



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

**16.2.09**

**Helse- og miljørisikovurdering av genmodifisert  
bomullshybrid MON 88913 x MON 15985 fra Monsanto  
(EFSA/GMO/UK/2007/42)**

## **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, Vibeke Thrane, Rose Vikse.

### Koordinatorer fra sekretariatet:

Arne Mikalsen, Merethe Aasmo Finne

## SAMMENDRAG

Helse- og miljørisikovurderingen av den insektsresistente og herbicidtolerante bomullshybriden MON 88913 x MON 15985 fra Monsanto (EFSA/GMO/UK/2007/42) 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 88913 x MON 15985 til import og prosessering, og til bruk i næringsmidler og fôrvarer. Søknaden gjelder ikke dyrking eller bruk av hele bomullsfrø som mat.

Risikovurdering av den genmodifiserte bomullen er basert på dokumentasjon som er gjort tilgjengelig på EFSA's nettside GMO EFSA-net. I tillegg er det benyttet informasjon fra uavhengige vitenskapelige publikasjoner i vurderingen. MON 88913 x MON 15985 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 EFSA's retningslinjer for risikovurdering av genmodifiserte planter (EFSA 2006a) og Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD)s konsensusdokument for bomull (OECD 2004) lagt til grunn for vurderingen.

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 ikke tilsiktede effekter på fitness, genoverføring og effekter på målorganismer og ikke-målorganismer vurdert.

Bomullslinjen MON88913 x MON 15985 er resultat av konvensjonell krysning mellom de transgene bomullslinjene MON 88913 og MON 15895.

Foreldrelinje MON 88913 er fremkommet ved *Agrobacterium*-mediert transformasjon av hypocotylvev fra den kommersielle bomullssorten 'Coker 312'. MON 88913 uttrykker CP4-EPSPS-protein, som er resultat av introduksjon av *cp4-epsps*-genet fra jordbakterien *Agrobacterium tumefaciens*. 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. I motsetning til plantens enzym er det bakterielle enzymet også aktivt ved nærvær av N-fosfonometyl glycin (glyfosat). De transgene plantene vil derfor tolerere høyere doser av herbicider med virkestoff glyfosat sammenlignet med konkurrerende ugras.

Foreldrelinjen 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  $\delta$ -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').  $\beta$ -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.

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

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. Faggruppen anser imidlertid analysene for å være tilstrekkelige for en vurdering av MON 88913 x MON 15985 til bruk som mat og fôr.

Det er funnet statistisk signifikante forskjeller for enkelte komponenter som er analyserte. Forskjellene er imidlertid ikke konsistente over forsøksfelt, og verdiene ligger innenfor variasjonsområdet for de umodifiserte referansesortene som inngikk i studien, og innenfor typiske verdier for andre bomullssorter som er rapportert i litteraturen

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 et allergen.

*Faggruppe for genmodifiserte organismer konkluderer med at bomullsfrøolje fra MON 88913 x MON 15985 er vesentlig lik olje fra umodifisert bomull, og finner ikke at oljen fra hybridlinjen utgjør noen større helserisiko enn kommersiell olje fra umodifiserte bomullsplanter.*

De innsatte antibiotikaresistensmarkørgenene (ARMG) *nptII* og *aadA* koder for resistens mot enkelte aminoglykosider som benyttes i norsk landbruk (VKM 2005). 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 88913 x MON 15985 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 88913 x MON 15985 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- genen 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- genen 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 bomullshybriden MON 88913 x MON 15985 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 bomullshybriden. 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 88913 x MON15985, herbicidtoleranse, CP4-EPSPS-protein, insektsresistens, Cry1Ac, Cry2Ab2, antibiotikaresistensmarkørgen, *nptII*-gen, *aadA*-gen, helsemessig trygghet, helse, miljø, forordning 1829/2003/EF

## INNHALDSFORTEGNELSE

BIDRAGSYTERE .....	2
Vurdert av.....	2
SAMMENDRAG.....	3
NØKKEWORD.....	5
INNHALDSFORTEGNELSE.....	6
BAKGRUNN .....	7
OPPDRAK FRA DIREKTORATET FOR NATURFORVALTING OG MATTILSYNET .....	7
RISIKOVURDERING .....	8
1. Innledning.....	8
1.1. Beskrivelse av egenskap(er) og virkningsmekanismer .....	8
2. Molekylær karakterisering .....	9
2.1. Evaluering av foreldrelinjer .....	9
2.2. Hybriden MON 88913 x MON 15985 .....	14
3. Komparative analyser.....	15
3.1. Valg av komparator og forsøksdesign.....	16
3.2. Analyser av ernæringsmessige komponenter .....	17
3.3. Agronomiske egenskaper .....	18
3.4. Delkonklusjon .....	19
4. Dokumentasjon av toksisitet og allergenisitet.....	19
4.1. Toksisitet .....	19
4.2. Allergenisitet .....	19
4.3. Delkonklusjon .....	20
5. Miljøriskovurdering .....	20
5.1. Potensiale for ikke intenderte effekter på fitness relatert til genmodifiseringen.....	20
5.2. Potensiale for genoverføring .....	21
5.4. Potensiale for samspill mellom GMP og ikke-målorganismer .....	22
5.5. Potensiale for samspill med abiotisk miljø og eventuelle effekter på biogeokjemiske prosesser .....	23
5.6. Overvåking .....	23
5.7. Delkonklusjon .....	23
6. Vurdering av søkers dokumentasjon/kunnskapshull.....	24
KONKLUSJON .....	25
REFERANSER .....	27

## BAKGRUNN

Faggruppe for genmodifiserte organismer i Vitenskapskomiteen for mattrygghet (VKM) er bedt av Mattilsynet og Direktoratet for naturforvaltning om å foreta en vitenskapelig vurdering av helse- og miljørisiko ved en eventuell godkjenning av den genmodifiserte bomullshybriden MON 88913 x MON 15985 fra Monsanto Europe S.A. (EFSA/GMO/UK/2007/42). MON 88913 x MON 15985 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. I henhold til Monsanto omfatter søknaden bruksområdene import, prosessering, næringsmidler og fôrvarer, men omfatter ikke dyrking eller bruk av hele frø som mat.

Søknaden ble fremmet og anbefalt av britiske myndigheter i april 2007. Dokumentasjonen knyttet til søknaden ble lagt ut på EFSA-nett 16. januar 2008, med frist på 90-dager for innspill fra EU- og EØS/EFTA-landene. Norge har ikke tidligere uttalt seg om bomullslinjen MON 88913 x MON 15985.

Utenfor EU/EØS-området er MON 88913 x MON 15985 godkjent for dyrking i Australia og Sør-Afrika, og for omsetning som mat og/eller fôr i Japan, Korea, Mexico og Filippinene (Agbios 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/2007/42, genmodifisert bomullshybrid MON 88913 x MON 15985, ble lagt ut på EFSA-nett 16. april 2008. Faggruppe for genmodifiserte skal i tråd med oppdragsbrev utarbeide helse- og miljørisikovurdering av bomullshybriden til import og industriell prosessering, samt til bruk som næringsmiddel og fôrvare. Søknaden gjelder 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 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/ 2007/42, MON 88913 x MON 15985.

Unik kode: MON-88913-8 x MON-15985-7.

Status i EU: Søknad under forordning 1829/2003/EF. EFSAAs frist for innspill er 28.04.08.

Ønsket svarfrist til Mattilsynet/DN: 28. april 2008.

## RISIKOVURDERING

### 1. Innledning

Helse- og miljøvurderingen av den genmodifiserte bomullslinjen MON 88913 x MON 15985 er basert på dokumentasjon som er gjort tilgjengelig på EFSAAs nettside GMO EFSAAnet. 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 utsettingsdirektiv 2001/18/EF med annekser lagt til grunn for vurderingen.

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

Hybriden MON 88913 x MON 15985 er dannet ved konvensjonell kryssing mellom innavlede linjer, avledet av de genmodifiserte bomullslinjene MON 88913 og MON 15985.

Foreldrelinjen MON 88913 er fremkommet ved at hypocotylvev fra den kommersielle sorten 'Coker 312' er transformert ved hjelp av *Agrobacterium*-mediert transformering. MON 88913 har fått satt inn et rekombinant DNA-fragment med to ekspresjonskassetter. Ekspresjonskassetene inneholder *cp4-epsps*-genet fra jordbakterien *Agrobacterium tumefaciens*. Genet koder for enzymet 5-enolpyruvylsikimat-3-fosfatsyntetase (CP4-EPSP), som omdanner fosfoenolpyruvat og sikimat-3-fosfat til 5-enolpyruvylsikimat-3-fosfat, en viktig metabolitt i syntesen av aromatiske aminosyrer. I motsetning til plantens enzym er det bakterielle enzymet også aktivt ved nærvær av N-fosfonometylglucin (glyfosat). De transgene plantene vil derfor tolerere høyere doser av herbicider med virkestoff glyfosat sammenlignet med konkurrerende ugras. Ved å sette inn to ekspresjonskassetter økes uttrykket av CP4-EPSP-enzymet i bladvev. I følge søker har MON 88913 fått økt toleranse for glyfosat under den kritiske reproduksjonsfasen, samt at det blir større fleksibilitet mht sprøyting på senere utviklingsstadier.

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. *kurstaki*, og koder for  $\delta$ -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').  $\beta$ -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.

## 2. Molekylær karakterisering

### 2.1. Evaluering av foreldrelinjer

#### 2.1.1. Foreldrelinje MON 88913

##### *Transformasjonssystem og vektorkonstruksjon*

I henhold til søkers dokumentasjon er bomullslinjen MON 88913 fremkommet ved *Agrobacterium*-mediert transformasjon av planteceller fra den kommersielle bomullssorten 'Coker 312'. *Cp4-epsps*-genet fra bakterien *A. tumefaciens* stamme CP4, ble klonet inn i plasmidet PV-GHGT35. Den binære vektoren PV-GHGT35 inneholder venstre og høyre grense T-DNA sekvenser. T-DNA området inneholder to tandem *cp4 epsp*-ekspresjonskassetter som ble overført til bomullens genom av *Agrobacterium tumefaciens* under *in vitro* transformasjonsprosess. Det rekombinante DNA-fragmentet er på 8512 basepar.

##### *Karakterisering av geninnsettingen og genkonstruksjonen*

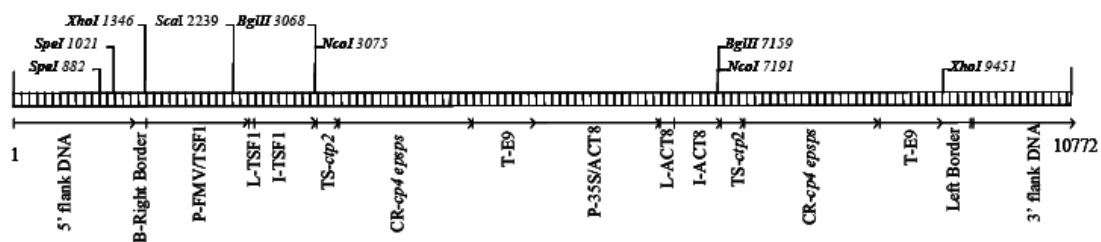
Southern blot og PCR har blitt brukt til karakterisering av det rekombinante DNA-fragmentet i planten. Molekylærbiologisk karakterisering viser at det er satt inn bare en kopi av det rekombinante DNA-fragmentet i bomullens genom. Dette fragmentet inneholder følgende ekspresjonskassetter:

##### *cp4 epsps*-ekspresjonskasset 1:

- |    |                     |  |
|----|---------------------|--|
| a) | <i>P-FMV/Tsf1</i>   | kimær promoter, bestående av 35S promoter fra brunrot mosaikkvirus og promoter til <i>Tsf1</i> genet fra <i>Arabidopsis thaliana</i> , |
| b) | <i>L-Tsf1</i>       | ledersekvens fra exon 1 til <i>Tsf1</i> genet, stammer fra <i>Arabidopsis thaliana</i> .   |
| c) | <i>I-Tsf1</i>       | intron til <i>Tsf1</i> genet, stammer fra <i>Arabidopsis thaliana</i>  |
| d) | <i>TS-cpt2</i>      | DNA sekvens som koder for et optimalisert kloroplastoverføringspeptid, stammer fra <i>Arabidopsis thaliana</i>                         |
| e) | <i>CS-cp4 epsps</i> | <i>cp4-epsps</i> gen fra <i>Agrobacterium</i> stamme CP4   |
| f) | <i>T-e9 3' –</i>    | terminatorsekvens til <i>ribulose-1,5-difosfatkarboksylase</i> genet, stammer fra ert ( <i>Pisum sativum</i> )                         |

##### *cp4 epsps* – ekspresjonskasset 2:

- |    |                     |   |
|----|---------------------|---|
| a) | <i>P-35s/act8</i>   | kimær promoter fra blomkålmosaikkvirus (CaMV) kombinert med promoter fra <i>act8</i> genet, stammer fra <i>Arabidopsis thaliana</i> |
| b) | <i>L-act8</i>       | Ledersekvens fra <i>act8</i> genet som stammer fra <i>Arabidopsis thaliana</i>  |
| c) | <i>I-act8</i>       | Intron og flankerende exonsekvens fra <i>act8</i> genet som stammer fra <i>Arabidopsis thaliana</i>                                 |
| d) | <i>TS-cpt2</i>      | DNA sekvens som koder for et optimalisert kloroplastoverføringspeptid, stammer fra <i>Arabidopsis thaliana</i>                      |
| e) | <i>CS-cp4 epsps</i> | <i>cp4-epsps</i> gen fra <i>Agrobacterium</i> stamme CP4  |
| f) | <i>T-e9 3'</i>      | terminatorsekvens til <i>ribulose-1,5-difosfatkarboksylase</i> genet, som stammer fra ert ( <i>Pisum sativum</i> )                  |



Figur 1. Rekombinant DNA-fragment i bomullens genom.

Molekylærbiologiske analyser viser at det rekombinante fragmentet på ca. 10 kb i planten inneholder de samme gener og genelementer som er på det tilsvarende fragmentet i plasmidet PV- GHGT35. CP4 EPSPS proteinet som uttrykkes i bomullsblad og -frø er undersøkt ved hjelp av Western-blot analyse og densitometri, SDS-PAGE og densitometri, MALDITOF massespektrometri og N-ende sekvensanalyse, samt glykosyleringsanalyse og CP4-EPSPS enzymaktivitets analyse. Analysene viser at CP4 proteinet er strukturelt og funksjonelt likt det *E. coli*-produserte proteinet. Det ble ikke påvist glykoliserings seter på proteinene. Genene på det rekombinante DNA-fragmentet i MON 88017 uttrykker CP4 EPSPS-protein som er identisk med proteinet som uttrykkes i jordbakterien *Agrobacterium* stamme CP4. PCR- og sekvenseringsanalyser av det rekombinante DNA fragmentet i MON 88913 viser at fragmentet er på 8512 nukleotider (bp). Det er foretatt sekvenseringsanalyser av flankesekvensene til det rekombinante DNA fragmentet, 1231 bp oppstrøms fra 5'-flanke-enden til fragmentet og 1029 bp nedstrøms fra 3'-flanke-enden til innskuddet.

#### Informasjon vedrørende uttrykk av innsatte gener og åpne leserammer (ORF)

Monsanto viser til at konsentrasjonen av CP4-EPSPS-protein er målt i prøver fra feltforsøk på fire lokaliteter i USA i 2002 og Australia vekstsesongen 2003-2004. Det ble tatt ut fire prøver fra hvert felt. I de amerikanske forsøkene ble konsentrasjonen av CP4-EPSPS-protein i blad (OSL2) og frø målt til henholdsvis  $170 \pm 44$   $\mu\text{g/g}$  råvekt (variasjonsbredde = 63 - 260) og  $310 \pm 110$   $\mu\text{g/g}$  råvekt (variasjonsbredde = 67 - 550). Tilsvarende ble proteinmengden målt til henholdsvis  $250 \pm 44$   $\mu\text{g/g}$  råvekt (variasjonsbredde = 140 - 330) og  $280 \pm 30$   $\mu\text{g/g}$  råvekt (variasjonsbredde = 230 - 340) i Australia. Til sammenligning er nivået av CP4-EPSPS-enzym i bladvev fra andre genmodifiserte bomullssorter (MON 1445, MON 531 x MON 1445, MON 15905 x MON 1445) som inneholder en ekspressjonskasset, målt til mellom 26 – 90  $\mu\text{g/g}$  råvekt.

Det gjort studier for å påvise åpne leserammer ved *cp4 epsps*-innskuddet. Det er listet opp 12 antatte åpne leserammer. Seks åpne leserammer, 3 oppstrøms og 3 nedstrøms, fra 5' - og 6 åpne leserammer, 3 oppstrøms og 3 nedstrøms, fra 3' enden av det rekombinante innskuddet. Fra 5' enden er det påvist tre åpne leserammer som teoretisk fører til avskrivning av tilstrekkelig lange polypeptider (80 aminosyrer) fra stoppkodon til stoppkodon. Fra 3' er det påvist 6 åpne leserammer som teoretisk fører til tilstrekkelige lange polypeptider fra stoppkodon til stoppkodon. Homologi til de 9 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 8 aminosyrer og med 7 aminosyrer relativt til det foregående vinduet (Codex 2003). Det ble påvist 3 antatt homologier til forskjellige proteiner. Ingen av disse 9 teoretiske polypeptidene ble av Monsanto karakterisert å ha strukturell relevant homologier til kjente allergener, toksiner eller farmakologisk aktive proteiner.

#### Nedarving og stabilitet av innsatt DNA

Genetisk og fenotypisk stabilitet er vist ved Southern analyse og spaltingsdata innen og over generasjoner. Fenotypiske spaltingsdata fra innavl av fire ulike generasjoner er i overensstemmelse

med forventede spaltingstall. I følge søker viser også resultater fra Southern analyse at det rekombinante DNA-fragmentet er stabilt inkorporert i genomet.

#### *Delkonklusjon*

Molekylærbiologiske analyser viser at ett rekombinant fragment på ca. 10 kbp er satt inn i planten. Dette fragmentet inneholder de samme gener og genelementer som er på det tilsvarende fragmentet i bakteriens plasmid. Genene på det rekombinante DNA-fragmentet i MON 88913 uttrykker CP4-EPSPS-protein som er identisk med proteinet som uttrykkes i bakterien. Stabiliteten på det rekombinante DNA fragmentet er vist over mer enn 5 generasjoner. Faggruppen konkluderer med at karakteriseringen av det rekombinante innskuddet i MON 88913 er tilfredsstillende. Faggruppen setter imidlertid spørsmålsteget ved stabiliteten til det store (10 kbp) rekombinante DNA-fragmentet.

### 2.1.2. Foreldrelinje MON 15985

#### 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 2). I henhold til dokumentasjonen fra Monsanto inneholder fragmentet to ikke-funksjonelle genelementer.

#### CryIAC-ekspresjonskassetten:

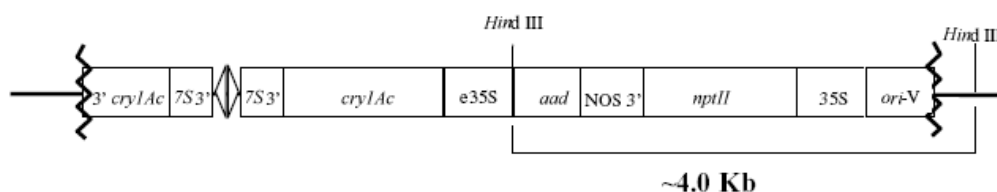
- a) *e35s* promoter fra blomkålmosaikkvirus med forsterker(CaMV),
- b) *cryIAC* et modifisert *cryIAC*-gen som finnes i én kopi i genomet. *CryIAC*-genet stammer fra jordbakterien *Bacillus thuringiensis*.
- c) 7S3' terminatorsekvens fra soya

#### 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 2. 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 molekylærbiologiske 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.

## 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 adenyllyltransferase (*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 glukuronidet til et blått pigment. Pigmentet virker som en visuell seleksjonsmarkør av celler som har tatt opp det rekombinante fragmentet.

### *Karakterisering av geninnsettingen og genkonstruksjonen*

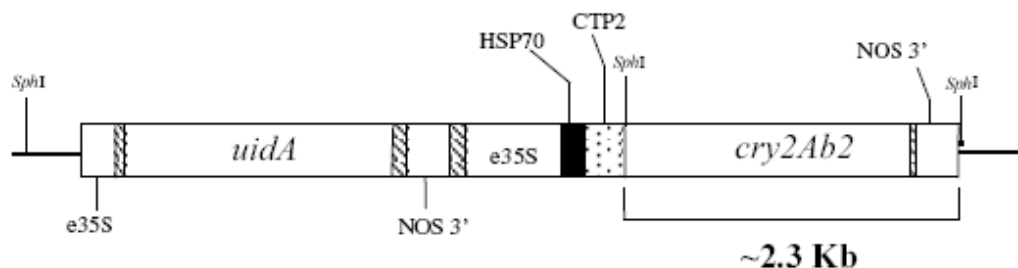
Det rekombinante fragmentet MON 15947 inneholder følgende genelementer (se figur 2).

#### *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 3. 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 i 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 søknad EFSA/GMO/UK/2008/58, og referert i faggruppens risikovurdering av bomullshybriden MON 15985 x MON 1445 (VKM 2008).

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. Forsøksfeltene ble lagt ut på åtte lokaliteter i form av fullstendig randomisert blokkdesign med fire gjentak. Forsøksrutene bestod av testlinjen MON 15985, den umodifiserte kontrollsorten DP50, og den transgene kontrollinjen MON 531. Det ble tatt prøver av blad og frø fra 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)<sup>1</sup>,  $3,35 \pm 0,63 \mu\text{g/g}$  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 (LOQ<sup>2</sup> <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.

<sup>1</sup> Variasjonsområde

<sup>2</sup> LOQ = limit of quantitation

<sup>3</sup> 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 R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> og R<sub>4</sub>, i tillegg til to generasjonslinjer med tilbakekryssing (BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub>). 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 spaltingstall 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. Hybriden MON 88913 x MON 15985**

#### *Molekylær karakterisering*

MON 88913 x MON 15985 er dannet ved konvensjonell kryssing mellom bomullslinjene MON 88913 og MON 15985. MON 88913 x MON 15985 inneholder tre forskjellige innskudd, et arvet fra MON 88913 og to arvet fra MON 15985. Molekylærbiologiske analyser viser at de rekombinante fragmentene i planten inneholder de samme gener og genelementer som er i foreldrelinjene MON 88913 og MON 15985. Både CP4 EPSPS-, Cry1Ac- og Cry2Ab2-ekspresjonskassetene er undersøkt med Southern-blot analyse. Flankerende sekvenser til de rekombinante DNA-fragmentene i MON 88913 x MON 15985 er ikke sekvensert. Siden MON 88913 x MON 15985 er fremkommet ved konvensjonell kryssing mellom MON 88913 og MON 15985 hevder Monsanto at sekvensene i og rundt de respektive fragmentene er uendret. Monsanto har lagt ved dokumentasjon over analyser av åpne leserammer for både MON 88913 og MON 15985. Det er ikke vist at innsettingen av de rekombinante fragmentene har medført nye åpne leserammer.

Analyser dokumentert i søknad for MON 88913 av enzymaktivitet til CP4 EPSPS-proteinet viser ingen forskjell mellom plante- og bakterieprodusert protein. Fordøyelighetstester har også vist at CP4 EPSPS-proteinet fordøyes raskt i simulert mage- og tarmsaft. Videre har fordøyelighetstester dokumentert i søknadene for MON 15985 viser at Cry1Ac- og Cry2Ab2-proteinene fordøyes raskt i

simulert magesaft. Cry1Ac- og Cry2Ab2- proteinene består av en proteaseresistent og en proteasefordøyelig del. I insektarmen vil den proteasefordøyelige delen spaltes til aminosyrer, mens den resistente delen ikke blir fordøyd. I simulert tarmsaft fra mennesker fordøyes fullengdeproteinene raskt. Den proteaseresistente delen av proteinene er etter 24 timer spaltet i minst 3 biter.

#### *Informasjon vedr. uttrykk av introduserte gener*

Søker opplyser om at uttrykk av proteinene Cry1Ac, Cry2Ab2, CP4 EPSPS, NPTII og GUS ble målt i feltforsøk i USA i 2004. Forsøkene ble lagt ut på 4 ulike lokaliteter i form av fullstendig randomiserte blokkdesign med 3 gjentak. To typer positiv kontroll ble benyttet a) MON 88913 x MON 15985(-) som kun produserer CP4 EPSPS-protein, og b) MON 88913(-) x MON 15985(+) som produserer Cry1Ac, Cry2Ab2, NPTII og GUS. Negativ kontroll var MON 88913(-) x MON 15985(-). Det ble foretatt analyser av prøver fra blad og frø. I følge dokumentasjon fra søker var nivåene av målte proteinprodukter i vegetativt vev og frø i overensstemmelse med variasjonsområdene for de respektive foreldrelinjene. Nivået av Cry1Ac-protein i blad og frø ble målt til henholdsvis  $14 \pm 5,9$   $\mu\text{g/g}$  tørrvekt (TV) (variasjonsområde 4,6-25 og  $1,8 \pm 0,3$   $\mu\text{g/g}$  TV (1,3-2,2) i gjennomsnitt over forsøkssteder. Tilsvarende viste analysene av Cry2Ab2  $150 \pm 65$   $\mu\text{g/g}$  TV (91-310) og  $270 \pm 24$   $\mu\text{g/g}$  TV (240-300), av CP4 EPSPS  $1700 \pm 360$   $\mu\text{g/g}$  TV (1400-2400) og  $310 \pm 35$   $\mu\text{g/g}$  TV (260-390). Konsentrasjonen av NPTII var lavere enn påvisningsgrensen (<LEP) i blad og  $3,4 \pm 0,56$   $\mu\text{g/g}$  TV (<LEP-4,2) i frø, mens tilsvarende verdier av GUS ble målt til henholdsvis  $1400 \pm 250$   $\mu\text{g/g}$  TV (1100-1800) og  $130 \pm 21$   $\mu\text{g/g}$  TV (90-160).

#### *Nedarving og stabilitet av innsatt DNA*

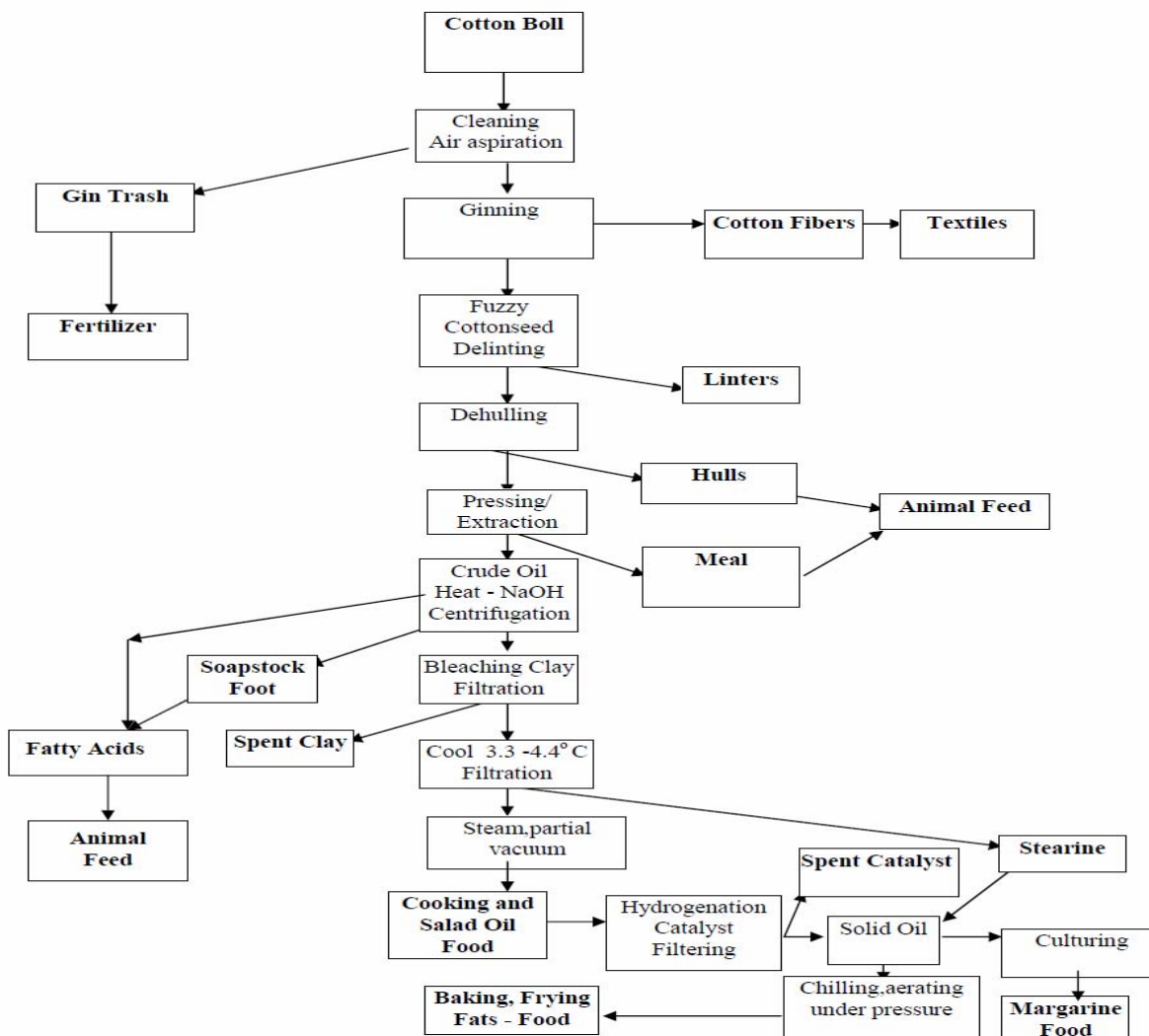
Søker viser til spaltingsdata fra kryssinger over flere generasjoner med foreldrelinjene MON 88913 og MON 15985 og resultater fra en kryssingsgenerasjon med hybridene for å demonstrere genetisk stabilitet. Videre viser Southern analyser av de rekombinante innskuddene i MON 89034 x MON 88017-genomet at det er molekylær ekvivalens og identisk kopitall med de rekombinante DNA-innskuddene i foreldrelinjene.

#### *Delkonklusjon*

Hybriden MON 88913 x MON 15985 er dannet ved konvensjonell kryssing mellom bomullslinjene MON 88913 og MON 15985. 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.

### **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

Søker opplyser at det er foretatt analyser av ernæringsmessige viktige komponenter av prøver fra MON 88913 x MON 15985 dyrket i felt i USA vekstsesongen 2004. Forsøksfeltene ble lagt ut på fire lokaliteter i sentrale dyrkingsområder for bomull i USA (Georgia, Mississippi, New Mexico og Texas). Dyrkingsområdene representerer forskjellige vekstmiljø for bomull. Hvert forsøksfelt bestod av et fullstendig randomisert blokkdesign med 3 gjentak. Fire umodifiserte, kommersielle bomullssorter ble benyttet som referansmateriale i hvert av forsøkene, dvs. totalt 11 referansesorter. I tillegg ble det benyttet en ikke-transgen bomullslinje (MON 88913(-) x MON 15985(-)) som kontrollsort. MON 88913(-) x MON 15985(-) har tilnærmet samme genetiske bakgrunn som den transgene linjen, men inneholder ikke T-DNA innskuddet, og uttrykker dermed ikke Cry-proteinene, CP4-EPSPS, NPTII og GUS. MON 88913(-) x MON 15985(-) ble selektert fra spaltingspopulasjonen etter selvbestøvning av den opprinnelige hemizygot plante (R<sub>0</sub>). De selekterte genotypene ble videre innavlet i to til tre generasjoner før de ble satt ut i feltforsøk. Alle blokkene ble behandlet med glyfosat. Dette er ikke i tråd med EFSA's retningslinjer, der forsøk med herbicidresistente planter skal inkludere både behandling med og uten det aktuelle herbicidet.



#### *Kommentar til Monsanto's kontrollhybrid.*

EFSA skriver om den planten som GM-plante skal sammenlignes med:

#### Choice of the comparator:

*In the case of vegetatively propagated crops, comparative analyses should include the non-genetically modified isogenic variety used to generate the transgenic lines. In the case of crops that reproduce sexually, comparators would include appropriate non-GM lines of comparable genetic background. Since many crops used to produce food and feed are developed using back-crossing, it is important that in such cases, tests for morphological, agronomical and chemical similarity use the most appropriate controls and do not simply rely on comparisons with the non-genetically modified material originally used for the genetic modification. For example, non-GM parental lines may be used in crosses to generate the final product.*

OECD-dokumentet sier "widely accepted conventional counterparts". I bomullsdokumentet står det: Measurement data from the new variety should ideally be compared to those obtained from the near isogenic non-modified variety. FG3 mener at ved å benytte foreldrelinjene som komparator ville dette ha styrket dokumentasjonen betydelig.

#### *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*

Monsanto hevder at valget av analyseparametere er i henhold til aksepterte internasjonale standarder og henviser til OECDs konsensusdokument for bomull (OECD 2004). Etter faggruppens vurdering er valget av analyseparametere gjort i henhold til anbefalingene i konsensusdokumentet. Det er foretatt i alt 69 forskjellige analyser av hovedkomponenter i frø. For 17 av disse var 50 % av observasjonene lavere enn påvisningsgrensen og ble derfor ekskludert fra de statistiske analysene. Det ble analysert for innhold av parametrene 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), samt aflatoksinene B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> og G<sub>2</sub>. Analysene ble utført under god laboratoriepraksis (GLP). Resultatene fra feltforsøket i 2004 viser 49 statistisk signifikante forskjeller av 260 sammenligninger. For alle analyserte komponenter ligger verdiene innenfor 99 % toleranseintervall til de kommersielle referansesortene som ble benyttet i denne studien.

#### *Fettsyresammensetning i bomullsfrø*

Fettsyresammensetningen i frø er analysert i henhold til OECDs konsensusdokument for bomull. I henhold til søkers dokumentasjon ble det analysert for innhold av totalt 22 ulike fettsyrer. 12 av fettsyrene ble imidlertid fjernet fra de statistiske undersøkelsene fordi verdiene var under deteksjonsgrensen. Analyser over lokaliteter for vekstsesongen 2002 viser statistisk signifikante forskjeller mellom MON 88913 x MON 15985 og kontroll for myristin (14:0) (<15 %), stearin (<5 %) og oljesyre (<2 %). For de øvrige fettsyrene ble det ikke funnet signifikante forskjeller mellom testlinje og kontroll. Verdiene for samtlige fettsyrer ligger innenfor typiske verdier for andre bomullssorter som er rapportert i litteraturen.

#### *Aminosyrer i bomullsfrø*

Søker viser til at det er foretatt analyser av både essensielle og ikke-essensielle aminosyrer. Aminosyreanalysene er utført i henhold til OECDs konsensdokumentet. Analyser over forsøksfelt viser signifikante forskjeller for alanin (< 3 %, høyere enn kontroll), arginin (<2 %, lavere enn kontroll), glutamin (<1,5 %, lavere enn kontroll), leusin (<1,5 %, høyere enn kontroll), lysin (<3 %, høyere enn kontroll og treonin (< 2 %, høyere enn kontroll). Verdien for alle aminosyrene ligger innenfor  $\pm 20$  %, og for alle aminosyrene ligger verdiene innenfor typiske verdier som er rapportert i litteraturen.

#### *Vitaminer*

I henhold til OECDs konsensdokument for bomull bør det undersøkes for innhold av vitamin E i olje. Det er funnet statistisk signifikante forskjeller for vitamin E (<10 %, høyere enn kontroll) i olje for alle feltforsøkene. Forskjellen ligger innenfor typiske verdier for andre bomullssorter som er rapportert i litteraturen.

#### *Mineraler*

Med unntak for selen, er mineralene som er målt i henhold til OECDs konsensdokument for bomull. Analyser over lokaliteter viser statistisk signifikante forskjeller for kobber (< 2 %, lavere enn kontroll) og natrium (ca. 30 %, høyere enn kontroll) i 2004. Forskjellen ligger innenfor typiske verdier for andre bomullssorter som er rapportert i litteraturen.

#### *Antiernæringsstoffer*

Det er ikke funnet statistisk signifikante forskjeller for innhold av fritt og total gossypol. Innholdet av syklopropenoidfettsyren dihydrosterulsyre er signifikant høyere i testlinjen sammenlignet med kontrollen (< 7 %). Verdiene ligger imidlertid innenfor typiske verdier for andre bomullssorter som er rapportert i litteraturen.

#### *Toksiner*

Det er ikke påvist innhold av aflatoksinene B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> og G<sub>2</sub> over påvisningsgrensen på 1 ppb.

#### *Analyse av protein og DNA i raffinert bomullsolje*

Monsanto henviser til tidligere analyser av raffinert bomullsolje for protein og DNA. Disse analysene viser at verken protein eller DNA kan påvises over påvisningsgrensene.

### **3.3. Agronomiske egenskaper**

Analyser av variasjon i morfologiske og agronomiske karakterer er basert på feltforsøk med bomullslinjen MON 88913 x MON 15985 i USA i 2004. I tillegg er karakterer knyttet til frøkvile og spireegenskaper testet ved hjelp av standardiserte spireanalyser. I vekstsesongen 2004 ble det gjennomført fenotypiske registreringer på fem lokaliteter i representative områder for bomullsdyrking i 5 ulike stater. Den ikke-transgene linjen MON 88913(-) x MON 15985(-), med tilnærmet samme genetiske bakgrunn som testlinjen, ble benyttet som kontrollsort i alle forsøkene (se kap. 3.1). Etter konvensjonelle kryssinger mellom MON 88913 og MON 15985 ble F1-avkom tilbakekrysset til den umodifiserte linjen 3 ganger, etterfulgt av selvbestøvning av BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> – planter. Test- og ikke transgene kontrollinjer (MON 88913(-) x MON 15985(-) ble identifisert vha PCR-analyser i den spaltende BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> – populasjonen. Det ble benyttet 4 umodifiserte, kommersielle bomullssorter som referansemateriale i hvert av forsøkene, totalt 11 sorter. Forsøksfeltene bestod av et fullstendig randomisert blokkdesign med 3 gjentak. Total 43 ulike fenotypiske karakterer ble evaluert i løpet av vekstsesongen 2004.

Monsanto opplyser at det er foretatt registreringer av egenskaper knyttet til reproduksjon, spredning, vekst og utvikling, morfologi, kvalitet (frø, fiber), sjukdoms- og insektsresistens, samt toleranse mot ulike abiotiske stressfaktorer. Det er foretatt statistiske analyser innen steder og kombinerte analyser

over steder for hver karakter. Statistiske analyser over steder viser signifikant ( $p \leq 0,05$ ) høyere frøavling hos testhybriden sammenlignet med kontrollen. Det ble også funnet signifikante forskjeller med hensyn på karakterene tidlighet (antall dager til 50 % blomstring) og antall nodier. Gjennomsnittsverdiene for disse karakterene ligger imidlertid innenfor variasjonsområdene for referansesortene.

### 3.4. Delkonklusjon

Analyser av ernæringsmessige komponenter viser signifikante forskjeller mellom den transgene bomullshybriden MON88913 x MON 15985 og kontroll i enkeltparametere. For de fleste komponentene er imidlertid forskjellene innenfor  $\pm 10$  %. Verdiene for de enkelte analyserte komponentene ligger også innenfor variasjonsområde for de umodifiserte referansesortene som inngikk i studien, og innenfor typiske verdier for andre bomullssorter som er rapportert i litteraturen. Faggruppen konkluderer med at de forskjellene som er påvist ikke har noen helsemessig betydning.

Resultatene fra undersøkelsene som presenteres av agronomiske karakterer viser, at med unntak av herbicidresistens og toleranse mot målorganismene, er det ingen, eller små forskjeller mellom testlinjen og kontrollsorter.

## 4. Dokumentasjon av toksisitet og allergenitet

### 4.1. Toksisitet

Søknaden inneholder ikke dokumentasjon på føringforsøk på pattedyr med renfremstilt CP4 EPSPS-protein. Monsanto hevder at dette ikke er nødvendig siden dokumentasjon over disse føringforsøkene finnes i andre av Monsanto's søknader. Monsanto grunngir dette med at det er vist at det nye proteinet i planten er likt *E. coli*-produsert protein, og er verken toksisk eller allergent.

#### *Føringforsøk på malle (*Ictalurus punctatus*)*

Det ble utført et 56 dagers føringforsøk med malle, 30 akvarier à 20 fisk. Føret bestod av 20 % røstet bomullsfrømel fra MON 88913x MON 15985, MON 88913(-) x MON 15985(-) og fire kommersielle bomullssorter. Det ble foretatt undersøkelser av protein, fett, vann og aske i fiskefilet. Det ble ikke påvist signifikante forskjeller i de undersøkte parametrene, og det ble ikke funnet forskjeller i overlevelse av fiskene. Monsanto konkluderer med at næringsverdien til mel fra genmodifisert MON 88913 x MON 15985 er lik mel fra umodifisert bomull.

#### *Subkronisk føringforsøk på rotter*

Søker har ikke utført 13 ukers føringforsøk på rotter.

### 4.2. Allergenitet

Det ble analysert for potensiell ekspresjon av peptider/proteiner som kan ha homologi til kjente allergener. Det ble påvist teoretisk 9 polypeptider som har strukturelle homologier til allergener, toksiner og farmakologisk aktive proteiner. Ingen av disse polypeptidene ble vist å ha strukturelle og immunologiske relevante homologier til kjente allergener. CP4-EPSPS-proteinene er analysert for potensiell homologi til kjente allergener. Det er 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 var 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 er trolig  $\geq 50$  % aminosyreidentitet mellom proteinene (Aalberse 2000). I de fleste tilfeller kreves det større enn 70 % identitet for kryssreaktivitet. CP4 EPSPS er testet

i simulert magesaft. Proteinet degraderes fullstendig i løpet av 15 sekunder. Generelt er allergene proteiner stabile i simulert magesaft lenger enn 2 minutter. Størsteparten av allergene proteiner er vanligvis stabile i minst 60 minutter.

#### *Cry-proteiner*

Proteiner kan generelt ikke påvises i bomullsolje. Det er derfor lite sannsynlig at matolje fra MON 88913 x MON 15985 utgjør en fare for adjuvanseffekter hos mennesker og dyr.

### **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 bomullslinjen MON 88913 x MON 15985 under forordning 1829/2003/EF omfatter bruksområdene næringsmidler, fôrvarer, import og prosessering. Søknaden gjelder ikke dyrking. Miljørisikovurderingen av MON 88913 x MON 15985 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 bomullsførere representere en mulig kilde til uønsket genspredning.

### **5.1. Potensiale for ikke intenderte 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 reproducere.

Spredning av bomull til andre habitater i Europa er i hovedsak begrenset av manglende frøkvile og liten toleranse for lave temperaturer. Det er ikke påvist forskjeller mellom den transgene bomullslinjen MON 88913 x MON 15985 og konvensjonelle sorter med tilsvarende genetisk bakgrunn for disse

karakterene, og det er ikke grunn til å anta at den introduserte egenskapen vil medføre økt fitness utenfor dyrkingsmiljø i forhold til ikke-transgene sorter av bomull.

## 5.2. Potensiale for genoverføring

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

### 5.2.1. Horisontal genoverføring

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

Ut fra dagens vitenskapelig innsikt med hensyn til barrierer for genoverføring mellom ubeslektede arter og flere års forskning for om mulig å framprovosere tilfeldig overføring av genetisk materiale fra planter til mikroorganismer er det lite som tyder på at transgenene i MON 88913 x MON 15985 skal kunne overføres til andre enn naturens kryssingspartnere ved detekterbare frekvenser i laboratoriestudier. Det er gjort forsøk som ser på stabilitet og opptak av DNA fra tarmkanalen hvor mus er oralt tilført M13 DNA. Det tilførte DNAet var sporbart i avføring opp til syv timer etter føring. Svært små mengder av M13 DNA (< 0,1 %) kunne spores i blodbanene i en periode på maksimum 24 timer, mens M13 DNA ble funnet i opptil 24 timer i lever og milt (Schubbert *et al.* 1994). Ved oralt inntak av genmodifisert soya er det vist at DNA er mer stabilt i tarmen hos personer med utlagt tarm sammenlignet med kontrollgruppen (Netherwood *et al.* 2004). I kontrollgruppen ble det ikke påvist GM DNA i feces. Nielsen *et al.* (2000) og De Vries & Wackernagel (2002) har undersøkt persistens av DNA og opptak av GM DNA i jord. I disse 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 88913 x MON 15985 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 88913 x MON 15985. 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 2005).

Streptomycinresistens hos bakterier i Norge er dokumentert i Normvetrapportene (NORM/NORM-VET 2004-2007). Hos noen bakteriearter er resistensnivået 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/NORM-VET 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. Utisiktet frøspredning i forbindelse med transport, håndtering og prosessering vil derfor ikke medføre risiko for spredning av transgener til økologiske eller konvensjonelt dyrkede sorter, eller til ville populasjoner og arter utenfor jordbruksområder.

### 5.3. Potensiale for samspill mellom GMP og målorganismer

Bomullslinjen MON 88913 x MON 15985 er transformert med de bakterielle genene *cryIAc* og *cry2Ab2*, isolert fra *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaci*. Genene koder for  $\delta$ -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 88913 x MON 15985 med opphav i utisiktet 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 foreskrevet bruk av bomullslinjen MON 88913 x MON 15985 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/2007/42 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 88913 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 2005) at bidraget av *nptII*-genet fra mat og fôr produsert fra MON 88913 x MON 15985 ikke er en signifikant kilde til resistensgener i bakterier som lever i tarmen til mennesker og dyr som spiser mat og fôr fra MON 88913 x MON 15985. 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 88913 x MON 15985 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 88913 x MON 15985 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 signifikante forskjeller mellom den transgene bomullshybriden MON 88913 x MON 15985 og kontrollinjer i enkeltparametere. Forskjellene er imidlertid ikke konsistente over forsøksfelt, og verdiene ligger innenfor variasjonsområdet for de umodifiserte referansesortene som inngikk i studien, og innenfor typiske verdier for andre bomullssorter som er rapportert i litteraturen.

Faggruppen anser at disse forskjellene ikke har noen helsemessig betydning. Faggruppen konkluderer med at det ikke er grunn til å anta at den ernæringsmessige kvaliteten til olje fra den genmodifiserte bomullsplanten MON88913 x MON 15985 er forskjellig fra olje fra umodifiserte bomullsplanter.

Flere studier viser at proteinene CP4 EPSPS, Cry1Ac, Cry2Ab2, GUS og NPTII ikke er akutt toksiske. Monsanto har utført og henviser til akuttstudier på rotter for disse proteinene. Studiene, som ikke er dokumentert i denne søknaden, viser at proteinene ikke fører til påvisbare helseeffekter på forsøksdyrene. Monsanto har utført fôringsforsøk på fisk med fôr fra MON 88913 x MON15985, men har ikke foretatt sub-kroniske studier på rotter. Faggruppen konkluderer med at det er lite sannsynlig at eksponering for CP4 EPSPS-, Cry1Ac-, Cry2Ab2-, GUS- og NPTII- proteinene i seg selv og i de mengder som tilføres via fôr fra den genmodifisert bomullen, er helsemessig betenkelige for dyr.

Faggruppen konkluderer med at bomullsolje fra MON 88913 x MON15985 er vesentlig lik olje fra umodifiserte bomullsfrø, og at bruk av olje fra MON 88913 x MON15985 ikke utgjør noen større helsemessig risiko enn kommersiell olje fra umodifiserte bomullsplanter.

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 88913 x MON 15985 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 88913 x MON 15985 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 vitenskapelig 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 88913 x MON 15985 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 88913 x MON 15985 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 88913 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](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](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.
- EMA (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*. EMA/CVMP756937/2007, 22 Feb. 2007
- FAOSTAT (2006). Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://faostat.fao.org>
- Heinemann, J.A. & Traavik, T. (2004). Problems in monitoring horizontal gene transfer in field trials of transgenic plants. *Nature Biotechnology*, **22**, 1105-1109.

- Netherwood, T., Martín-Orúe, S.M., O'Donnell, A.G., Gockling, S., Graham, J., Mathers, J.C. & Gilbert, H.J. (2004). Assessing the survival of transgenic plant DNA in the human gastrointestinal tract. *Nature Biotechnology*, **22**, 204-209.
- Nielsen, K.M., van Elsas, J.D. & Smalla, K. (2000). Transformation of *Acinetobacter* sp. 13(pFG4deltanptII) with transgenic plant DNA in soil microcosms and effects of kanamycin on selection of transformants. *Applied Environmental Microbiology*, **66**, 1237-42.
- Nielsen, K. (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>
- 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 (2005). *Report from an Ad Hoc Group appointed by the Norwegian Scientific Panel on Genetically Modified Organisms and Panel on Biological Hazards – An assessment on potentially long-term health effects caused by antibiotic resistance marker genes in genetically modified organisms based on antibiotic usage and resistance patterns in Norway*. Opinion 05/302-1-final. Norwegian Scientific Committee for Food Safety, Oslo. 62 p.

VKM (2008). *Helse- og miljørisikovurdering av genmodifisert bomullslinje MON 15985 x MON 1445 fra Monsanto (EFSA/GMO/UK/2008/58)*. Uttalelse fra Faggruppe for genmodifiserte organismer 26.11.08. Vitenskapskomiteen for mattrygghet, Oslo, Norge. 08/334.

Xanthopoulos, F.P. & Kechagia, U.E. (2000). Natural crossing in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Australian Journal of Agricultural Research*, **51**, 970-983.