



**Helse- og miljørisikovurdering av genmodifiserte soyalinje
305423 fra Pioneer Hi-Bred. International Inc.
(EFSA/GMO/NL/2007/45)**

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

20.10.08

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

Koordinatorer fra sekretariatet:

Arne Mikalsen og Merethe Aasmo Finne

SAMMENDRAG

Helse- og miljørisikovurderingen av den genmodifiserte og herbicidtolerante soyalinjen 305423 fra Pioneer Hi-Bred International Inc. er utført av Faggruppe for genmodifiserte organismer i Vitenskapskomiteen for mattrygghet. Mattilsynet og Direktoratet for naturforvaltning (DN) ber Vitenskapskomiteen for mattrygghet om å vurdere den genmodifiserte soyalinjen 305423 til bruk i næringsmidler og fôrvarer, men ikke til dyrking.

Vurderingen av den genmodifiserte soyaen er basert på dokumentasjon som er gjort tilgjengelig på EFSAAs nettside GMO EFSA-net. I tillegg er det benyttet informasjon fra uavhengige vitenskapelige publikasjoner i vurderingen. Soyaen 305423 er vurdert i henhold til tiltenkt bruk og i overensstemmelse med kravene i genteknologiloven, forskrift om konsekvensutredning etter genteknologiloven, forordning 1829/2003/EF, samt kravene i EUs utsettingsdirektiv 2001/18/EF med annekser. Videre er de prinsipper som er i EFSAAs retningslinjer for risikovurdering av genmodifiserte planter (EFSA 2006) og Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) konsensudokument for soya (OECD 2001) lagt til grunn for vurderingen. Den vitenskapelige vurderingen omfatter transformeringsprosess, bruk av vektor, transgene konstrukt, komparativ analyse av ernæringsmessig kvalitet, mineraler, kritiske toksiner, metabolitter, antinæringsstoffer, allergener og nye proteiner. Videre er agronomiske egenskaper, potensiale for ikke tilsiktede effekter på fitness, samt horisontal og vertikal genoverføring vurdert.

Soyalinjen 305423 er fremkommet ved at celler fra den kommersielle sorten "JACK" er transformert ved hjelp av partikkelakselerasjonsmetoden. Hensikten med genmodifiseringen er først å fremst å øke mengden av den enumettede fettsyren oljesyre (C18:1) i frøet. Soyalinje 305423 er også tolerant mot ALS-inhiberende herbicider med virkestoff sulfonyleurea.

Et 591 bp *gm-fad2-1* genfragment fra kodings-området til ω-6 desaturase gen 1 er satt inn i genomet til soyaen. Genfragmentet er koblet bak og dermed regulert av KTi3 promoteren som preferensielt medfører transkripsjon i soyabønner (dvs frøene). Gentranskriptet koder ikke for et funksjonelt enzym, men hemmer uttrykk (gene silencing) fra det endogene *FAD2-1* genet, som koder for ω-6-desaturase-enzym. Dette enzymet blir normalt uttrykt hovedsakelig i frøene. Hemming av enzymet fører til økt nivå av oljesyre (C18:1), samt nedsatt nivå av linol- (C18:2)- og linolensyre (C18:3) i frøene. I soyaens genom er det også satt inn et *gm-hra*-gen. GM-HRA-enzymet som uttrykkes er et syntetisk acetolaktatsyntase enzym (ALS), noe som medfører at ALS-herbicider ikke kan binde seg til og inaktivere enzymet. Soyalinjen inneholder ingen markørgener for antibiotikaresistens.

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

Analysene av ernæringsmessige viktige komponenter ble vurdert. For soya 305423 er valget av analyseparametere gjort i henhold til OECDs konsensudokument for soya (OECD 2001). Det er funnet til dels store statistiske forskjeller for enkelte komponenter. Dette har sammenheng med at soya 305423 har et høyt innhold av fettsyren oljesyre og forholdsvis lavt innhold av fettsyrene linol- og linolensyre. For flertallet av komponentene er imidlertid de statistiske forskjellene ikke konsistente over forsøksfelt. Faggruppen anser analysene for å være tilstrekkelige for en vurdering av soyalinjen 305423 til bruk som mat og fôr. Proteinene som blir uttrykt som følge av genmodifiseringen har ingen likheter med kjente allergener eller egenskaper som tilsier at de er allergener.

Faggruppen konkluderer med at mat og fôrvarer fra soya 305423 ikke er vesentlig lik mat og fôrvarer fra umodifiserte soya. Dette fordi soya 305423 har høyt innhold av fettsyren oljesyre og forholdsvis lavt innhold av fettsyrene linol- og linolensyre. Faggruppen finner at soya 305423 brukt som mat og

fôrvarer utgjør en ubetydelig helserisiko, og at helserisikoen ikke er større enn for umodifiserte soyabønner. Faggruppen finner det ikke sannsynlig at matolje fra soya 305423 utgjør en større helserisiko enn matolje fra umodifisert soya, når oljen benyttes i matvareproduksjon der matolje fra konvensjonell soya må herdes.

Søknaden gjelder godkjenning av soyalinjen 305423 for import og prosessering under direktiv 2001/18/EF del C og til bruk i næringsmidler og fôrvarer under forordning (EF) 1829/2003. Faggruppen har derfor ikke vurdert mulige miljøeffekter knyttet til dyrking av soyalinjen. Det er ingen indikasjoner på økt sannsynlighet for spredning, etablering og invasjon av soyalinjen i naturlige habitater eller andre arealer utenfor jordbruksområder som resultat av frøspill i forbindelse med transport og prosessering. Soya dyrkes ikke i Norge, og 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 finner det lite trolig at bruk av soyalinjen 305423 vil medføre endret risiko for helse i forhold til annen soya, men påpeker muligheten for rekombinasjoner knyttet til den påviste ustabiliteten i genomet til soya 305423. Faggruppen påpeker også at det er kunnskapshull knyttet til redusert nivå av trypsinhemmer

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

NØKKELORD

Soya, *Glycine max* (L.) Merr., genmodifisert soyalinje 305423, herbicidtoleranse, oljesyre, *gm-fad2-1*, ω -6-desaturase, GM-HRA-protein (ALS protein), acetolactatsyntase (ALS), helsemessig trygghet, helse, miljørisiko, forordning 1829/2003/EF, direktiv 2001/18/EF

INNHOLDSFORTEGNELSE

BIDRAGSYTERE	2
VURDERT AV	2
SAMMENDRAG.....	3
NØKKEWORD.....	4
INNHOLDSFORTEGNELSE.....	5
BAKGRUNN	7
OPPDRAK FRA DIREKTORATET FOR NATURFORVALTING OG MATTILSYNET.....	7
RISIKOVURDERING	8
1. Innledning.....	8
1.1. Beskrivelse av egenskap(er) og virkningsmekanismer	8
1.2. Bakgrunnsinformasjon	8
2. Molekylær karakterisering	9
2.1. Transformasjonssystem og vektorkonstruksjon	9
2.2. Karakterisering av geninnsettingen og genkonstruksjonen.....	9
2.3. Molekylærbiologiske analyser	10
2.4. Informasjon vedr. uttrykk av introduserte gener og åpne leserammer (ORF)	13
2.5. Nedarving og stabilitet av innsatt DNA	14
2.6. Delkonklusjon	15
3. Komparative analyser.....	15
3.1. Valg av komparator og forsøksdesign.....	15
3.2. Analyser av ernæringsmessige komponenter	15
3.3. Agronomiske egenskaper	17
3.4. Delkonklusjon	17
4. Dokumentasjon av toksisitet, allergenisitet og næringsverdi.....	18
4.1. Toksisitet	18
4.2. Allergenisitet	19
4.3. Ernæringsmessig vurdering av olje fra soya 305423	19
4.4. Delkonklusjon	19
5. Miljøriskovurdering	20
5.1. Potensiale for ikke intenderte effekter på fitness relatert til genmodifiseringen.....	20
5.2. Potensiale for genoverføring	20
5.3. Miljøovervåkingsplan.....	21
5.4. Delkonklusjon	22

6. Vurdering av søkers dokumentasjon	22
KONKLUSJON	23
REFERANSER	24

BAKGRUNN

Faggruppe for genmodifiserte organismer i Vitenskapskomiteen for mattrygghet er bedt av Mattilsynet og Direktoratet for naturforvaltning om å foreta en vurdering av helse- og miljørisiko ved en eventuell godkjenning av den av den genmodifiserte soyalinjen 305423 fra Pioneer Hi-Bred International, Inc. (EFSA/GMO/NL/2007/45). Soya 305423 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, men ikke dyrking. Søknaden ble fremmet og anbefalt av nederlandske myndigheter i juni 2007. Søknaden ble lagt ut på EFSA-nett 22. oktober 2007, med frist på 90-dager for innspill fra EU- og EØS/EFTA-landene. Norge har ikke tidligere uttalt seg om soyalinjen 305423.

Soyalinjen er søkt notifisert i Canada og USA for all bruk inkludert dyrking, og det forligger søknad til Mexico for import til alle bruksområder.

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.

Faggruppe for genmodifiserte organismer skal i tråd med oppdragsbrev utarbeide helse- og miljørisikovurdering av soyalinjen til import og industriell prosessering, samt til bruk som næringsmiddel og fôrvare. Søknaden omfatter ikke dyrking. Vurderingen skal utføres i henhold til tiltenkt bruk og i overensstemmelse med prinsippene som er nedfelt i EFSAAs retningslinjer for vurdering av genmodifiserte planter ("Guidance document of the scientific panel on genetically modified organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed" (EFSA 2006).

I henhold til oppdragsbrev fra DN skal VKM primært fokusere på miljørisiko i EØS-området, og på miljørisiko som er spesifikke for Norge. Det skal også gis en samlet konklusjon om miljørisiko, i tråd med kravene i forskrift om konsekvensutredning etter genteknologiloven, vedlegg 2 C. Norge har ikke tidligere uttalt seg om soya 305423.

Produktet som ønskes vurdert, er:

Genmodifisert soya, EFSA/GMO/NL/2007/45 (soya 305423).

Unik kode: DP-305423-1.

Status i EU: Søknad under 1829/2003/EF. EFSAAs frist for innspill er 22.01.08.

Ønsket svarfrist til Mattilsynet/DN er 22. januar 2008.

RISIKOVURDERING

1. Innledning

Risikovurderingen av den genmodifiserte soyalinjen 305423 er i hovedsak basert på dokumentasjon som er gjort tilgjengelig på EFSAs nettside GMO EFSAnet. I tillegg er det benyttet uavhengige vitenskapelige publikasjoner med referee i vurderingen. Vurderingen er gjort i henhold til tiltenkt bruk, og i overensstemmelse med kravene i genteknologiloven, forskrift om konsekvensutredning etter genteknologiloven, forordning 1829/2003/EF, samt kravene i EUs utsettingsdirektiv 2001/18/EF med annekser.

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

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

1.1. Beskrivelse av egenskap(er) og virkningsmekanismer

Soyalinjen 305423 er fremkommet ved at celler fra soyakultivaren "JACK" ble transformert ved hjelp av partikkelakselerasjonsmetoden. Et 591 bp *gm-fad2-1* genfragment fra kodingsområdet til ω -6 desaturase gen 1 er satt inn i genomet til soyaen. Genfragmentet er koblet bak og dermed regulert av KTi3 promoteren som preferensielt medfører transkripsjon i soyabønner (dvs. frøene). Gentranskriptet koder ikke for et funksjonelt enzym, men hemmer uttrykk ("gene silencing") av det endogene *FAD2-1*-genet, som koder for ω -6-desaturase-enzym. Dette enzymet blir normalt uttrykt hovedsakelig i frøene.

1.2. Bakgrunnsinformasjon

Tabell 1. Oversikt over analyser som er utført av soya 305423. I tabellens kolonne "Relevant section of application" henvises det kapittel III i EFSAs retningslinjer for risikovurdering av GMO (EFSA 2006). Kapittel III er delt inn i underkapitler som er nummerert fra A t.o.m. D.

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

Kilde: Pioneers søknad til EFSA om markedsføring av soya 305423.

2. Molekylær karakterisering

2.1. Transformasjonssystem og vektorkonstruksjon

De to lineære rekombinante DNA fragmentene PHP19340A og PHP17752A ble, ved hjelp av restriksjonsenzymet *Asc I*, klippet ut av henholdsvis plasmidene PHP19340 og PHP17752, og deretter rensset (eluert fra agarosegel). PHP19340A og PHP 17752A DNA-fragmentene inneholder ikke antibiotikaresistensen.

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

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

2.2. Karakterisering av geninnsettingen og genkonstruksjonen

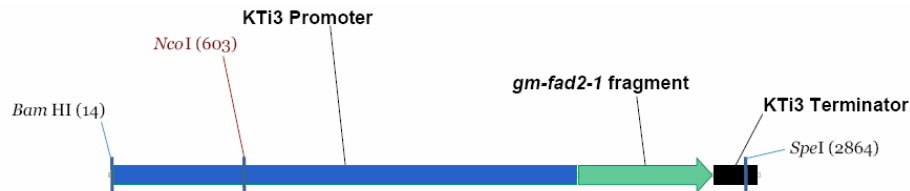
Southern blot og PCR har blitt benyttet for å karakterisere de rekombinante DNA-fragmentene i planten. Molekylærbiologisk karakterisering viser at det er satt inn flere intakte og trunkerte kopier av

det rekombinant DNA-fragmentet PHP19340A og et enkelt intakt kopi av det rekombinante DNA-fragmentet PHP17752A i soyaens genom.

De opprinnelige fragmentene fra plasmidene inneholder:

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

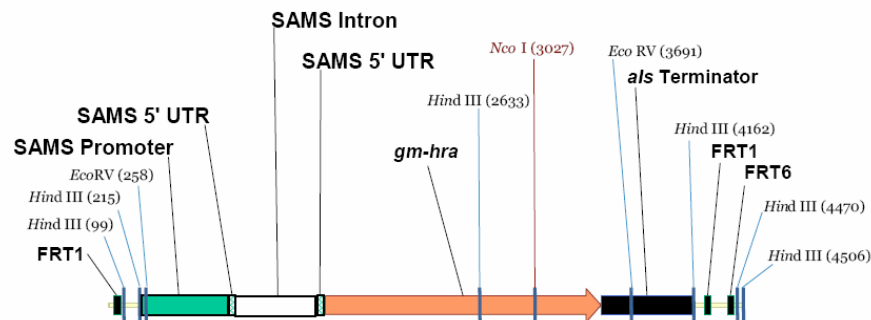
- a) *KTi3P* promoter fra soya Kunitz trypsinhemmer gen 3
- b) *gm-fad2-1* fragment på 597 bp fra soya mikrosomal ω -6-desaturasegen *FAD2-1*
- c) *KTi3T* terminator fra soya Kunitz trypsinhemmer gen 3



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

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

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



Figur 2: Rekombinant PHP17752A DNA fragment brukt til å modifisere soyaens genom.

2.3. Molekylærbiologiske analyser

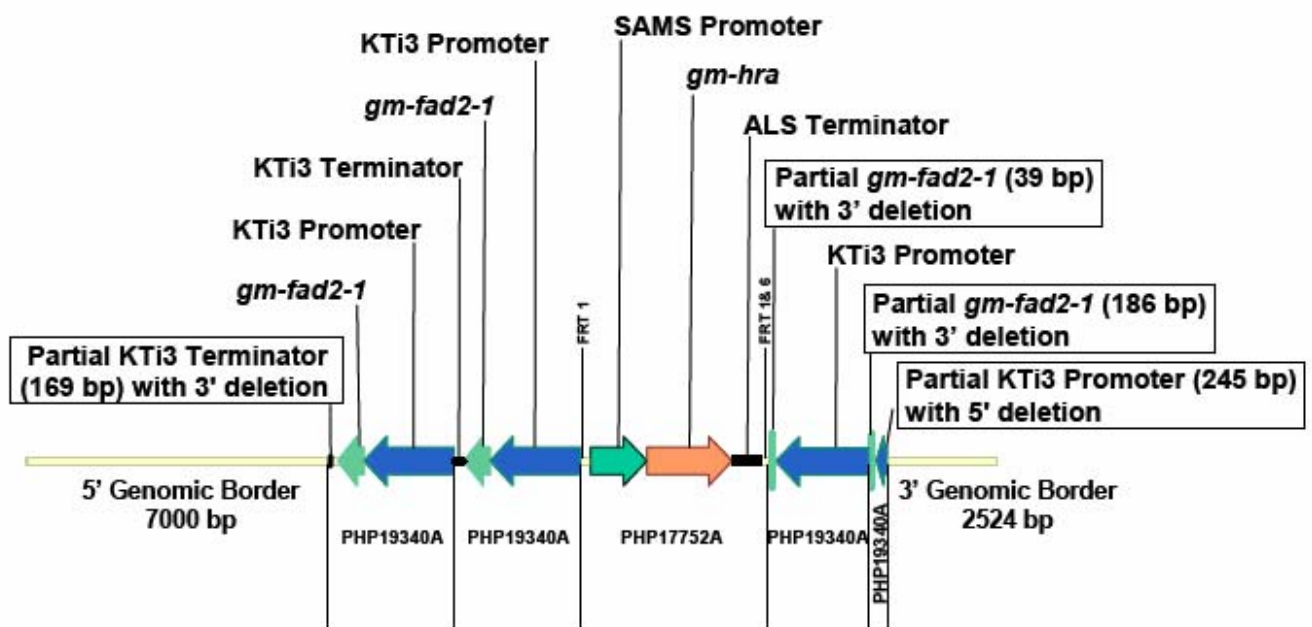
Hele genomet fra soya 305423 ble kuttet med restriksjonsenzymene *Hind III* eller *Mbo I*. Fragmentene fra restriksjonskuttingen ble klonet inn i en cosmidvektor for å lage et cosmidbibliotek. Biblioteket ble undersøkt med en probe som bestod av et fragment fra *KTi3* promoteren. Totalt ble det påvist tre unike kloner (51-21, 51-9 og H3IIBB19) fra *Hind III*-biblioteket, og to (mbo30 og mbo22) fra *Mbo I*-biblioteket. Disse molekylærbiologiske analysene viser at det er satt inn flere intakte og trukerte kopier

av det rekombinant DNA-fragmentet PHP19340A (Innskuddsområdene 1, 2, 3, 4) og et enkelt intakt kopi av det rekombinante DNA-fragmentet PHP17752A (Innskuddsområde 1) i soyaens genom. De rekombinante fragmentene i planten inneholder de samme gener og/eller genelementer som er på det tilsvarende DNA fragmentet i plasmidene.

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

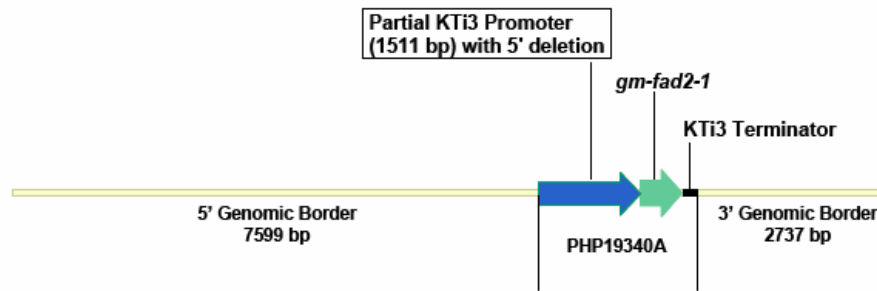
Karakterisering av de forskjellige innskuddsområdene:

Innskuddsområde 1



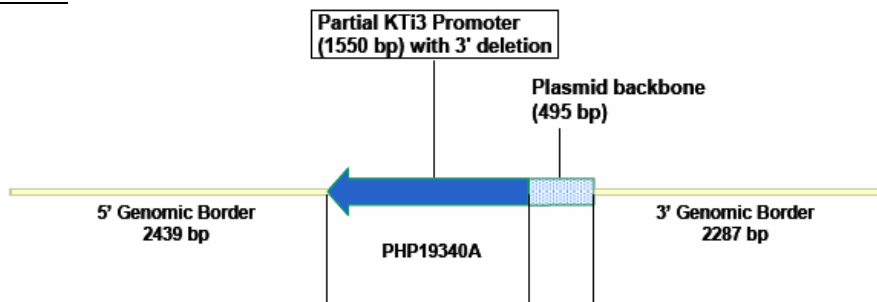
For dette innskuddsområde ble 22452 bp av soya 305423s genomsekvenser karakterisert med PCR, kloning av PCR-produktene og sekvensering. Karakteriseringen omfatter 7000 bp genomisk DNA fra innskuddet 5'-flankeområdet og 2524 bp genomisk DNA fra 3'-flankeområde, samt 12928 bp av innsatt rekombinant DNA.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

Innskuddsområde 2



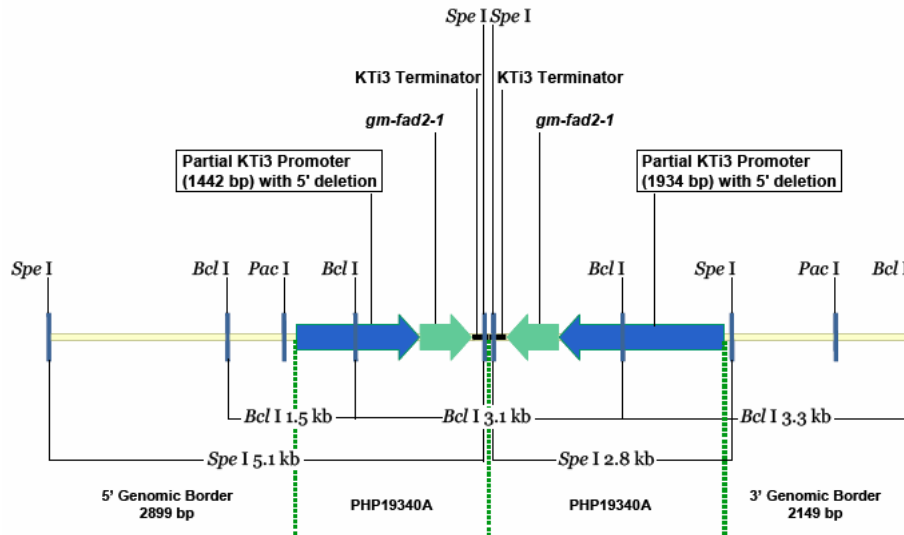
For dette innskuddsområde ble 12667 bp av soya 305423s genomsekvenser karakterisert med PCR, kloning av PCR-produktene og sekvensering. Karateriseringen omfatter 7599 bp genomisk DNA fra innskuddet 5'-flankeområdet og 2737 bp genomisk DNA fra 3'-flankeområde, samt 2331 bp av innsatt rekombinant DNA.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

Innskuddsområde 3



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

Innskuddsområde 4



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

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

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

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

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

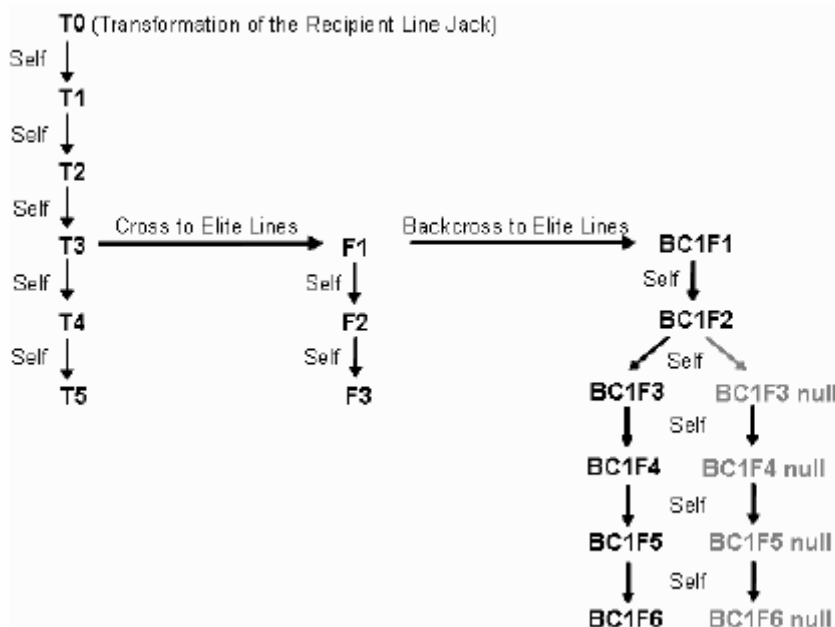
leseramme v.h.a. databasene allergen (FARRP6 database fra Nebraska universitet)- og toksin (NCBI-proteindatabase, SWISS-PROT, PIR, PRF, PDB) viser ingen biologisk relevante strukturelle likheter til allergener, antinæringsproteiner eller toksiner. Resultatene fra disse teoretiske analysene viser at det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

Hemming av endogent *KTi3* gen

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

2.5. Nedarving og stabilitet av innsatt DNA

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



Figur 3: Kryssingsskjema for genmodifisert soyalinje 305423

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

2.6. Delkonklusjon

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

I forbindelse med den påviste ustabiliteten av *gm-hra* ekspresjonskassetten har Faggruppe for genmodifiserte organismer lagt inn følgende spørsmål til Pioneer på EFSA-nett:

"The applicant has demonstrated instability in the genome of 305423 soy as a single plant has been found to be gm-hra negative. This particular plant may have undergone recombination between two repeated KTi3 promoter elements resulting in the removal of the entire gm-hra cassette and portions of the KTi3 promoter elements flanking this cassette. Although the frequency of this genetic recombination seems to be low in line 305423, the GMO Panel of the Norwegian Scientific Committee for Food would like to ask the applicant to address this topic further and discuss the probability of other genetic recombination events taking place which, in turn, may have negative effects."

3. Komparative analyser

3.1. Valg av komparator og forsøksdesign

Det er foretatt analyser av ernæringsmessige viktige komponenter av den transgene soyalinjen 305423 og umodifisert isogenetisk kontroll fra generasjonene BC1F5-null og BC1F6-null (fig.3). Prøvene som er analyserte stammer fra feltforsøk på fire lokaliteter i USA og to i Canada i 2005. Videre er det utført feltforsøk på to lokaliteter i Argentina og fire i Chile i sesongen i vekstsesongen 2005-2006. Pioneer har, etter innspill fra en arbeidsgruppe i EFSA's GMO Panel, supplert markedssøknaden med to rapporter. Denne dokumentasjonen ble lagt ut på EFSA-nett i april 2008. Den ene rapporten omhandler feltforsøk utført i 2005 i USA og den andre omhandler feltforsøk utført i 2005 både i USA og Canada. I disse feltforsøkene er soyakultivaren "Jack" brukt som umodifisert isogenetisk kontroll. For alle feltforsøkene bestod hvert forsøksfelt av et fullstendig randomisert blokkdesign med fire blokker. Hvert gjentak inneholdt forsøksruter med komparator og testlinjen 305423, henholdsvis ubehandlet og sprøytet med ALS-hemmende herbicider i vekststadiene V2 og V5. I forsøksfeltene i USA og Canada ble testlinjen sprøytet to ganger med en blanding av klorimuron og thifensulfuron, mens feltene i Chile og Argentina ble behandlet med henholdsvis klorimuron og thifensulfuron i blanding, eller kun klorimuron. Det ble tatt ut prøver fra tre av fire blokkene i hvert felt.

Statistiske analyser

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

3.2. Analyser av ernæringsmessige komponenter

Hovedkomponenter i soyabønne og fôr

Valget av analyseparametere er gjort i henhold til OECDs konsensusdokument for soya (OECD 2001). Det er foretatt forskjellige analyser av hovedkomponenter for fôr og bønne. Følgende parametere ble

analysert i fôr: aske, fett, protein, total fiber, ADF (acid detergent fibre), NDF (neutral detergent fibre), og karbohydrater. I bønne ble det analysert for innhold av følgende parametere: protein, fett, aske, karbohydrater, ADF, NDF, total fiber, karbohydrater, aminosyrer, fettsyrer (C8-C22), fosfor, jern, kalium, kalsium, kobber, magnesium, mangan, natrium, sink, vitaminene B1, B2, totalt E, α -tokoferol β -tokoferol, δ -tokoferol, γ -tokoferol og folinsyre, isoflavonene genistin, genistein, malonylgenistin, acetylgenistin, daidzin, daidzein, malonyldaidzin, acetyldaidzin, glycitin, glycitein, malonylglycitin, acetylglycitin, oligosakkaridene sukrose, raffinose og staktyose, samt de sekundære metabolittene og anti-næringsstoffene coumestrol, lektiner, trypsinhemmer og fytinsyre. Analysene ble utført under god laboratoriepraksis (GLP).

Det ble ikke funnet statistisk signifikante forskjeller mellom testlinje og komparator for komponentene aske, fett, protein, total fiber, ADF (acid detergent fibre), NDF (neutral detergent fibre), og karbohydrater i prøver av fôr. I prøver av bønner fra usprøytete planter ble det funnet signifikante forskjeller for aske over alle feltene. Analyser av bønner fra sprøytete planter viste statistiske forskjeller over alle feltene for parametrene fett, NDF, aske og karbohydrat. For fett, aske og karbohydrat ble det funnet statistisk signifikante forskjeller for to av de seks feltene.

Fettsyresammensetning i soyabønne

Fettsyresammensetningen for soya 305423 er målt i henhold til OECDs konsensusdokument for soya. Det ble analysert for innhold av totalt 25 fettsyrer. Av disse ble 10 ekskludert fra statistiske analyser fordi mengdene var lavere enn deteksjonsgrensene. Hensikten med genmodifiseringen er å øke mengden av oljesyre i frøene. Linolsyre (C18:2) dannes fra oljesyre (C18:1) ved at ω -6-desaturase danner en dobbeltbinding i C18:1-fettsyren. Videre dannes linolensyre (C18:3) fra linolsyre ved danning av enda en dobbeltbinding. Hemming av syntesen av linolsyre fører dermed til økt innhold av oljesyre, og nedsatt mengde både av linol- og linolensyre. For olje- og linolsyre er det forventet og funnet store statistiske forskjeller i forhold til kontroll. Innholdet av oljesyre i 305423 er gjennomsnittlig økt med 250 % i forhold til umodifisert kontroll, mens mengde linolsyre er redusert med ca. 90 % og linolensyre med ca. 40 %. For de øvrige fettsyrene, med unntak av to fettsyrer, ble det funnet statistisk signifikante forskjeller over alle forsøksfeltene. For myristin-, palmitin-, heptadekan (C17:0)-, heptadecen (C17:1)-, olje-, linol-, linolen- og eikosamonoensyre ble påvist signifikante forskjeller i alle seks feltene. Alle verdiene, med unntak av for heptadekan-, heptadecen-, olje- og linolsyre, ligger innenfor typiske verdier for andre soyasorter som er rapportert i litteraturen. Pioneer har vurdert biologisk betydning og foretatt eksponeringsvurdering av C17:0 og C17:1 syrene fra olje fra soya 305423, og sammenlignet med generelt inntak av disse syrene i vegetabilsk olje, smør, ost og kjøtt. Pioneer konkluderer med at mengdene av disse syrene i 305423 er lik eller lavere enn i disse matvarene.

Aminosyrer i soyabønne

Aminosyre er målt i henhold til OECDs konsensusdokument for soya. Både essensielle og ikke-essensielle aminosyrer ble analysert. Det er ikke funnet statistisk signifikante forskjeller for aminosyrene.

Vitaminer

OECDs konsensusdokument for soya har ikke satt opp vitaminer som komponenter det skal måles for. Følgende vitaminer er undersøkt i soya 305423: B1, B2, totalmengde vitamin E, α -tokoferol, β -tokoferol, δ -tokoferol, γ -tokoferol og folinsyre. Det ble ikke funnet statistisk signifikante forskjeller for de nevnte vitaminer. For de fleste vitaminene som er målt ligger verdiene innenfor typiske verdier som er rapportert i litteraturen.

Mineraler

OECDs konsensusdokument for soya har ikke satt opp mineraler som komponenter det skal måles for. Følgende mineraler er undersøkt i soya 305423: fosfor, jern, kalium, kalsium, kobber, magnesium, mangan, natrium og sink. Det ble funnet statistiske forskjeller for innholdet av kalsium og magnesium over alle feltene i bønner fra usprøytete planter. Tilsvarende ble det påvist statistisk signifikante forskjeller for innholdet av kalsium, magnesium, mangan og fosfor i prøver fra bønner fra sprøytete

planter. Analyser innen felt viser ingen signifikante forskjeller innenfor to av seks forsøksfelt. Verdiene for alle mineralene ligger innenfor typiske verdier som er rapportert i litteraturen.

Sekundære metabolitter og antiernæringsstoffer

Sekundære metabolitter og antiernæringsstoffer er målt i henholdt til OECDs konsensusdokument for soya. Statistiske analyser over forsøksfelt viser signifikante forskjeller mellom testlinje og komparator for parameteren trypsinhemmer. Verdiene ligger imidlertid innenfor typiske verdier som er rapportert i litteraturen. Innhold av coumesterol var lavere enn påvisningsgrensen. Det ble ikke funnet signifikante forskjeller for lektiner og fytinsyre.

Isoflavoner

Isoflavoner er målt i henholdt til OECDs konsensusdokument for soya. Mengdene av acetyldaidzin, acetylgenistin og acetylglycitin var lavere enn påvisningsgrensene. Det er funnet statistisk signifikante forskjeller for noen isoflavoner. For genistin, genistein, daidzein, glycitin, glycitein og malonylglycitin er det ikke påvist statistiske forskjeller. For malonylgenistin, daidzin og malonyldaidzin er det påvist statistiske forskjeller over alle feltene, men ikke innenfor de enkelte feltene.

Oligosakkarider

Oligosakkarider er målt i henholdt til OECDs konsensusdokument for soya. Det er ikke funnet statistiske forskjeller for oligosakkaridene sukrose og raffinose. For staktyose er det funnet statistiske forskjeller over alle lokalitetene, men ikke innenfor de enkelte feltene i hver lokalitet.

Analyser av GM-HRA-proteinet.

GM-HRA-proteinet ble detektert i alle undersøkte vev og organer fra uprosessert soya. Ved analyser av prosesserte produkter som olje, mel, belg etc. ble det ikke påvist GM-HRA-protein over deteksjonsgrensen for ELISA-metoden. Nedre påvisningsgrense for GM-HRA med ELISA er 0,54 µg/g tørrvekt

3.3. Agronomiske egenskaper

Søker opplyser om at det er foretatt observasjoner av agronomiske karakterer i feltforsøk med soyalinjen 305423 på 6 lokaliteter i USA og Canada i 2005, og 6 lokaliteter i Argentina og Chile i vekstsesongen 2005-2006. Hvert forsøksfelt bestod av et fullstendig randomisert blokkdesign med 4 gjentak. Foreldrelinjen cv. 'Jack' ble benyttet som kontrollsort. For øvrig beskrivelse av forsøksmetodikk og sprøyteregimer, se kap. 3.1. Tre av blokkene ble benyttet til vurdering av agronomiske ekvivalens. I henhold til dokumentasjon fra søker er det foretatt registreringer av en rekke karakterer knyttet til reproduksjon, spredning, vegetativ vekst, samt sjukdoms- og insektsresistens. Det er foretatt statistiske analyser innen steder og separate kombinerte analyser over steder for forsøkene i henholdsvis Nord- og Sør-Amerika. Analyser fra forsøkene i Canada og USA viste signifikante forskjeller ($p < 0.05$) mellom den transgene linjen og kontrollsorten med hensyn på frøplantevitalitet og antall planter tidlig i vekstsesongen (VC-V2) og ved modning. Tilsvarende ble det funnet signifikante forskjeller mellom 305423 og komparator for tidlighet (antall dager til modning) i de søramerikanske forsøkene. Statistiske analyser innen steder viser signifikante forskjeller mellom soyalinjen og kontroll i 3 og 4 av de seks forsøksstedene. I følge søker ligger gjennomsnittsverdiene for disse parametrene innenfor forventet variasjonsområde for soya. For de øvrige karakterene ble det ikke registrert signifikante forskjeller.

3.4. Delkonklusjon

Analysene av ernæringsmessige viktige komponenter viser statistiske forskjeller i enkeltparametre. Verdiene for de fleste analyserte komponentene ligger innenfor typiske verdier for andre soyasorter som er rapportert i litteraturen. Faggruppen mener at for noen av de forskjellene som er påvist kan ha positiv helsemessig betydning. Resultatene fra undersøkelsene av agronomiske og morfologiske karakterer små eller ingen forskjeller mellom soya 305423 og kontrollinjene.

4. Dokumentasjon av toksisitet, allergisitet og næringsverdi

4.1. Toksisitet

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

I 2005 utførte Pioneer akutt oral fôringsstudier på mus med renfremstilt GM-HRA, produsert av *E. coli*. Studiene er, med noen unntak, utført i henhold til EPA-FIFRA (EPA-FIFRA 1989) og OECDs (OECD 1998) retningslinjer for "Good Laboratory Practice" (GLP). Karakteriseringen av testsubstans ble ikke utført under GLP. Testdosene ble ikke analyserte for stabilitet, homogenitet og nøyaktig konsentrasjon. Imidlertid ble testdosene veid med vekt som har tre desimalers nøyaktighet, og preparering av testsubstansene ble utført av fullt utdannet personell. I studiene ble det benyttet 5 hann og 5 hunn mus. For kontroll ble det benyttet serumalbumin. GM-HRA- og serumalbumindosen var henholdsvis 582 og 2000 mg/kg kroppsvekt. Etter 14 dagers observasjonsperiode ble alle dyrene avlivet. Det er utført patologiske undersøkelser. Det er ikke påvist testrelaterte skader på dyrene.

Fôringsforsøk på mus 28 dager

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

Fôringsforsøk på broiler

Søknaden inneholder dokumentasjon på et 42-dagers fôringsforsøk på hann- og hunnbroilere. I dette forsøket ble det benyttet 600 dyr, fordelt på fem grupper à 120 dyr. Fôringsforsøket er ikke utført i henhold til GLP (FIFRA (EPA-FIFRA 1989; OECD 1998)). Omfattende dokumentasjon av kritiske data og forholdsregler for kvalitetskontroll ble utført for å sikre integriteten til fôringsforsøket.

Dyrene ble fôret med soyamel fra henholdsvis soya 305423, en umodifisert kontrollsort (0911) og tre kommersielle, umodifiserte referansesorter (93B86, 93B15, 93M40). Fuglene ble observert daglig, og vektøkning, fôrinntak og fôrutnyttelse ble målt. Etter 6 uker, da fuglene er ferdig med vekstfasen, ble dyrene avlivet. Major og minor pectoralis fra høyre side, samt buk fett ble tatt ut og veid. Der ble ikke funnet forskjeller mellom gruppene med hensyn på brystmuskelvekt og buk fettvekt, enten som absolutt vekt eller relatert til kroppsvekt. Det ble ikke påvist andre vesentlige endringer ved fôring med soyabønne fra soya 305423, kontroll og de tre referansesortene.

Subkronisk fôringsforsøk på rotter

Pioneer har i ettertid, etter fristenfor innspill til EFSA-net, supplert markedsføringsøknaden med et 13 ukers fôringsforsøk med fôr fra soya 305423. Dokumentasjonen fra fôringsforsøket ble lagt ut på EFSA-net i april 2008.

Fôringsforsøket inkluderte hann- og hunnrotter, total 5 grupper à 12 rotter/kjønn. Dyrene ble fôret med standard rottefôr tilsatt henholdsvis 20 % soyamel, 1,4-1,5 % malt soyabønnebelg og 1,5-1,7 % 'degummed', alkalieraffinert soyaolje. Fôret ble tilsatt henholdsvis soya 305423, en umodifisert kontrollsort (091) og tre kommersielle umodifiserte referansesorter (93B86, 93B15, 93M40). Fôringsforsøket er blitt utført i henhold til GLP (U.S. EPA FIFRA 40 CFR part 160), samt 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).

Det ble utført makroskopiske og mikroskopiske undersøkelser av organene, samt klinisk patologisk undersøkelser av urin og blod fra alle dyrene i hver gruppe. Det ble ikke påvist noen vesentlige endringer i de undersøkte parametrene. Det ble imidlertid påvist statistisk signifikante forskjeller for relativ hjertevekt i forhold til hjernevekt hos hannrotter fôret med 305423 sammenlignet med dyr fôret med kontrollsoya 091. Forskjellene er på 2-7 %. Slike forskjeller er imidlertid ikke funnet mellom hannrotter som ble fôret med fôr fra de tre kommersielle umodifiserte referansesortene og fôr fra soya 305423. Når det gjelder hunnrotter ble det ikke påvist signifikante forskjeller. En hannrotte som ble

fôret med 305423 hadde økt ARET (absolute reticulocyte counts)- tall, en annen fra same gruppe hadde større økning for enkelte lever-relaterte klinisk-kjemiske verdier, mens noen hannrotter hadde nedsatt urin-osmolalitet og nedsatt spesifikk tetthet til urin ved dag 95/96. Mikroskopiske undersøkelser av organene for både hann- og hunnrotter fôret med fôr fra soya 305423 og kontroll 091 viste ingen testrelaterte endringer. De forskjellene som ble påvist ble ikke betraktet som toksikologiske relevante da de er påvist i enkelte rotter, men ikke for alle innenfor samme gruppe.

4.2. Allergenitet

For å undersøke om transformasjonsprosessen kan ha ført til økning av endogene allergener i soyabønner fra 305423 i forholdt til umodifiserte bønner ble det utført IgE immunoblotanalyse (SDS-PAGE) og ELISA-analyser med ekstrakter fra soya 305423- og soyabønner fra den kommersielle sorten 'Jack'. Forsøket ble utført med sera fra barn og voksne soya-allergikere. Pioneer hevder at hemming av ELISA reaksjonen viser den samme bindingsprofilen for soya 305423- og umodifisert soyabønne-ekstrakt. Fordøyelighetstest av GM-HRA viser at proteinet fordøyes raskt i simulert magesaft og tarmsaft. Proteinets 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. Det ble konkludert med at soya 305423 ikke er mer allergen enn den umodifiserte foreldrelinjen "Jack".

4.3. Ernæringsmessig vurdering av olje fra soya 305423

For at soyaolje fra umodifisert soya skal være egnet til industriell steking, for eksempel fritering av chips, må den herdes (hydrogeneres). Ved herdingsprosessen dannes det transfettsyrer. Transfettsyrer dannes også ved oppheting til høye temperaturer. En økning av innholdet av oljesyre i soyaolje fører til økning i varm- og oksidasjonsstabilitet i forhold til vanlig soyaolje.

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

4.4. Delkonklusjon

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

5. Miljørisikovurdering

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

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

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

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

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

Spredning av soya til andre habitater i Europa er i hovedsak begrenset av manglende frøkvile, liten toleranse for lave temperaturer og dårlig konkurransevne. Det er ikke påvist forskjeller mellom soyalinje 356043 og konvensjonelle sorter med tilsvarende genetisk bakgrunn for disse karakterene, og det er ikke grunn til å anta at de introduserte egenskapene vil medføre økt fitness utenfor dyrkingsmiljø i forhold til ikke-transgene sorter av soya.

5.2. Potensiale for genoverføring

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

2.1.1. Horisontal genoverføring

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

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

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

2.1.2. Vertikal genoverføring

Soya dyrkes ikke i Norge, og arten har ikke viltvoksende populasjoner eller nærstående arter utenfor dyrking i Europa. Utisiktet frøspredning i forbindelse med transport, handtering 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.

Potensialet for krysspollinering mellom 305423 og konvensjonelt foredlete soyasorter i dyrkingsområder for soya i Europa vil avhenge av utisiktet frøspredning i forbindelse med transport, handtering og prosessering. Det er imidlertid lite sannsynlig at sporadiske enkeltplanter vil spre signifikante mengder pollen til konvensjonelle dyrkingsfelt, og risiko for utkryssing med dyrkede sorter vurderes derfor til å være ubetydelig. Herbicidtoleranse vil ikke representere noen selektiv fordel for spredning av soya i Europa.

5.3. Miljøovervåkingsplan

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/NL/2007/45 omfatter ikke dyrking, og potensiell miljøeksponering av den transgene soyalinjen 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 mais representere en mulig kilde til uønsket genspredning. Miljørisikovurderingen som er presentert av søker identifiserer ingen endret risiko for miljø i forhold til annen soya. Pioneer har derfor ikke utarbeidet spesifikke strategier for risikohandtering eller en særskilt plan for overvåking av denne eventen.

Tatt i betraktning tiltenkt bruksområde for 305423 anser Faggruppe for GMO at det ikke er behov for å iverksette særskilt program for overvåking av soyalinjen.

5.4. Delkonklusjon

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

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

6. Vurdering av søkers dokumentasjon

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

I forbindelse med den påviste ustabiliteten av *gm-hra* ekspresjonskassetten har Faggruppe for genmodifiserte organismer lagt inn følgende spørsmål til Pioneer på EFSA-nett:

”The applicant has demonstrated instability in the genome of 305423 soy as a single plant has been found to be gm-hra negative. This particular plant may have undergone recombination between two repeated KTi3 promoter elements resulting in the removal of the entire gm-hra cassette and portions of the KTi3 promoter elements flanking this cassette. Although the frequency of this genetic recombination seems to be low in line 305423, the GMO Panel of the Norwegian Scientific Committee for Food would like to ask the applicant to address this topic further and discuss the probability of other genetic recombination events taking place which, in turn, may have negative effects.”

Faggruppen påpeker også kunnskapshull knyttet til redusert nivå av trypsinhemmer.

KONKLUSJON

Det er funnet statistiske forskjeller i enkeltparametere. Soya 305423 er modifisert for høyt innhold av fettsyren oljesyre, noe som fører til forholdsvis lavt innhold av fettsyren linolsyre og redusert mengde linolensyre. Verdiene for de fleste andre enkelte analyserte komponentene ligger innenfor typiske verdier for andre soyasorter som er rapportert i litteraturen. Faggruppen mener at endringen i fettsyreprofil medfører en matolje med betydelig endret næringsverdi. Faggruppen anser at disse forskjellene ikke har noen negativ helsemessig konsekvens.

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

Søknaden gjelder godkjenning av soyalinjen 305423 for import, prosessering og til bruk i næringsmidler og fôrvarer. Faggruppen har derfor ikke vurdert mulige miljøeffekter knyttet til dyrking av soyalinjen. Det er ingen indikasjoner på økt sannsynlighet for spredning, etablering og invasjon av soyalinjen i naturlige habitater eller andre arealer utenfor jordbruksområder som resultat av frøspill i forbindelse med transport og prosessering. Soya dyrkes ikke i Norge, og arten har ikke viltvoksende populasjoner eller nærstående arter utenfor dyrking i Europa. Det er derfor ikke risiko for utkryssing med dyrkede sorter eller ville planter i Norge.

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

Samlet vurdering

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

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

REFERANSER

- Alexander, J., Frøyland, L., Hemre G-I, Koster Jacobsen, B., Lund, E., Meltzer, H.M. & Utne Skåre, J. (2006). *Et helhetssyn på fisk og annen sjømat i norsk kosthold*. VKM rapport.
- Bensasson, D., Boore, J. L. & Nielsen, K. M. (2004). Genes without frontiers. *Heredity*, **92**, 483-489.
- de Vries, J. & Wackernagel, W. (2002). Integration of foreign DNA during natural transformation of *Acinetobacter* sp. by homology-facilitated illegitimate recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**(4), 2094-2099.
- EFSA (2004a). Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on the use of antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified plants. *The EFSA Journal*, **48**, 1-18. http://www.efsa.europa.eu/en/science/gmo/gmo_opinions/384.html
- EFSA (2004 b). Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission related to the presence of trans fatty acids in foods and the effect on human health of the consumption of trans fatty acids. *The EFSA Journal*, **81**, 1-49.
- EFSA (2006). *Guidance document of the scientific panel on genetically organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed*. ISBN: 92-9199-019-1. European Food Safety Authority, Parma, Italy. 100 p. http://www.efsa.europa.eu/en/science/gmo/gmo_guidance/660.html
- EPA-FIFRA(1989). US Environmental Protection Agency, Title 40 CFR, Part 160-Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act (FIFRA); Good Laboratory Practice Standards, Final Rule.
- FAOSTAT (2006). <http://faostat.fao.org>
- Lid J. & Lid D.T. (2005). Norsk flora. Det Norske Samlaget, Oslo. 7. utgave. 1230 s. ISBN: 82-521-6029-8.
- Lu, B.R. (2005). Multidirectional gene flow among wild, weedy and cultivated soybeans. *In: (Gressel J ed.): Crop Fertility and Volunteerism*. CRC- Taylor and Friends (Boca Raton): 137-147.
- Netherwood, T., Martín-Orúe, S.M., O'Donnell, A.G., Gockling, S., Graham, J., Mathers, J.C. & Gilbert, H.J. (2004). Assessing the survival of transgenic plant DNA in the human gastrointestinal tract. *Naure Biotechnology*, **22**, 204-209.
- Nielsen, K.M., van Elsas, J.D. & Smalla, K. (2000). Transformation of *Acinetobacter* sp. 13(pFG4deltanptII) with transgenic plant DNA in soil microcosms and effects of kanamycin on selection of transformants. *Applied Environmental Microbiology*, **66**, 1237-42.
- Nielsen K. (2003). An assessment of factors affecting the likelihood of horizontal transfer of recombinant plant DNA to bacterial recipients in the soil and rhizosphere. *Collection of Biosafety Reviews (Italy)*, Vol. 1. pp. 96-149.
- OECD (1998). OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice AND Compliance Monitoring, Number 1. OECD Principles on Good Laboratory Practice (revised 1997) ENV/MC/CHEM (98)17.
- OECD (2000). Consensus Document on the Biology of *Glycine max* (L.) Merr. (Soybean). *Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology, Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No.15 document, ENV/JM/MONO (2000)9*.

[http://www.olis.oecd.org/olis/2000doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono\(2000\)9](http://www.olis.oecd.org/olis/2000doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2000)9)

OECD (2001). Consensus Document on Compositional Consideration for New Varieties of Soybean: Key Food and Feed Nutrients and Anti-nutrients. *Series of Safety of Novel Foods and Feeds No. 2 document, ENV/JM/MONO (2001)15*. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

[http://www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono\(2001\)15](http://www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2001)15)

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.

VKM (2005). *Report from an Ad Hoc Group appointed by the Norwegian Scientific Panel on Genetically Modified Organisms and Panel on Biological Hazards – An assessment on potentially long-term health effects caused by antibiotic resistance marker genes in genetically modified organisms based on antibiotic usage and resistance patterns in Norway*. Opinion 05/302-1-final. Norwegian Scientific Committee for Food Safety, Oslo, Norway 62 p.