvens som koder for et optimalisert kloroplastoverføringspeptid

- d) *e9 3'* terminator sekvens fra erter

Bakteriegenet *aadA*, som koder for aminoglykosidmodifiserende enzym 3'(9)-O-nukleotidtransferase, som gir resistens mot streptomycin og spectomycin. Genet stammer fra transposon T7, reguleres av en bakteriell promotor og uttrykkes ikke i planten. Genet inducerer polyadenylering.

nptII-ekspresjonskasset:

- a) *35s* promoter fra blomkålmosaikkvirus (CaMV)
- b) *nptII* antibiotikaresistensgen, danner enzymet neomycin fosfotransferase (APH(3')II), stammer fra transposon Tn5 fra *E. coli*,
- c) *bl* trukert bleomycinresistensgen, består av 153 basepar
- d) *NOS3* terminator for *nptII* genet, stammer fra pTiT37 plasmidet,
- e) *Ori-V* replikasjonsorigo for *Agrobacterium*, stammer fra plasmidet RK2



Figur 3: Rekombinant DNA fragment MON 1445 med funksjonelle *cp4 epsps/nptII*-ekspresjonskassetter

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

For uttrykk av rekombinante proteiner i MON 1445 over flere år henvises det til fornyet søknad fra 2008 om markedsføring av mat/matingredienser og fôr produsert fra bomullen (EFSA-GMO-RX-MON 1445). I søknaden MON 15985 x MON 1445 forligger det også dokumentasjon for MON 1445 fra feltforsøk i 2001 (se kap. 2.1.2). Konsentrasjonen av CP4 EPSPS- og NPTII- protein i unge blad og frø er vist i tabellene Table 3 og Table 4 i kapittel 2.3.

I følge dokumentasjon fra søker ble det gjort en studie for å påvise åpne leserammer ved *cp4 epsps/nptII*-innskuddet. Det er listet opp 10 antatte åpne leserammer, 5 åpne leserammer hver fra henholdsvis 5' og 3' enden av det rekombinante innskuddet. Fra 5' enden er det påvist fem åpne leserammer, 5_1, 5_3, 5_4, og 5_6, som teoretisk fører til avskrivning av tilstrekkelig lange polypeptider fra stoppkodon til stoppkodon. Fra 3' er det påvist 5 åpne leserammer, 3_1, 3_2, 3_3, 3_4, 3_5, som teoretisk fører tilstrekkelige lange polypeptider (80 aminosyrer) fra stoppkodon til stoppkodon. Homologi til de hypotetiske uttrykte aminosyresekvensene som kan stamme fra disse åpne leserammene ble sammenlignet med aminosyresekvenser i basene Allpeptides, Toxin5 og Allergenbase AD4. I søkene etter homologi ble det bruket et vindu på 6, 7 og 8 aminosyrer. FAO/WHO anbefaler et vindu på 6 aminosyrer. Søkene med vindu på 6 og 7 aminosyrer ga et svært stort antall falske positive treff. Monsanto besluttet derfor å benytte et vindu på 8 aminosyrer. Det ble påvist 29 antatt homologier til forskjellige proteiner. Ingen av disse polypeptidene har mer enn 35 % homologi med et vindu på 80 aminosyrer, som anbefalt av FAO/WHO.

Nedarving og stabilitet av innsatt DNA

I henhold til dokumentasjonen fra Monsanto er genetisk stabilitet undersøkt ved analyse av genomisk DNA fra generasjonene R₃, R₄ og R₅. Resultatene av Southern blot-analysene viser at de rekombinante DNA-innskuddene er stabilt integrert i genomet, og nedarves stabilt over generasjoner.

Fenotypisk stabilitet er vist ved spaltingsdata fra kryssinger over flere generasjoner. I følge søknad EFSA/GMO/UK/2005/09 viser chi-kvadrat-tester forventet spaltningstall, og bekrefter at det rekombinante DNA-fragmentet følger mønsteret for mendelsk nedarving av et enkelt, dominant locus. Stabiliteten på det rekombinante DNA fragmentet er vist over mer enn 8 generasjoner.

Delkonklusjon

Molekylærbiologiske analyser viser at ett rekombinant fragment er satt inn i planten. Dette fragmentet inneholder de samme gener og genelementer som er på det tilsvarende fragmentet i bakterien. Genene på det rekombinante DNA-fragmentet i MON 1445 uttrykker CP4 EPSPS - og NPTII protein som er identisk med proteinene som uttrykkes i bakterien. Faggruppen finner at karakteriseringen av det rekombinante innskuddet i MON 1445 er tilfredsstillende.

2.3. Hybriden MON 15985 x MON 1445

MON 15985 x MON 1445 er dannet ved konvensjonell kryssing mellom foreldrelinjene MON 1445 og MON 15985.

Molekylær karakterisering

Analyse av planter fra 8. generasjon viser at de rekombinante fragmentene er stabilt integrert. Det er foretatt Southern blot-analyse for å undersøke tilstedeværelsen og antall kopier av MON 1445- og MON 15985-ekspresjonskassetten i hybridene MON 15985 x MON 1445. Det ble påvist tilsvarende rekombinante ekspresjonskassetter som i foreldrelinjene.

Monsanto hevder at ytterligere molekylærbiologiske analyser ikke er nødvendig fordi det er liten sannsynlighet for molekylær gjensidig påvirkning mellom innskuddene fra MON 1445 og MON 15985, samt at ekspresjonskassetten har vært stabilt inkorporert i MON 15985 x MON 1445 i 8 generasjoner.

Det konkluderes med at det er kun ekspresjonskassetten fra henholdsvis MON 15985 og MON 1445 som er satt inn i hybridene. Sammenlignende Southern blot-analyser mellom MON 15985 x MON 1445 og de to foreldrelinjene viser at bruttostørrelsen på de innsatte DNA-fragmentene er intakte. Det kan derfor ikke forventes endringer i ekspresjonen fra disse elementene.

Informasjon vedr. uttrykk av introduserte gener

Monsanto viser til at konsentrasjonen av proteinene Cry1Ac, Cry2Ab2, NPTII, CP4 EPSPS og GUS er målt i prøver fra feltforsøk på fem lokaliteter i sentrale dyrkingsområder for bomull i USA vekstsesongen 2001. Forsøket inkluderte hybridene MON 15985 x MON 1445, begge foreldrelinjene, samt en ikke-transgen kontroll (SG125NT). Konsentrasjonen av de ulike proteinene i unge blad og frø i gjennomsnitt over forsøksfelt er vist i tabeller merket Table 3 og 4. Nivåene av de ulike proteinene som uttrykkes i hybridene er i overensstemmelse med nivået i de respektive foreldrelinjene, med unntak av CP4 EPSPS i frø, hvor konsentrasjonen er ca 50 % høyere enn i foreldrelinjen MON 1445.

I søknad EFSA/GMO/UK/2008/57 for bomullslinjen MON 15985 har Monsanto lagt ved dokumentasjon som viser nivået av uttrykk av proteinene Cry1Ac, Cry2Ab2, NPTII, GUS og AADA analysert i prøver fra feltforsøk i USA i 1998. Siden det ikke ble påvist AADA-protein i disse undersøkelsene, konkluderer Monsanto med at det ikke er grunn til å måle dette proteinet i forsøkene utført i 2001.

Table 3. Summary of Cry1Ac, NPTII, Cry2Ab2, GUS E377K and CP4 EPSPS protein levels ($\mu\text{g/g fw}$)¹ measured in cottonseed samples collected in the 2001 field season
Mean \pm Std Dev. (n = 5)² - (Range)³.

	Cry1Ac	NPTII ⁴	Cry2Ab2	GUS E377K	CP4 EPSPS
Traditional control	N.D. ⁵	N.D. ⁵	N.D. ⁵	N.D. ⁵	N.D. ⁵
MON 15985	1.6 \pm 0.23 (1.3-1.9)	5.5 \pm 0.59 (4.8-6.2)	44 \pm 10 (34-60)	46 \pm 13 (27-59)	N.D. ⁵
MON 1445	N.D. ⁵	16 \pm 2.0 (13-17)	N.D. ⁵	N.D. ⁵	110 \pm 6.8 (100-120)
MON 15985 \times MON 1445	1.5 \pm 0.095 (1.3-1.6)	17 \pm 2.6 (14-20)	45 \pm 5.7 (39-53)	45 \pm 16 (29-67)	160 \pm 28 (130-200)

¹ Protein levels are expressed as $\mu\text{g/g fw}$ of tissue. NPTII, Cry2Ab2, GUS E377K and CP4 EPSPS protein levels were corrected for assay bias. Cry1Ac protein levels were corrected for trypsinization using the trypsinization factor.

² The mean and SD were calculated across sites from the analyses of plant samples from four plots (i.e. replicates) at each of five field sites.

³ Minimum and maximum values from the analyses of samples across sites.

⁴ The LOQ for the NPTII ELISA in seed tissue is 4.1 $\mu\text{g/g fw}$.

⁵ Not detectable. The LODs for the Cry1Ac, NPTII, Cry2Ab2, GUS E377K and CP4 EPSPS ELISAs in seed tissue are 0.10, 1.3, 3.4, 6.5 and 6.8 $\mu\text{g/g fw}$, respectively.

Table 4. Summary of Cry1Ac, NPTII, Cry2Ab2, GUS E377K and CP4 EPSPS protein levels ($\mu\text{g/g fw}$)¹ measured in cotton leaf samples collected in the 2001 field season
Mean \pm Std Dev. (n = 5)² - (Range)³.

	Cry1Ac ⁵	NPTII ⁸	Cry2Ab2 ⁶	GUS E377K	CP4 EPSPS ⁷
Traditional control	N.D. ⁴	N.D. ⁴	N.D. ⁴	N.D. ⁴	N.D. ⁴
MON 15985	2.1 \pm 1.4 (<LOQ-4.2)	5.9 \pm 1.5 (<LOD-6.9)	5.7 \pm 4.4 (1.6-13)	61 \pm 33 (13-110)	N.D. ⁴
MON 1445	N.D. ⁴	23 \pm 7.1 (19-36)	N.D. ⁴	N.D. ⁴	52 \pm 15 (35-73)
MON 15985 \times MON 1445	1.6 \pm 1.3 (0.43-3.8)	24 \pm 6.6 (17-35)	5.4 \pm 2.5 (2.6-9.6)	65 \pm 16 (51-91)	53 \pm 20 (37-88)

¹ Protein levels are expressed as microgram (μg) of protein per gram (g) fresh weight (fw). NPTII, Cry2Ab2, GUS E377K and CP4 EPSPS protein levels were corrected for assay bias. Cry1Ac protein was corrected for the trypsinization using the trypsinization factor.

² The mean and standard deviation (SD) were calculated across sites from the analyses of four replicate samples, i.e. four plots at each of the five field sites.

³ Minimum and maximum values from the analyses of samples across sites.

⁴ Not detectable. The LODs for the Cry1Ac, NPTII, Cry2Ab2, GUS E377K and CP4 EPSPS ELISAs in leaf tissue are 0.36, 1.4, 1.0, 6.2 and 0.80 $\mu\text{g/g fw}$, respectively.

⁵ The Cry1Ac results of MON 15985 are based on four sites because the other site was < LOQ. The MON 15985 \times MON 1445 from one site is based on one replicate because the others were < LOQ. The LOQ of Cry1Ac ELISA in leaf is 0.36 $\mu\text{g/g fw}$.

⁶ The mean and SD of MON 15985 from one site was based on two replicates because the others were < LOD.

⁷ The values from the traditional cotton from two sites are based on three replicates because the other replicate was < LOQ. The LOQ of CP4 EPSPS ELISA in leaf is 2.5 $\mu\text{g/g fw}$.

⁸ The NPTII result of MON 15985 was based on two sites because the values from other sites were < LOD or < LOQ. The LOQ of NPTII ELISA in leaf is 4.1 $\mu\text{g/g fw}$.

Nedarving og stabilitet av innsatt DNA

I henhold til Monsanto har Southern blot-analyse vist at de rekombinante DNA innskuddene er stabilt integrert i genomet etter 8 generasjoner (BC₂F₆). Analysene indikerer at de innsatte strukturene nedarves stabilt, og at antall, struktur og organisering av disse genkonstruksjonene er ekvivalent med de som finnes i foreldrelinjene.

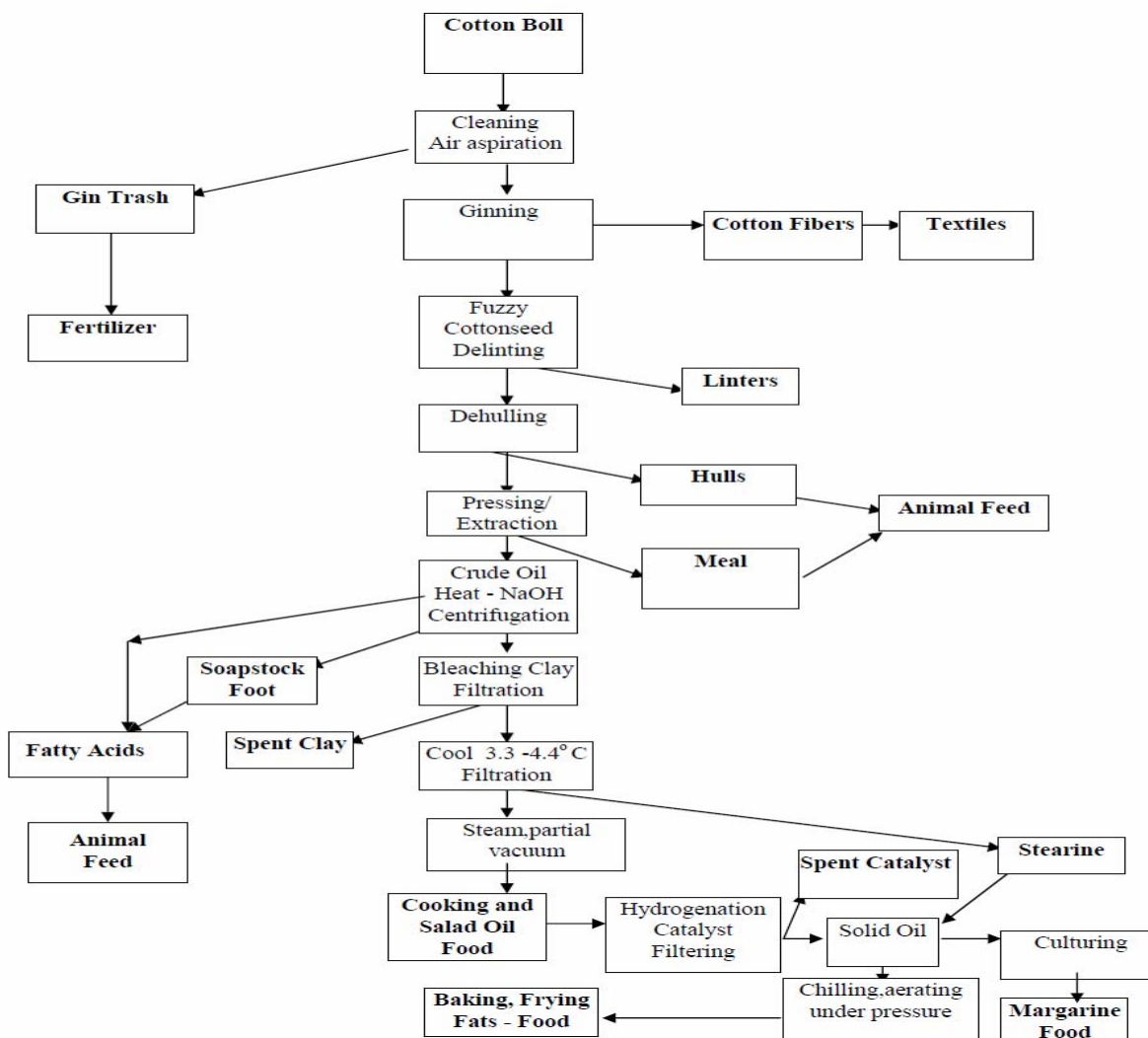
Delkonklusjon

Hybriden MON 15985 \times MON 1445 er dannet ved konvensjonell kryssing mellom bomullslinjene MON 15985 og MON 1445. Spaltingsdata 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 Cry1Ac-, Cry2Ab2-, CP4 EPSPS-, NPTII og GUS-proteiner i vegetativt vev og frø er sammenlignbare med uttrykk av tilsvarende proteinprodukter i foreldrelinjene, med unntak av CP4 EPSPS i frø, hvor konsentrasjonen er ca 50 % høyere enn foreldrelinje MON 1445. Antibiotikaresistensgenet *aadA* uttrykkes ikke i hybrid MON 15985 \times

MON 1445. Faggruppen finner at karakteriseringen av det rekombinante innskuddet i MON 15985 er tilfredsstillende.

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 4).



Figur 4. 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 Monsanto er det er foretatt analyser av ernæringsmessige viktige komponenter og registreringer agronomiske karakterer i en serie feltforsøk i sentrale dyrkingsområder for bomull i USA.

Prøver for analyser ernæringsmessige komponenter av MON 15985 og MON 15985 x MON 1445 ble hentet fra feltforsøk i Alabama, Arizona, Louisiana, Mississippi, Sør-Carolina og Texas i 1998 og

1999, på henholdsvis åtte og seks lokaliteter. Dyrkningsområdene representerer ulike vekstmiljø for bomull i USA. Hvert forsøksfelt bestod av et fullstendig randomisert blokkdesign med tre gjentak. I tillegg til kontrollinjen DP50 ble henholdsvis åtte og fire umodifiserte, kommersielle bomullssorter benyttet som referansemateriale i hvert av forsøkene.

I tillegg har søker lagt ved analyser av ernæringsmessige viktige komponenter av prøver fra MON 15985, MON 1445, MON 15985 x MON 1445 og 11 umodifiserte, kommersielle bomullssorter dyrket i felt i USA i 2001. Forsøksfeltene ble lagt ut på fem lokaliteter i statene Alabama, Arkansas, Arizona, Louisiana og Mississippi.

Registreringer av agronomiske karakter ble foretatt i feltforsøk på fire ulike lokaliteter i statene i Texas, Arizona, Arkansas og Nord-Carolina i 2002. Forsøkene inkluderte testlinjen MON 15985 x MON 1445, de transgene kontrollinjene MON 531, MON 15985 og MON 1445, samt fire umodifiserte, kommersielle referansesorter. Feltforsøkene ble lagt ut som randomiserte blokkdesign med fire gjentak. Forsøksruter med hybrid MON 15985 x MON 1445 og foreldrelinjen MON 1445 ble behandlet med glyfosat fire ganger i løpet av vekstsesongen.

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 enkeltparametere 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 bomullsfrø

Analysene av ernæringsmessige komponenter er foretatt før OECDs konsensusdokument for bomull ble laget (OECD 2004). Monsanto hevder at valget av analyseparametere er i henhold til aksepterte internasjonale standarder og OECD konsensus-dokumentet. Faggruppen finner at valget av analyseparametere er i henhold til konsensusdokumentet for bomull. Det er foretatt forskjellige analyser av hovedkomponenter i frø, olje og bomullsmel. Vitamin E er målt i olje, men ikke i frø og mel. Flere komponenter ble ikke målt i olje og mel fordi disse er målt i frø. For frø ble det analysert for 51 ulike komponenter. Det ble foretatt 306 statistiske sammenligninger mellom MON 15985 x MON 1445 og tradisjonell kontroll. Det ble påvist 59 signifikante forskjeller ($p < 0,05$), der verdiene for 58 ble konstatert å ligge innenfor 99 % toleranseintervall for de umodifiserte, kommersielle bomullssortene. Den ene forskjellen som ble påvist var for natrium, og kun innenfor en lokalitet. Det ble analysert for innhold av aske, fett, protein, vann, karbohydrater, total fiber, ADF (acid detergent fiber), NDF (neutral detergent fiber), total kostfiber (total dietary fiber), kalorier, aminosyrer, fettsyrer (C8-C22), cyklopropenoid-fettsyrer (malvalin, sterkulin, og dihydrosterkulin syre), fosfat, jern, kalium, kalsium, kobber, magnesium, mangan, natrium, sink, anti-næringsstoffet gossypol (fritt og totalt). Aflatoksinene B₁, B₂, G₁, G₂, heptadekansyre (17:0) og lignosyre (24:0) var lavere enn påvisningsgrensene, og ble derfor ekskludert fra de statistiske analysene. Analysene ble utført under god laboratoriepraksis (GLP).

Fettsyresammensetning i bomullsfrø

Fettsyresammensetningen i frø ble analysert i henhold til OECDs konsensusdokument for bomull. Det ble analysert for innhold av 13 fettsyrer, inkludert cyklopropenoid-fettsyrer. Analyser over lokaliteter fra 2001 viser signifikante forskjeller for parametrene myristin (14:0) (ca 19 %, høyere enn kontroll), stearin (ca. 9 %, høyere enn kontroll), og palmitin (ca 6 %, høyere enn kontroll). For de andre fettsyrene ble det ikke funnet signifikante forskjeller. Verdiene for alle fettsyrene ligger innenfor typiske verdier for andre bomullssorter som er rapportert i litteraturen.

Aminosyrer i bomullsfrø

Både essensielle og ikke-essensielle aminosyrer ble analysert. De aminosyrer som er målt er i henhold til OECD dokumentet. Statistiske analyser over lokaliteter viser ingen signifikante forskjeller mellom testlinje og kontroll. Verdien for alle aminosyrene ligger innenfor ± 20 %, og innenfor typiske verdier som er rapportert i litteraturen.

Vitaminer

I henhold til OECDs konsensusdokument for bomull bør innholdet av vitamin E i oljefraksjonen måles. Det ble ikke foretatt analyser av vitamin E i frø, men søker har lagt ved dokumentasjon for analyse av vitamin E i olje fra foreldrelinjen MON 15985. Innholdet av vitamin E i MON 15985 er ca. 12 % høyere sammenlignet med kontrollen DP50.

Mineraler

Med unntak for selen er mineralene som er målt i henhold til OECDs konsensusdokument for bomull. Det ble funnet statistisk signifikante forskjeller for innhold av fosfat (< 4 % lavere enn kontroll), kobber (< 9 % lavere enn kontroll), kalsium (< 10 % høyere enn kontroll) og jern (< 14 % lavere enn kontroll) over alle feltforsøkene i 2001. Forskjellen ligger innenfor typiske verdier for andre bomullssorter som er rapportert i litteraturen.

Antinæringsstoffer

Det ble påvist signifikante forskjeller mellom testhybrid og kontroll for innhold av fritt og total gossypol i frø. I følge dokumentasjonen fra søker var nivåene henholdsvis ca 10 % og ca. 7 % høyere i MON 15985 x MON1445 sammenlignet med kontroll. Gossypol kunne ikke påvises i prosessert olje. Gjennomsnittlig mengde total gossypol i frø fra MON 15985 x MON 1445 og tradisjonell kontroll ble målt til henholdsvis $0,97 \pm 0,033$ % tørrvekt (0,87-1,19)¹ og $0,92 \pm 0,032$ % tørrvekt (0,66-1,06). For fritt gossypol er mengdene henholdsvis $0,81 \pm 0,025$ (0,71-0,98) og $0,74 \pm 0,025$ % tørrvekt (0,62 – 01,19). I henhold til OECDs konsensusdokument for bomull er det historiske variasjonsområdet i frø for totalt gossypol 0,51 – 1,43 % tørrevekt og fritt gossypol 0,47 – 0,70. Monsanto oppgir i Technical dossier verdiene til henholdsvis 0,8 – 1,09 og 0,73 – 1,03 % tørrvekt for funn i litteratur, og historisk variasjonsområdet til henholdsvis 0,67 – 1,46 og 0,55 – 1,07 % tørrvekt.

I USA er høyeste tillatte mengde bomullsfrø i fôr til kyr og avvendte kalver henholdsvis 0,5 % og 0,33 % av kroppsvekten (Myer & McDowell 2003). Den norske forvareforskriften med vedlegg setter klare grenser for innhold av fritt gossypol til ulike arter. Grensen er generelt 20 mg/kg fôrvare (12 % vanninnhold), unntatt er bomullsfrø, bomullsfrøkakker og – mel der høyeste tillatte innhold er henholdsvis 5000 mg/kg, 1200 mg/kg og 1200 mg/kg fôrvare. I fullfôr er grensen for storfe, sau og geit 500 mg/kg, for kalv og fjørfe 100 mg/kg og for kanin og svin 60 mg/kg. Dersom mengden i bomullsfrøene er økt uten at det opplyses om det ser faggruppen at det er et problem. Dersom det opplyses om innholdet burde det imidlertid ikke være et problem. Faggruppen mener at økt innhold av gossypol er en uønsket egenskap ved planten og gjør varen mindre egnet som ingrediens i kraftfôr. Bomullsfrø er lite i bruk til kraftfôr i Norge, men har de siste årene hatt et økende bruk blant annet i USA.

Faggruppen konkluderer med at så lenge innholdet av gossypol er oppgitt og at mengden i kraftfôr er i henhold til fôrvareforskriften, skulle det ikke medføre noen helsefare for dyr som spiser slikt kraftfôr.

Toksiner

Det ble ikke påvist innhold av aflatoksinene B₁, B₂, G₁ og G₂ over påvisningsgrensen på 1 ppb.

Analyse av protein og DNA i raffinert bomullsolje

Studier utført på soya og raps viser at avhengig av metoden for fremstilling av olje, vil dette påvirke hvor mye DNA, korte fragmenter og multikopigener som kan finnes igjen i oljen (Hellebrand *et al.* 1998; Pauli *et al.* 1998, Gryson *et al.* 2002). Monsanto henviser til tidligere analyser av raffinert

bomullsolje for protein og DNA. Analysene viser at protein og DNA ikke kan påvises over deteksjonsgrensene.

3.3. Agronomiske egenskaper

I dokumentasjonen fra Monsanto er det presentert data fra registreringer av følgende agronomiske karakterer; spiretidspunkt, plantetetthet, høyde/nodium-forhold, blomstring, modning/tidlighet, høstedata, avling, samt insekt- og sjukdomsresistens. Dokumentasjonen fra søker viser kun registreringer fra enkeltplot, samt gjennomsnittsverdier for de observerte karakterene. Søknaden inneholder ingen resultater av statistiske analyser av datamaterialet. Monsanto konkluderer imidlertid med at MON 15985 x MON 1445 ikke er forskjellig fra umodifiserte bomullssorter med hensyn på egenskaper knyttet til reproduksjon, morfologi, vekst, utvikling, samt sjukdoms- og insektresistens. På bakgrunn av tilgjengelig dokumentasjon er det vanskelig å konkluderes mhp agronomisk ekvivalens mellom testlinjen og kontroll- og referansesorter.

3.4. Delkonklusjon

Det er funnet statistiske forskjeller i enkeltparametere. Forskjellene som er funnet er for de fleste komponenter innenfor $\pm 10\%$. Verdiene for de enkelte analyserte komponentene ligger også innenfor verdiene for de umodifiserte kommersielle referansesortene som inngår i studien, og også innenfor typiske verdier for andre bomullssorter som er rapportert i litteraturen.

Nivået av antinæringsstoffet gossypol er signifikant høyere i MON 15985 x MON 1445 sammenlignet med kontrollinjen. Faggruppen påpeker at økt innhold av gossypol er en uønsket egenskap ved planten, men konkluderer med at så lenge innholdet av antinæringsstoffet er oppgitt og at mengden i kraftfôr er i henhold til fôrvareforskriften, skulle dette ikke medføre noen helsefare for dyr.

Resultatene fra undersøkelsene som presenteres av agronomiske karakterer er ufullstendige, og det er derfor vanskelig å konkludere mhp agronomisk ekvivalens.

4. Dokumentasjon av toksisitet og allergisitet

4.1. Toksisitet

Akutt oral toksisitets studie med Cry1Ac-, Cry2Ab2-, GUS-, CP4 EPSPS og NPTII-proteiner

Monsanto har utført akutt-toksisk studie på mus med renfremstilt protein av Cry1Ac, Cry2Ab2, GUS, CP4 EPSPS og NPTII.

Forsøket med Cry1Ac er utført i henhold til god laboratoriepraksis (GLP) (Japans MAFF-retningslinjer, OECD, EU-direktiv, EPA-FIFRA). Studien er utført med fem grupper á 10 hann- og hunnmus i hver gruppe. Musene ble eksponert for henholdsvis 0, 500, 1000 og 4200 mg Cry1Ac-protein/ kg kroppsvekt og 6340 mg bovin serum albumin (BSA)/kg kroppsvekt (negativ kontroll). Alle dyrene ble daglig observert for kliniske tegn på forgiftning over en periode på 15 dager. Ved avslutning av forsøket ble alle dyrene avlivet, og bukhole, toraks, samt en rekke organer og vev ble undersøkt makroskopisk. Det ble ikke påvist økt mortalitet eller toksiske effekter på dyrene som ble eksponert for Cry1Ac og BSA.

Forsøket med Cry2Ab2 er utført i henhold til EPA (40 CFR Part 160) og FDA (21 CFR, Part 58) Good Laboratory Practice (GLP). Tre grupper á 10 hunn- og hannmus i hver gruppe ble eksponert for henholdsvis 30, 300 og 1000 mg Cry2Ab2-protein/kg kroppsvekt. Vann og albumin (1000 mg/kg kroppsvekt) ble brukt som kontroll, kontrollgruppene bestod av 10 hunn- og 10 hannmus. Alle dyrene ble daglig observert for kliniske tegn på forgiftning over en periode på 15 dager. Ved avslutning av

forsøket ble alle dyrene avlivet, og bukhole, toraks, samt en rekke organer og vev ble undersøkt makroskopisk. Det ble ikke påvist statistisk signifikant økt mortalitet eller toksiske effekter på dyrene som ble eksponert for Cry2Ab2-protein.

Når det gjelder toksistetudier av NPTII-protein (Naylor 1992) henviser Monsanto til dokumentasjon i søknad fra 1997 om markedsføring av IPC 531 (MON 531) under artikkel 2(b) i EUs "Novel foods" forordning.

Forsøk på mus med GUS-protein ble utført i 1992 og er dokumentert i Monsanto's dokument MSL-12485. GUS-protein ble gitt som en enkel dose på henholdsvis 1, 10 og 100 mg/kg kroppsvekt. Som kontroll ble det benyttet 100 mg BSA/kg kroppsvekt samt 33,3 ml 50 mM Na-karbonatbuffer/kg kroppsvekt. Det ble benyttet 10 hann- og hunnmus per gruppe. Det ble ikke påvist testrelaterte endringer hos dyrene.

For toksisitetstudie av CP4 EPSPS henviser Monsanto til dokumentasjon i søknaden om markedsføring av bomull MON 1445. Det er utført en studie på mus med CP4-EPSPS protein fremstilt fra genmodifisert *E. coli*. Renheten av proteinet er >90 %. Føring med 363 mg BSA/kg (kontroll) og 40, 100 og 400 mg CP4-EPSPS-protein/kg kroppsvekt på mus (totalt 50 hann og 50 hunn) viste ingen tegn på toksisk påvirkning, ved grov patologiundersøkelse, etter 8-9 dager. Føringforsøket er utført i henhold til EPAs retningslinjer (40 CFR Part 160). Følgende vev/organer er undersøkt: aorta, binyrer, eggstokker, hjerne, kolon, galleblære, hjerte, nyrer, lunge, lever, livmor, lymfeknuter, mage, milt, muskler, pankreas, prostata, rektum, ryggmarg, spyttkjertel, sædblære, spiserør, testikler, tymus, urinblære og øye. Hule organer ble åpnet og undersøkt. Faggruppen finner denne studien tilfredsstillende. Faggruppen har også vurdert en rekke tilsvarende studier utført med CP4-EPSPS-protein fra andre søknader. Generelt, med unntak for allergene proteiner, er de fleste proteiner ikke akuttoksiske.

*Føringforsøk på malle (*Ictalurus punctatus*)*

Monsanto henviser til et 56 dagers føringforsøk med malle, 30 akvarier à 20 fisk. Føret bestod av 20 % røstet bomullsfrømel fra MON 15985, MON 15813 (inneholder Cry2Ab2), umodifisert kontrollsort DP50 og DP50B, samt to kommersielle bomullssorter. Det ble benyttet 100 fisk per testgruppe. De utførte undersøkelser av fiskefilet er protein, fett, vann og aske. Det ble ikke påvist noen vesentlige endringer i de undersøkte parametrene. Det ble ikke funnet forskjeller i overlevelse av fiskene. Monsanto konkluderer med at næringsverdien til mel fra genmodifisert MON 15985 er lik mel fra umodifisert bomull. Føringforsøket ble utført i henhold til United States EPA FIFRA Good Laboratory Practice Regulations (40 CFR Part 160), med unntak av ufullstendig dokumentasjon av bomullsmel MON 15985 før 1. doseringsdag. Karakteriseringen ble utført på forsøkets 2. dag. Det ble heller ikke utført stabilitets- og homogenitetstester på malleføret.

Subkronisk føringforsøk på rotter

Monsanto henviser til at det er utført et 13 ukers føringforsøk med før fra bomull MON 15985. Føringforsøket inkluderte 6 ukers gamle hann- og hunnrotter, 10 grupper à 20 rotter/kjønn. Standard rottefør tilsatt 2 % og 5 % bomullsmel fra henholdsvis bomull DP50BX (event 15985) og umodifisert kontrollsort DP50 ble gitt til 4 av gruppene, mens standard rottefør tilsatt 5 % mel fra seks kommersielle umodifiserte referansesorter ble gitt til de 6 andre gruppene. Det ble utført makroskopiske og mikroskopiske undersøkelser av organene, samt klinisk patologiundersøkelser av urin og blod fra alle dyrene i hver gruppe. Det ble ikke påvist signifikante endringer i de undersøkte parametrene. Søker konkluderer med at det ikke er påvist test-relaterte endringer i overlevelse, kliniske tegn, kroppsvekt, forinntak, klinisk patologi, organ vekt, samt makroskopisk- og mikroskopisk patologi.

Føringforsøket 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).

Monsanto har også lagt ved tabell over NOEL (no observed effect level)- nivåer for Cry-proteiner som en finner i mikrobiologiske insektmidler (se tabell merket Table 15).

Table 15. No Observed Effect Levels for microbial *Bacillus thuringiensis* preparations containing the Cry1Ac and Cry2A proteins

Test Substance ¹	Animal model	NOEL ²	Reference
<i>Acute oral toxicity studies</i>			
CryMax®	Rat	> 2.5-2.8 × 10 ⁸ CFU/rat	(Carter and Ligett, 1994)
CryMax	Rat	> 5050 mg/kg	(US EPA, 1996)
DiPel®	Rat	> 2670 mg/kg	(US EPA, 1996)
DiPel	Rat	> 3.4 × 10 ¹¹ spores/kg	(US EPA, 1996)
DiPel	Rat	> 4.7 × 10 ¹¹ CFU/kg	(US EPA, 1986)
DiPel	Rat	> 5000 mg/kg	(US EPA, 1986)
DiPel	Rabbit	> 2 × 10 ⁹ spores/animal	(US EPA, 1986)
DiPel	Rabbit	> 6.9 × 10 ⁷ spores/kg	(US EPA, 1986)
<i>Subchronic oral toxicity studies</i>			
DiPel	Rat	> 8400 mg/kg/day/90 days	(McClintock <i>et al.</i> , 1995)
DiPel	Sheep	10 ¹² spores/day/153 days	(Hadley <i>et al.</i> , 1987)
DiPel	Rat	1.3 × 10 ⁹ spores/kg/day	(McClintock <i>et al.</i> , 1995)
<i>Chronic oral toxicity study</i>			
DiPel	Rat	8400 mg/kg/day/2 years	(McClintock <i>et al.</i> , 1995)
<i>Human oral toxicity study</i>			
DiPel	Human	1000 mg/day/3 days	(McClintock <i>et al.</i> , 1995; US EPA, 1986)

¹ CryMax contains Cry2A, Cry1Ac, Cry1C and Cry2B, and is a registered trademark of Certis U.S.A. LLC. DiPel contains Cry2A, Cry2B, Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac and is a registered trademark of Abbott Labs.²⁰

² These No-observed effect levels (NOELs) represent the highest doses tested. Doses are expressed in various units for *B. thuringiensis* microbial technical grade materials, e.g., milligrams technical ingredient per kilogram body weight, or more commonly colony-forming units (CFU) or spores per animal or kilogram body weight. It is not possible to directly compare doses on a milligram technical material per kilogram of body weight basis. This is due to the fact that CFU or spore count can range from approximately 10⁸ to 10¹¹ per gram of technical grade *B. thuringiensis* microbial material (McClintock *et al.*, 1995). Secondly, the Cry protein content in different *B. thuringiensis* microbial preparations may vary depending on the microorganism and fermentation conditions. Cry1Ac and Cry2A protein dosages administered to animals in the referenced studies range from milligrams to grams per kilogram of body weight.

4.2. Allergenitet

For Cry1AC-, Cry2Ab2-, GUS- og NPTII- proteinene ble det analysert for potensiell ekspresjon av peptider/proteiner som kan ha homologi til kjente allergener. Det ble ikke funnet strukturelle og immunologiske relevante homologier til kjente allergene proteiner. Proteinene ble også testet i simulert mage-/tarmsaft. Proteinene degraderes fullstendig i løpet av 15 sekunder i magesaft. Generelt er allergene proteiner stabile i simulert magesaft lenger enn 2 minutter. Generelt blir den trypsinstabile delen av Cry-proteiner ikke degradert i simulert tarmsaft. Cry1AC- og Cry2Ab2-proteinene ble bare delvis degradert i tarmsaft. Generelt er størsteparten av allergene proteiner vanligvis stabile i minst 60 minutter i simulert mage/tarmsaft.

CP4-EPSPS proteinet er analysert for potensiell homologi til kjente allergener. Det ble ikke funnet strukturelle og immunologiske relevante homologier til kjente allergene proteiner. Den mest signifikante likheten var til støvmiddallergenet Der f II, med identitet på 30,5 % over 82 aminosyrer. Sammenligningen viste at lengden på overlappende sekvenser er 18 % av CP4-EPSPS enzymets 455 aminosyrer. Dette er lavere enn Codex sin anbefalte terskelverdi på 35 % for mulig kryssreaksjon til allergener (Codex 2003, 2004). Monsanto hevder at det er svært usannsynlig at det er kryssreaktivitet

mellom CP4-EPSPS og Der f II allergenet, fordi kravet til allergen kryssreaktivitet trolig er ≥ 50 % aminosyreidentitet mellom proteinene (Aalberse 2000). I de fleste tilfeller kreves det større enn 70 % identitet for kryssreaktivitet. Tester av CP4 EPSPS i simulert magesaft viser at proteinet degraderes fullstendig i løpet av 15 sekunder. Generelt er allergene proteiner stabile i simulert magesaft lenger enn 2 minutter. Majoriteten av allergene proteiner er vanligvis stabile i minst 60 minutter.

4.3. Delkonklusjon

Faggruppen konkluderer med at det ikke er grunn til å anta at den ernæringsmessige kvaliteten til frø fra den genmodifiserte bomullen er forskjellig fra frø fra umodifisert bomull.

5. Miljørisikovurdering

Monsantos søknad om godkjenning av den transgene bomullshybriden MON 15985 x MON 1445 under forordning 1829/2003/EF omfatter bruksområdene næringsmidler, fôrvarer, import og prosessering. Søknaden gjelder ikke dyrking. Miljørisikovurderingen av MON 15985 x MON 1445 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 (ref. 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 reprodusere.

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 bomullshybriden MON 15985 x MON 1445 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 2005b).

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 MON 15985 x MON 1445 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)

Ved mangel på seleksjonspress i fordøyelseskanal og/eller miljøet, er sannsynligheten for at horisontal genoverføring av transgener vil gi selektive fordeler eller økt fitness på mikroorganismer svært liten (Nielsen 2003, Pettersen *et al.* 2005). Kunnskap om forekomsten av *nptII*-genet i miljøet er imidlertid mangelfull. De tilgjengelige data viser at forekomsten av *nptII*-genet i patogene bakterier i Norge er lav. Imidlertid benyttes aminoglykosidet neomycin, som *nptII*-genet gir resistens mot, i veterinærmedisin i Norge. Et seleksjonstrykk på bakterietransformanter kan derfor ikke utelukkes. Det er usannsynlig at gener fra MON 15985 x MON 1445 vil etableres stabilt i genomet til mikroorganismer i miljøet eller i fordøyelseskanalen hos mennesker eller dyr uten et seleksjonstrykk. Ut fra tilgjengelig kunnskap er det ikke grunn til å forvente at det vil skje frekvente eller påvisbare horisontale genoverføringer av DNA-materiale fra MON 15985 x MON 1445. Det er imidlertid knyttet store metodologiske utfordringer ved en slik påvisning slik at det er usikkert om manglende deteksjon er grunnet fravær av overføring, manglende metodologisk verktøy for påvisning eller feil tidshorisont for prøvetaking (Heinemann & Traavik 2004; Nielsen & Townsend 2004). Antibiotikaene som *nptII* gir resistens imot er nylig klassifisert av European Medicines Agency (EMA 2007) og WHO (2005) som "critically important" og "cannot be classified as of no or minor therapeutic relevance".

Det er kunnskapshull knyttet til forekomsten av *nptII*-genet i Norge og Europa. Den store geografiske forskjellen i resistensmønster i Europa er ikke vurdert i dette tilfelle. Kanamycin/neomycinresistens i Norge er beskrevet hos blant annet *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* og *Staphylococcus intermedius* fra svin, svinefaeces, kalkunfaeces, storfekjøtt, hund og hundefaeces. Forekomsten av resistente isolater varierer mellom 1 til 10 % (NORM/NORMVET 2004-2007). Hvilke resistensgener som forårsaker resistensen er ikke beskrevet. *E. coli*, *E. faecalis* og *E. faecium* er i utgangspunktet neomycinsensitive arter. Med de resistensnivåene som er funnet i Norge er det rimelig å gå ut fra at resistensen i de langt fleste tilfeller skyldes tilstedeværelse av resistensgener. Norge er ikke mikrobiologisk isolert fra omverdenen. Vi importerer halvparten av all mat vi spiser. Fragmenter av *nptII*-gener er funnet i 5 % av DNA-prøver fra importert fôr (VKM 2005b)

Streptomycinresistens hos bakterier i Norge er dokumentert i Normvetrapportene (NORM/NORMVET 2004-2007). Resistensnivået er for noen bakteriearter til dels høyt, i andre arter er ikke resistens påvisbart. I *E. coli* fra hund er det påvist 13 % resistente isolater, mens det er funnet henholdsvis 34 % og 20 % resistente bakterier i faeces og kjøtt fra gris. Tilsvarende verdi for broilerkjøtt er 16 %. En del av isolatene er kartlagt genetisk. *aadA*-genet ble funnet i 38 av 136 isolater (NORM/NORMVET 2004). I tillegg ble det funnet andre streptomycinresistensgener (*strA-strB*) i 90 av isolatene. I samme studiene var forekomsten av resistens i *Salmonella* 0 %.

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 i Norge.

5.3. Potensiale for samspill mellom GMP og målorganismer

Bomullslinjen MON 15985 x MON 1445 er transformert med de bakterielle genene *cryIAc* og *cry2Ab2*, isolert fra *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaci*, og koder for δ -endotoksiner som gir plantene resistens mot enkelte arter i ordenen *Lepidoptera*, eksempelvis *Helicoverpa armigera* (syn. *Heliothis armigera*) ('cotton bollworm'), *Heliothis virescens* ('tobacco budworm') og *Pectinophora gossypiella* ('pink bollworm'). Med unntak av *Helicoverpa armigera* er målorganismene for denne transformasjonen ikke påvist i Norge (<http://www.faunaeur.org/distribution.php>).

Tatt i betraktning tiltenkt bruksområde for bomullslinjen, vil miljøeksponeringen være begrenset til sporadiske enkeltplanter fra frøspill i forbindelse med transport og prosessering. Nivået av eksponering av *Bt*-toksin for eventuelle målorganismer vil derfor være svært lav, og ikke ha noen økologisk betydning i Norge.

5.4. Potensiale for samspill mellom GMP og ikke-målorganismer

Eventuelle spillplanter av MON 15985 x MON 1445 med opphav i utsiktet frøspredning under ulike omsetningsledd antas ikke å medføre risiko for ikke-målorganismer.

Når det gjelder indirekte eksponering gjennom gjødsel fra husdyr fôret med genmodifisert bomull vil mesteparten av Cry-proteinene denatureres av enzymaktivitet (proteaser) i fordøyelseskanalen, og mikrobielle prosesser vil føre til en ytterligere nedbryting av proteinet i gjødsla. Dette medfører at svært lite Cry-proteiner blir spredt med husdyrgjødsel på dyrket mark, noe som igjen minimerer faren for eksponering av potensielt sensitive ikke-målorganismer. Spredning av Cry-toksinet via gjødsel antas derfor ikke å gi signifikante miljøeffekter.

5.5. Potensiale for samspill med abiotisk miljø og eventuelle effekter på biogeokjemiske prosesser

Ved foreskrevne bruk av bomullslinjen MON 15985 x MON 1445 vil eksponeringsnivået av Cry-proteinet være svært lavt, og ikke medføre signifikante effekter på abiotisk miljø og biokjemiske prosesser i Norge.

5.6. Overvåking

I følge direktiv 2001/18/EF, annekse VII, er formålet med overvåkingsplanen å bekrefte at alle antagelser i miljørisikovurderingen som gjelder forekomst og omfang av potensielle skadevirkninger av den genmodifiserte organismen, eller bruken av den er korrekt. Videre skal den identifisere forekomsten av skadevirkninger på menneskers helse eller miljøet som skyldes den genmodifiserte organismen eller bruken av den, og som ikke ble forutsett i miljørisikovurderingen.

Overvåking er relatert til risikohåndtering og en totalvurdering av overvåkingsplanen er derfor utenfor VKMs mandat. I henhold til oppdrag fra DN skal imidlertid VKM diskutere behovet for særskilt overvåking. Dette gjelder både i de tilfeller hvor søker ikke har foreslått særskilt overvåking og i de tilfeller hvor søkers risikovurdering avdekker behov for en spesiell overvåkingsplan. I sistnevnte tilfelle skal VKM gi en vurdering av kvaliteten på søkers overvåkingsplan, om denne er egnet til å avdekke så vel umiddelbare og direkte virkninger som forsinkede og indirekte virkninger påvist i miljørisikovurderingen. VKM skal ikke vurdere innretningen av den generelle overvåkingen.

Søknaden EFSA/GMO/UK/2008/58 omfatter ikke dyrking, og potensiell miljøeksponering av den transgene bomullslinjen 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 genmodifisert bomull representere en mulig kilde til uønsket genspredning. Miljørisikovurderingen som er presentert av søker identifiserer ingen endret risiko for miljø i forhold til annen bomull. Monsanto har derfor ikke utarbeidet spesifikke strategier for risikohåndtering eller en særskilt plan for overvåking av MON 15985 x MON 1445.

Tatt i betraktning tiltenkt bruksområde for MON 15985 x MON 1445 anser Faggruppe for GMO at det ikke er behov for å iverksette særskilt program for overvåking av bomullslinjen.

5.7. Delkonklusjon

Søknaden gjelder godkjenning av bomullslinjen MON 15985 x MON 15985 for import, prosessering og til bruk i næringsmidler og fôrvarer. Med bakgrunn i tiltenkt bruksområde er miljørisikovurderingen avgrenset til mulige effekter av utilsiktet frøspredning i forbindelse med transport og prosessering, samt indirekte eksponering gjennom gjødsel fra husdyr føret med genmodifisert bomull.

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.

De tilgjengelige data viser at forekomsten av *nptII*-genet i patogene bakterier i Norge er lav. Kunnskap om forekomsten av *nptII*-genet i miljøet er imidlertid mangelfull. Den veterinære bruken i Europa, inkludert i Norge, av aminoglykosider som kanamycin og neomycin, er slik at disse kan gi selektive betingelser for bakterietransformanter som har tatt opp ARMG.

Flertallet i faggruppen konkluderer med bakgrunn i rapportene (EFSA 2004; VKM 2005b) at bidraget av *nptII*-genet fra mat og fôr produsert fra MON 15985 x MON 1445 ikke er en signifikant kilde til resistensgener i bakterier som lever i tarmen til mennesker og dyr som spiser mat og fôr fra MON 15985 x MON 1445. Det bemerkes av neomycin benyttes i norsk veterinærmedisin i behandling av enteritt hos gris. Forbruket i 2006 av neomycin var 29 kg virkestoff, mens det totale forbruket av antibiotika til landdyr i Norge var på ca 6,5 tonn virkestoff (NORM/NORM-VET 2006). Flertallet i faggruppen konkluderer også med at på bakgrunn av den påviste tilstedeværelse av *aadA*-genet og andre streptomycinresistensgener hos bakterier i Norge, vil et eventuelt bidrag til resistensnivået fra MON 15985 x MON 1445 være neglisjerbart og ikke innebære noen økt risiko.

Det er kunnskapshull knyttet til forekomsten av *nptII*-genet i Norge og Europa. Den store geografiske forskjellen i resistensmønster i Europa er ikke vurdert i dette tilfelle. Kanamycin/neomycin-resistens i Norge er beskrevet hos blant annet *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* og *Staphylococcus intermedius* fra svin, svinefaeces, kalkunfaeces, storfekjøtt, hund og hundefaeces. Forekomsten av resistente isolater varierer mellom 0 og 10 % (NORM/NORM-VET 2004-2007). Hvilke resistensgener som forårsaker resistensen er ikke beskrevet.

Et mindretall i faggruppen (K.M. Nielsen, C. Linnestad, A. Myhr, T. Bøhn, O. Stabbetorp, H. Klungland) påpeker store forskjeller i geografisk utbredelse av antibiotikaresistens i Europa, og at det mangler publisert dokumentasjon som viser forekomsten av *nptII*-genet i Norge. I fravær av vitenskapelig dokumentasjon antas resistensgenforekomsten å være lav. En enkeltstudie indikerer høy forekomst av *aadA*-genet i *E. coli* fra kjøttprøver, men ingen forekomst i for eksempel *Salmonella*. Forekomsten til *aadA*-genet er derfor varierende med lite samlet dokumentasjon som gir et begrenset grunnlag for en forståelse av de faktorer som påvirker utbredelsen av *aadA*-genet i Norge. Videre påpekes det at neomycin og streptomycin benyttes i norsk landbruk, og at et seleksjonstrykk på eventuelle sjeldne transformanter derfor ikke kan utelukkes. Antibiotikaene som genene gir resistens imot er klassifisert av European Medicines Agency (EMA 2007) og WHO (2005) som ”critically important”. Manglende datagrunnlag gjør at mindretallet ikke ønsker å konkludere med hensyn på risiko knyttet til bruk av *nptII*-genet som ARMG.

Ved foreskrevet bruk av bomullslinjen MON 15985 x MON 1445 antas det ikke å være risiko for negative effekter på målorganismer, ikke-målorganismer eller på abiotisk miljø i Norge.

6. Vurdering av søkers dokumentasjon/kunnskapshull

Faggruppen finner at det er kunnskapshull knyttet til forekomsten av *nptII*-genet i Norge og Europa, samt at søkers dokumentasjon gir et begrenset grunnlag for forståelse av faktorer som påvirker utbredelsen av *aadA*-genet i Norge.

KONKLUSJON

Det er funnet statistiske forskjeller i enkeltparametere, men verdiene for de enkelte analyserte komponentene ligger innenfor typiske verdier for andre bomullssorter som er rapportert i litteraturen. Faggruppen anser at disse forskjellene ikke har noen helsemessig signifikans. Faggruppen konkluderer derfor med at det ikke er grunn til å anta at den ernæringsmessige kvaliteten til olje fra den genmodifiserte bomullsplanten MON 15985 x MON 1445 er forskjellig fra olje fra umodifiserte bomullsplanter.

Flere studier viser at proteinene Cry1Ac, Cry2Ab2, CP4 EPSPS, GUS og NPTII ikke er akutt toksiske. Monsanto har utført og henviser til akuttstudier på rotter for disse proteinene. Disse studiene viser at proteinene ikke fører til påvisbare helseeffekter på testdyrene. Monsanto har også utført sub-kroniske studier på rotter med fôr fra MON 15985 x MON 1445. Det ble ikke påvist testrelaterte endringer hos dyrene. Faggruppen konkluderer med at det er lite sannsynlig at eksponering for Cry1Ac-, Cry2Ab2-, CP4 EPSPS-, GUS- og NPTII-proteinene i seg selv, og i de mengder som tilføres via fôr fra den genmodifiserte bomullen, er helsemessig betenkelige for dyr.

Faggruppen konkluderer med at bomullsolje fra MON 15985 x MON 1445 er vesentlig lik olje fra umodifiserte bomullsfrø, og at bruk av olje fra MON 15985 x MON 1445 ikke utgjør noen større helsemessig risiko enn kommersiell olje fra umodifiserte bomullsplanter.

Nivået av antinæringsstoffet gossypol er signifikant høyere i MON 15985 x MON 1445 sammenlignet med kontrollinjen. Faggruppen påpeker at økt innhold av gossypol er en uønsket egenskap ved planten, men konkluderer med at så lenge innholdet av antinæringsstoffet er oppgitt og at mengden i kraftfôr er i henhold til fôrvareforskriften, skulle dette ikke medføre noen helsefare for dyr.

Det innsatte *nptII*-genet koder for resistens mot enkelte aminoglykosider som benyttes i norsk landbruk (VKM 2005b). De tilgjengelige data viser at forekomsten av *nptII*-genet i patogene bakterier i Norge er lav. Kunnskap om forekomsten av *nptII*-genet i miljøet er imidlertid mangelfull. En enkeltstudie indikerer høy forekomst av *aadA*-genet i *E. coli* fra kjøttprøver, men ingen forekomst i for eksempel *Salmonella*. Forekomsten til *aadA*-genet er derfor varierende med lite samlet dokumentasjon.

Flertallet i faggruppen konkluderer med at tilstedeværelse av *nptII*-gener i mat og fôr produsert fra den genmodifiserte bomullen MON 15985 x MON 1445 ikke er en signifikant kilde til *nptII*-gener i bakterier som lever i menneskets og dyrs tarmsystem, sammenlignet med de *nptII*-genene som allerede er tilstede i bakteriepopulasjonen i tarmen. Medlemmene finner også at på bakgrunn av den utbredte tilstedeværelsen av *aadA*-genet og andre streptomycinresistensgener hos bakterier i Norge vil et eventuelt bidrag til resistensnivået fra MON 15985 x MON 1445 være neglisjerbart og ikke innebære noen økt risiko.

Et mindretall i faggruppen (K. M. Nielsen, C. Linnestad, A. Myhr, T. Bøhn, O. Stabbetorp, H.Klungland) påpeker store forskjeller i geografisk utbredelse av antibiotikaresistens i Europa, samt at det mangler publisert dokumentasjon på forekomsten av *nptII*-genet i Norge. En enkeltstudie indikerer høy forekomst av *aadA*-genet i *E. coli* fra kjøttprøver, men ingen forekomst i *Salmonella*. I fravær av vitenskaplig dokumentasjon, antas genforekomsten til *nptII* i Norge å være lav, og forekomsten til *aadA*-genet til å være varierende med lite datagrunnlag. Det påpekes at neomycin og streptomycin benyttes i norsk landbruk, og at et seleksjonstrykk på eventuelle sjeldne transformanter derfor ikke kan utelukkes. Antibiotikaene som genene *nptII* og *aadA* gir resistens imot er klassifisert av European Medicines Agency (EMA 2007) og WHO (2005) som "critically important". Manglende datagrunnlag gjør at mindretallet ikke ønsker å konkludere med hensyn på risiko knyttet til bruk av

nptII-genet som ARMG, og det påpekes usikkerhet i datagrunnlaget for *aadA*-forekomsten i relevante husdyrpopulasjoner.

Søknaden gjelder godkjenning av bomullslinjen MON 15985 x MON 1445 for import, prosessering og til bruk i næringsmidler og fôrvarer. Faggruppen har derfor ikke vurdert mulige helse- og 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.

Samlet vurdering

Faggruppe for genmodifiserte organismer konkluderer med at bomullsfrøolje fra MON 15985 x MON 1445 er vesentlig lik olje fra umodifiserte bomullsfrø, og finner ikke at bruk av matoljen, isolert sett, utgjør noen større helserisiko enn kommersiell olje fra umodifiserte bomullsplanter. Manglende datagrunnlag gjør at mindretallet ikke ønsker å konkludere med hensyn på helserisiko knyttet til bruk og eventuell horisontal spredning av *nptII*-genet tilstede i plantematerialet.

En samlet faggruppe finner det lite trolig at den omsøkte bruken av bomullslinjen MON 15985 x MON 1445 vil medføre endret risiko for miljø i forhold til annen bomull.

REFERANSER

- Agbios (2008). Agbios GM Database. Information on GM Approved Products. <http://www.agbios.com/dbase.php>
- Aalberse, R.C. (2000). Structural biology of allergens. *J Allergy Clin Immunol*, **106**, 228-38.
- 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.
- Codex (2003). Codex Alimentarius Commission Alinorm 03/34: Joint FAO/WHO Food Standard Programme, Codex Alimentarius Commission, Twenty-Fifth Session, Rome, Italy, June 30 – July 5, 2003. Report of the third session of the Codex ad hoc intergovernmental task force on foods derived from biotechnology. Appendix III, Guideline for the conduct of food safety assessment of foods derived from recombinant- DNA plants, and Appendix IV, Annex of the assessment of possible allergenicity, pp 47-60.
- Codex (2004). Guideline for the Conduct of Food Safety Assessment of Foods Derived from Recombinant-DNA Plants. CAC/GL 45-2003, Codex Alimentarius Commission, Rome.
- 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.
- EMEA (2007). European Medicines Agency – Committee for medicinal products for veterinary use and committee for medicinal products for human use (2007). *Presence of the antibiotic resistance marker gene nptIII in plant for food and feed uses*. EMEA/CVMP756937/2007, 22 Feb. 2007
- FAOSTAT (2006). Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://faostat.fao.org>
- Gryson, N., Ronsse, F., Messens, K., De Loose, M., Verleyen, T. & Dewettinck K. (2002) Detection of DNA during the refining of Soybean Oil. *JAOCS*, **79**: 171-174.

- Hamilton, K. A., Pyla, P. D., Breeze, M., Olson, T., Li, M., Robinson, E., Gallagher, S. P., Sorbet, R. & Chen, Y. (2004) Bollgard II cotton: compositional analysis and feeding studies of cottonseed from insect protected cotton (*Gossypium hirsutum* L.) producing the Cry1Ac and Cry2Ab2 proteins. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 6969-6976.
- Heinemann, J.A. & Traavik, T. (2004). Problems in monitoring horizontal gene transfer in field trials of transgenic plants. *Nature Biotechnology*, **22**: 1105-1109.
- Hellebrand, M., Nagy, M. & Mörsel J-T. (1998) Determination of DNA traces in rapeseed oil. *Z Lebensm Unters Forsch A*, **206**, 237-242.
- Myer, R.O. & McDowell L.R.(2003) Potential for Gossypol Toxicity When Feeding Whole Cottonseed to Beef Cattle <http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/AN/AN13000.pdf>
- Naylor, M.W. (1992) Acute Oral Toxicity Study of Neomycin Phosphotransferase II (NPTII) in Albino Mice, Monsanto Study ML-91-409, St. Louis, MO, USA.
- 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(pFG4delta*nptII*) with transgenic plant DNA in soil microcosms and effects of kanamycin on selection of transformants. *Applied Environmental Microbiology*, **66**, 1237-42.
- Nielsen, K. (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.
- Nielsen, K. M. & Townsend, J. P. (2004). Monitoring and modeling horizontal gene transfer. *Nature Biotechnology*, **22**, 1110-1114. See also correspondence vol 22, 1349-1350.
- NORM/NORM-VET (Rapporter 2004-2007). *Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway*. Tromsø/Oslo. ISSN: 1502-2307. <http://www.vetinst.no>
- OECD (2004). *Consensus Document on Compositional Consideration for New Varieties of Cotton (*Gossypium hirsutum* and *Gossypium barbadense*): Key Food and Feed Nutrients and Antinutrients.*, 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>
- Pauli, U., Liniger, M. & Zimmermann, A. (1998) Detection of DNA in soybean oil. *Z Lebensm Unters Forsch A* , **207**, 264–267.
- Pettersen, A. K. Primicero, R., Bøhn, T. & Nielsen, K. M. (2005). Modelling suggest frequency estimates are not informative for predicting the long-term effect of horizontal gene transfer in bacteria. *Environmental Biosafety Research*, **4**, 222-233.
- 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.
- WHO (2005). World Health Organisation - *Critically important antimicrobial agents for human medicine for risk management strategies of non-human use*. Report of a WHO working group consultation, 15-18 Feb. 2005, Canberra, Australia.
- VKM (2005a). *Uttalelse om Monsanto's genmodifiserte bomull MON 15985 og MON 15985 x MON 1445 (EFSA/GMO/UK/2005/10). Uttalelse fra Faggruppe for genmodifiserte organismer 16.12.05*. Vitenskapskomiteen for mattrygghet, Oslo, Norge.
- VKM (2005b). *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 (2005c). *Uttalelse om Monsanto's genmodifiserte bomull MON531 x MON 1445 (EFSA/GMO/UK/2005/09). Uttalelse fra Faggruppe for genmodifiserte organismer 16.09.05*. Vitenskapskomiteen for mattrygghet, Oslo, Norge.
- Xanthopoulos, F.P. & Kechagia, U.E. (2000). Natural crossing in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Australian Journal of Agricultural Research*, **51**, 970-983.