



**Helse- og miljørisikovurdering av genmodifisert  
bomullslinje MON 15985 fra Monsanto  
(EFSA/GMO/UK/2008/57)**

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

**28.11.08**

## **BIDRAGSYTERE**

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

## **VURDERT AV**

### Faggruppe for genmodifiserte organismer:

Knut Berdal (leder), Thomas Bøhn, Jihong Liu Clarke, Askild Holck, Helge Klungland, Casper Linnestad, Richard Meadow, Anne I. Myhr, Audun Nerland, Ingolf Nes, Kåre M. Nielsen, Hilde-Gunn Opsahl Sorteberg, Odd E. Stabbetorp, Rose Vikse

### Koordinatorer fra sekretariatet:

Arne Mikalsen, Merethe Aasmo Finne

## SAMMENDRAG

Helse- og miljørisikovurderingen av den genmodifiserte insektresistente bomullslinjen MON 15985 fra Monsanto (EFSA/GMO/UK/2008/57) er utført av Faggruppe for genmodifiserte organismer i Vitenskapskomiteen for mattrygghet. Mattilsynet og Direktoratet for naturforvaltning (DN) ber Vitenskapskomiteen for mattrygghet om å vurdere den genmodifiserte bomullslinjen MON 15985 til import, prosessering, og til bruk i næringsmidler og fôrvarer. Søknaden gjelder ikke dyrking. Monsanto søkte opprinnelig om godkjenning av bomullslinjen i 2005, men søknaden ble trukket og erstattet av vedlagte søknad i 2008. I forbindelse med forrige søknadsrunde vurderte faggruppen helseaspekter knyttet til bruk av MON 15985 som mat og fôr (VKM 2005c).

Vurdering av den genmodifiserte bomullen er basert på dokumentasjon som er gjort tilgjengelig på EFSAAs nettside GMO EFSAAnet. I tillegg er det benyttet informasjon fra andre vitenskapelige publikasjoner i vurderingen. MON 15985 er risikovurdert i henhold til tiltenkt bruk i EU/EØS-området, og faggruppen har derfor ikke vurdert mulige helse- og miljøeffekter knyttet til dyrking av bomullslinjen. 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 EFSAAs retningslinjer for risikovurdering av genmodifiserte planter (EFSA 2006a) og Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) konsensusdokument for bomull (OECD 2004) lagt til grunn for 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, samt agronomiske egenskaper, potensiale for ikke tilsiktede effekter på fitness, genoverføring og effekter på ikke-målorganismer. Bomullslinjen omsettes under handelsnavnet Bollgard II®.

Bomullslinjen MON 15985 er fremkommet ved biolistisk transformasjon av meristemceller fra den genmodifiserte bomullslinjen MON 531. MON 531 uttrykker Cry1Ac- og NPTII- proteiner, og inneholder også et ikke-funksjonelt *aadA*-gen. Bomullslinjen MON 15985 inneholder fire ekspressjonskassetter 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 "bomullsfiber" (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. Søknaden under forordning 1829/2003/EF omfatter ikke bruk av hele frø til mat.

Analysene av ernæringsmessige viktige komponenter i frø ble vurdert. Det ble bemerket at noen av de komponenter som OECDs konsensusdokument (OECD 2004) anbefaler analysert for bomull ikke er utført. Det er funnet statistisk signifikante forskjeller for enkelte komponenter, men forskjellene er

ikke konsistente over forsøksfelt. Faggruppen anser analysene for å være tilstrekkelige for en vurdering av MON 15985 til bruk som mat og fôr.

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

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

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

*Flertallet i faggruppen konkluderer med at tilstedeværelse av nptII-gener i mat og fôr produsert fra den genmodifiserte maisen 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 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 vitenskapelig 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 bomullslinjen 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 helse- og miljøeffekter knyttet til dyrking av bomullslinjen. Det er ingen indikasjoner på økt sannsynlighet for spredning, etablering og invasjon av bomullslinjen i naturlige habitater eller andre arealer utenfor jordbruksområder som resultat av frøspill i forbindelse med transport og prosessering. Bomull dyrkes ikke i Norge, og det er ingen stedegne eller introduserte viltvoksende arter i den europeiske flora som bomull kan hybridisere med.

### **Samlet vurdering**

Faggruppe for genmodifiserte organismer konkluderer med at bomullsfrøolje fra MON 15985 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 MON15985 vil medføre endret risiko for miljø i forhold til annen bomull.

## **NØKKEWORD**

Bomull, *Gossypium hirsutum* L., genmodifisert bomull, MON 15985, insektsresistens, Cry1Ac, Cry2Ab2, *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 .....	8
OPPDRAK FRA DIREKTORATET FOR NATURFORVALTING OG MATTILSYNET .....	8
RISIKOVURDERING .....	10
1. Innledning.....	10
1.1. Beskrivelse av egenskap(er) og virkningsmekanismer .....	10
2. Molekylær karakterisering .....	11
2.1. Evaluering av foreldrelinjen MON 531 .....	11
2.2. Evaluering av linjen MON 15985 .....	12
3. Komparative analyser.....	15
3.2. Valg av komparator og forsøksdesign.....	16
3.3. Analyser av ernæringsmessige komponenter.....	16
3.4. Agronomiske egenskaper .....	17
3.5. Delkonklusjon .....	17
4. Dokumentasjon av toksisitet og allergenisitet.....	18
4.1. Toksisitet .....	18
4.2. Allergenisitet .....	20
4.3. Delkonklusjon .....	20
5. Miljørisikovurdering .....	21
5.1. Potensiale for ikke tilsiktede effekter på fitness relatert til genmodifiseringen.....	21
5.2. Potensiale for genoverføring .....	21
5.4. Potensiale for samspill mellom GMP og ikke-målorganismer .....	23
5.5. Potensiale for samspill med abiotisk miljø og eventuelle effekter på biogeokjemiske prosesser .....	23
5.6. Overvåking .....	23
5.7. Delkonklusjon .....	24
KONKLUSJON .....	26
REFERANSER .....	28



## 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 bomullslinjen MON 15985 fra Monsanto Europe S.A. (EFSA/GMO/UK/2008/57). 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. Søknaden omfatter bruksområdene import, prosessering, næringsmidler og fôrvarer, og ble fremmet og anbefalt av britiske myndigheter i april 2007. Søknaden omfatter ikke bruk av hele frø som mat.

Monsanto leverte første søknad om godkjenning av MON 15985 til mat og fôr under forordning 1829/2003/EF i 2005 (EFSA/GMO/UK/2005/10). Denne søknaden, som også inkluderte bomullshybriden MON15985 x MON1445, ble trukket tilbake av søker i juli 2008 og erstattet av søknad EFSA/GMO/UK/2008/57.

Søknad EFSA/GMO/UK/2008/57 ble fremmet og anbefalt av britiske myndigheter i mai 2008. Søknaden ble lagt ut på EFSA-nett 20. august 2008, med frist på 90-dager for innspill fra EU- og EØS/EFTA-landene. I forbindelse med forrige søknadsrunde vurderte faggruppen helseaspekter knyttet til bomullslinjen MON 15985 (VKM 2005c).

MON 15985 er notifisert som eksisterende produkt under forordning 1829/2003/EF, artikkel 8 og 20. Godkjenningen av bomullslinjen gikk ut i april 2007, og Monsanto har søkt om fornyet godkjenning fram til 2017. Søknaden EFSA/GMO/RX/MON15985 omfatter bruksområdene førstoffer og tilsetningsstoffer til mat og fôr, og er nå til behandling i EFSA. Søknaden er ikke vurdert av VKM.

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

[http://www.mattilsynet.no/mattilsynet/multimedia/archive/00034/Tillatte\\_eksisterend\\_34512a.pdf](http://www.mattilsynet.no/mattilsynet/multimedia/archive/00034/Tillatte_eksisterend_34512a.pdf)

Utenfor EU/EØS-området er MON 15985 godkjent for dyrking i Australia, Sør-Afrika, India og USA. I tillegg er bomullslinjen godkjent for omsetning som mat og/eller fôr i Japan, Australia, Canada, Korea, Mexico, Filippinene, Sør-Afrika og USA (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/2008/57, genmodifisert bomullslinje MON 15985, ble lagt ut på EFSA-nett 20. august 2008. Faggruppe for genmodifiserte organismer skal i tråd med oppdragsbrev utarbeide helse- og miljørisikovurdering av bomullslinjen til import og industriell prosessering, samt til bruk som næringsmiddel og fôrvarer. Søknaden gjelder ikke dyrking. Vurderingen skal utføres i henhold til tiltenkt bruk og i overensstemmelse med prinsippene som er nedfelt i EFSA-s retningslinjer for vurdering av genmodifiserte planter ("Guidance document of the scientific panel on genetically



modified organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed” (EFSA 2006a).

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

*Produktet som ønskes vurdert:*

Genmodifisert bomull, EFSA/GMO/UK/ 2008/57, MON 15985.

Unik kode: MON-15985-7.

Status i EU: Søknad under forordning 1829/2003/EF. EFSA's frist for innspill er 20.11.08.

Ønsket svarfrist til Mattilsynet/DN: 17. november 2008.

## RISIKOVURDERING

### 1. Innledning

Helse- og miljøvurderingen av den genmodifiserte bomullslinjen MON 15985 er 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 miljø- og helsekravene i genteknologiloven med forskrifter, først og fremst forskrift om konsekvensutredning etter genteknologiloven. Videre er kravene i EUs forordning 1829/2003/EF og utsetningsdirektiv 2001/18/EF med annekser lagt til grunn for vurderingen.

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

Faggruppen har vedtatt å benytte EFSAs retningslinjer som retningslinjer for vurdering av genmodifiserte planter. Prinsippene som er lagt til grunn for vurderingen er derfor hentet fra EFSAs dokument "Guidance document of the scientific panel on genetically modified organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed" (EFSA 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

Foreldrelinjen MON 15985 er fremkommet ved transformasjon av den genmodifiserte linjen MON 531. MON 531 uttrykker Cry1Ac- og NPTII- proteiner, og inneholder også et ikke-funksjonelt *aadA*-gen.

Et lineært rekombinant DNA fragment på 6092 basepar ble satt inn i meristemceller fra MON 531 ved hjelp av partikkelakselerasjonsmetoden. Det rekombinante DNA-fragmentet stammer fra plasmidet PV-GHBK11, og inneholder genene *cry2Ab2* og *uidA*. MON 15985 inneholder dermed fire ekspresjonskassetter, som uttrykker Cry1Ac-, Cry2Ab2 -, GUS- og NPTII-protein. Den ene ekspresjonskassetten inneholder også et *aadA*-gen, men dette uttrykkes ikke i planten. De bakterielle genene *cry1A.c* og *cry2Ab2* er isolert fra *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaci*, og koder for  $\delta$ -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 foreldrelinjen MON 531

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

#### CryIAC-ekspresjonskassetten:

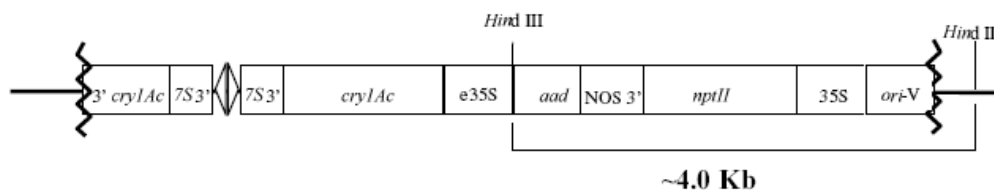
- a) *e35s* promoter fra blomkålmosaikkvirus med forsterker (CaMV),
- b) *cryIAC* et modifisert *cryIAC*-gen som finnes i én kopi i genomet. *CryIAC*-genet stammer fra jordbakterien *Bacillus thuringiensis*.
- c) *7S3'* terminator sekvens fra soya

#### nptII- ekspresjonskassetten:

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

#### Ikke-funksjonelle fragmenter:

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



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

Analysene viser at det er satt inn et trunkert fragment på 242 basepar som inneholder deler av *7s3'* elementet og deler av *cryIAC*-genet. De molekylærbiologiske analysene er basert på genom "walking", cosmidkloning, PCR, Southern blot og sekvensering. Faggruppen har vurdert det rekombinante innskuddet i MON531 i søknaden MON 531 x MON 1445 (VKM 2005a). Faggruppen fant at dokumentasjonen var tilstrekkelig for en vurdering av det rekombinante innskuddet.

## 2.2. Evaluering av linjen 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-fragmentet på 7916 basepar fra PV-GHBK04-plasmidet. Dette rekombinante DNA fragmentet inneholder to ekspresjonskassetter. Den ene inneholder ett *cry1Ac*-gen med regulatoriske områder og den andre inneholder med regulatoriske områder et neomycin fosotransferase II (*nptII*) gen og et 3''-(9)-O-aminoglycoside adenyltransferase (*aadA*) gen.

Transformanter ble selektert ved at de vokste i nærvær av p-nitrofenyl-β-D-glukuronid. Ved hydrolyse av p-nitrofenyl-β-D-glukuronid omdannes 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

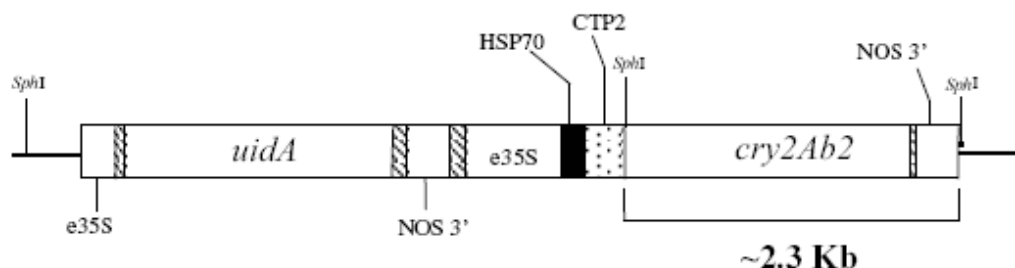
Det rekombinante fragmentet MON 15947 inneholder følgende genelementer, se figur 2:

#### uidA kassett:

- a) *e35s* 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" leder sekvens 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



Figur2. Rekombinant DNA-fragment MON 15947 med funksjonelle *uidA/cry2Ab2*-ekspresjonskassetter

Dette innskuddet inneholder en fullstendig kopi av *cry2Ab2*-kassetten lenket til en kopi av *uidA* kassetten. CaMV 35s promoteren i *uidA* kassetten mangler ca. 260 bp i 5'enden. I *uidA*-genet i

planten er det en aminosyre-endring i N-enden. Endringen er fra glutamin til lysin. Endringen påvirker ikke det aktive området og den tredimensjonale strukturen av proteinet. Monsanto har analysert 1894 baser oppover fra 5'-enden og 763 baser nedover fra 3'-enden av innskuddet. Analyser av disse flankerende sekvensene viser ingen homologi med gener i bomullsplanten. Monsanto har påvist at 388 baser i 5'-enden viser homologi til kloroplast DNA.

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

I følge dokumentasjon fra søker ble nivået av uttrykk av proteinene Cry1Ac, Cry2Ab2, NPTII, GUS og AAD analysert i prøver fra feltforsøk i USA i 1998. Forsøkene ble lagt ut på åtte lokaliteter i form av blokkdesign med fire gjentak, og inkluderte testlinjen MON 15985, den umodifiserte kontrollsorten DP50, samt en transgen kontrollinje (MON 531). Det ble tatt prøver av blad og frø på alle forsøksfeltene, mens prøver av pollen og hel plante ble hentet fra to av lokalitetene. Konsentrasjonen av Cry1Ac- og Cry2Ab2 ble målt i blad, frø, hel plante og pollen, mens nivået av NPTII og GUS ble analysert i prøver fra blad og frø. Analyser vha Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) viser gjennomsnittlige konsentrasjoner av Cry1Ac i blad, frø, hel plante og pollen på henholdsvis  $2,75 \pm 1,32 \mu\text{g/g}$  råvekt (0,39-4,19)<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 ( $\text{LOQ}^2 < 0,25$ ). 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 AAD-protein verken i testlinjen eller kontrollen MON 531.

I søknad EFSA/GMO/UK/2008/58 for bomullshybriden MON 15985 x MON 1445, viser Monsanto 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 hybrid MON 15985 x MON 1445, begge foreldrelinjene, samt en ikke-transgen kontroll (SG125NT). Konsentrasjonen av Cry1Ac-proteiner i unge blad og frø ble målt til henholdsvis  $2,1 \pm 1,4 \mu\text{g/g}$  råvekt ( $< \text{LOQ}^3$ -4,2) og  $1,6 \pm 0,23 \mu\text{g/g}$  råvekt (1,3-1,9), mens Cry2Ab2 ble målt til henholdsvis  $5,7 \pm 4,4 \mu\text{g/g}$  råvekt (1,6-13) og  $44 \pm 10 \mu\text{g/g}$  råvekt (34-60). Nivået av GUS ble målt til  $61 \pm 31 \mu\text{g/g}$  råvekt (13-110) i blad og  $46 \pm 13 \mu\text{g/g}$  råvekt (27-59) i frø. Tilsvarende tall for NPTII-protein er  $5,9 \pm 1,5 \mu\text{g/g}$  råvekt ( $< \text{LOD}^3$ -6,9) og  $5,5 \pm 0,59 \mu\text{g/g}$  råvekt (4,8-6,2). Disse proteinene kunne ikke påvises i tradisjonell kontroll.

Det 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 brukt 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 antatte homologier til forskjellige proteiner. Ingen av disse polypeptidene har mer enn 35 % homologi med et vindu på 8 aminosyrer, som anbefalt av FAO/WHO.

<sup>1</sup> Variasjonsområde

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

<sup>3</sup> LOD = limit of detection

*Nedarving og stabilitet av innsatt DNA*

I henhold til dokumentasjonen 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>) (fig.3). 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 (fig 3). Segregasjonsanalysene (chi-kvadrat-test) viser forventet spaltningstall på 3:1 for Cry2Ab2-protein. Dette viser at det rekombinante DNA-fragmentet følger mønsteret for mendelsk nedarving av et enkelt, dominant locus.

Basert på Soutern blot-analyser og bekreftelse med sekvensering viser resultatene fra disse analysene at Cry2Ab2-ekspresjonskassetten var til stede i alle plantene.

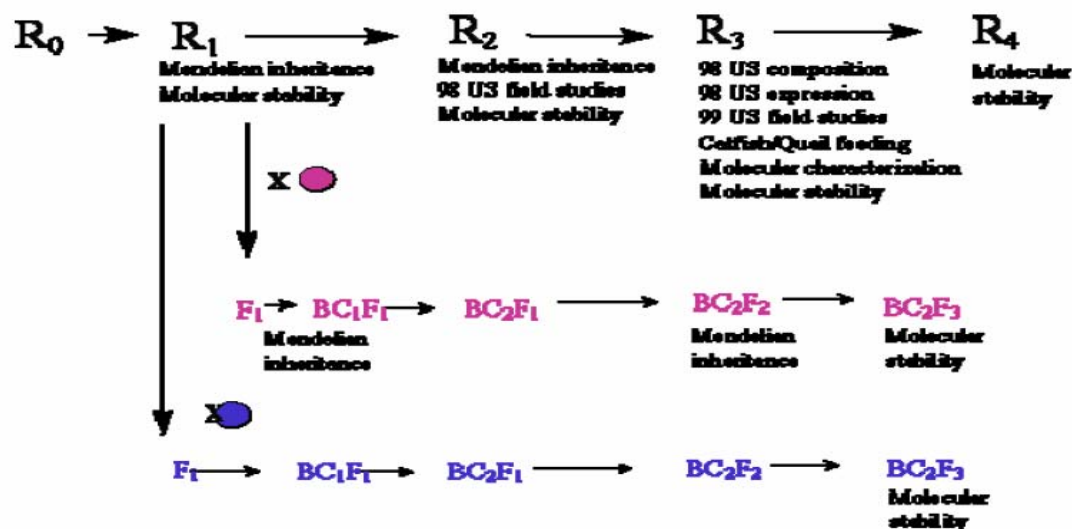


Figure 31. Progeny map of MON 15985 generations used to assess product safety

Table 7. Segregation data and analysis of progeny of MON 15985

Generation <sup>2</sup>	Expected		Observed <sup>1</sup>		Chi-square
	Positive	Negative	Positive	Negative	
R <sub>1</sub> (3:1)	202.5	67.5	210	60	1.11 <sup>ns</sup>
R <sub>2</sub> (3:1)	45	15	43	17	0.356 <sup>ns</sup>
BC <sub>1</sub> F <sub>1</sub> (1:1)	199	199	213	185	1.970 <sup>ns</sup>
BC <sub>2</sub> F <sub>2</sub> (3:1)	568	189	549	208	2.477 <sup>ns</sup>

<sup>1</sup> Data expressed in ratios of plants that are positive or negative for the presence of the Cry2Ab2 protein as determined by qualitative ELISA.

<sup>2</sup> R<sub>1</sub> seed was derived from the initial R<sub>0</sub> transformant in the same background as MON 531.

Figur 3. Kryssingsskjema og segregasjonsdata for genmodifisert bomull MON 15985

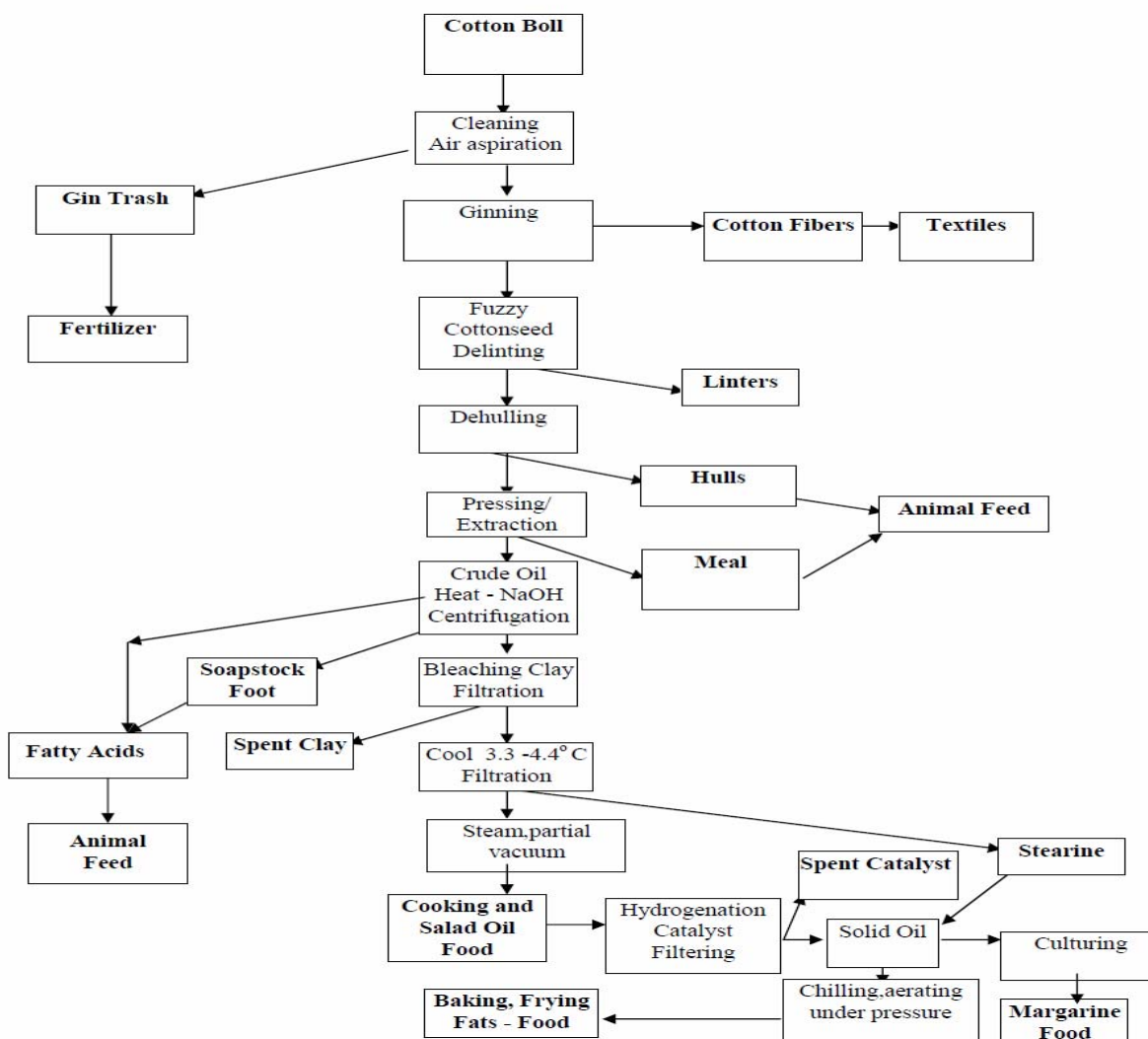
### Delkonklusjon

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 MON15985 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.

## 3. Komparative analyser

### 3.1. Innledning

Bomullsfrø hvor bomullsfibrene er fjernet blir bearbeidet til fire hovedprodukter, olje (16 %), mel (45 %), frøskall (26 %) og ”bomullsfiber” (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, se figur 4.



Figur 4. Bearbeiding av bomullsfrø til bomullsfiber, fôr og olje. Diagrammet er fra OECDs konsensusdokument (OECD 2004).

### 3.2. Valg av komparator og forsøksdesign

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

Prøver for analyser av ernæringsmessige viktige komponenter ble hentet fra feltforsøk i Alabama, Arizona, Louisiana, Mississippi, Sør-Carolina og Texas i 1998 og 1999, på henholdsvis åtte og seks lokaliteter (Hamilton *et al* 2004). Dyrkningsområdene representerer ulike vekstmiljø for bomull i USA. Hvert forsøksfelt bestod av et fullstendig randomisert blokkdesign med 3 gjentak. I tillegg til kontrollinjen DP50 ble henholdsvis åtte og fire umodifiserte, kommersielle bomullssorter benyttet som referansemateriale i hvert av forsøkene.

Registreringer av agronomiske karakter ble foretatt i feltforsøk på åtte ulike lokaliteter i statene i Texas, Arizona, Mississippi, Sør-Carolina, Louisiana og Alabama i 1998. Forsøkene inkluderte testlinjen MON 15985, den transgene foreldrelinjen MON531, samt den umodifiserte kontrollsorten DP50. Fire av feltforsøkene ble lagt ut som randomiserte blokkdesign med fire gjentak, mens de resterende fire forsøkene ble utformet som enkle blokker uten gjentak.

#### *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.

### 3.3. Analyser av ernæringsmessige komponenter

#### *Hovedkomponenter i bomullsfrø*

Analysene av ernæringsmessige komponenter ble foretatt før OECDs konsensusdokument for bomull ble laget (OECD 2004). Monsanto hevder at valget av analyseparametere er i henhold til aksepterte internasjonale standarder og henviser til OECD dokumentet (*se side 79 i Technical dossier*). Faggruppen finner at valget av analyseparametere er i henhold til OECDs konsensusdokument for bomull (OECD 2004). Det er foretatt i alt 69 ulike analyser av hovedkomponenter i frø. For 17 av disse var 50 % av observasjonene lavere enn påvisningsgrensen og er derfor ekskludert fra de statistiske analysene. Det ble analysert for innhold av aske, fett, protein, vann, karbohydrater, total fiber, ADF (acid detergent fiber), NDF (neutral detergent fiber), total kostfiber (total dietary fiber), kalorier, aminosyrer, fettsyrer (C8-C22), cyklopropenoid-fettsyrer (malvalin, sterkulin, og dihydrosterkulin syre), fosfat, jern, kalium, kalsium, kobber, magnesium, mangan, natrium, sink, anti-næringsstoffet gossypol (fritt og totalt), 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 feltforsøkene som er publisert i artikkelen til Hamilton *et al.* (2004) viser 49 statistisk signifikante forskjeller av totalt 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. Det ble analysert for innhold av 10 ulike fettsyrer. Kombinerte analyser for vekstsesongene 1998 og 1999 over steder viser signifikante forskjeller mellom testlinje og komparator for innhold av myristin (14:0) (<16 %), stearin (<14 %), linolen (<13 %) og  $\gamma$ -linolen (< 7 %). For de andre fettsyrene er det ikke funnet signifikante forskjeller. Verdiene for alle fettsyrene ligger innenfor typiske verdier for andre bomullssorter som er rapportert i litteraturen.



#### *Aminosyrer i bomullsfrø*

Det ble analysert for innhold av både essensielle og ikke-essensielle aminosyrer. De aminosyrer som er målt er i henhold til OECD dokumentet. De kombinerte statistiske analysene for vekstsesongene 1998 og 1999 (Hamilton *et al.* (2004)) viser ingen signifikante forskjeller. Verdien for alle aminosyrene ligger innenfor 20 %, og for alle aminosyrene ligger verdiene innenfor de typiske verdiene som er rapportert i litteraturen.

#### *Vitaminer*

I henhold til OECDs konsensusdokument for bomull bør det undersøkes for innhold av vitamin E i olje. Det er foretatt statistiske analyser for vitamin E. Vitamin E mengden i MON 15985 er ca. 12 % høyere enn mengden i olje fra kontrollen DP50 (Hamilton *et al.* (2004)).

#### *Mineraler*

Med unntak av selen, er mineralene som er målt i henhold til OECDs konsensusdokument for bomull. Kombinerte analyser over forsøkssteder viser signifikante forskjeller mellom testlinje og kontroll for innhold av fosfat (< 5 %, lavere enn kontroll), kobber (< 5 %, lavere enn kontroll) og jern (ca. 6 %, lavere enn kontroll) (Hamilton *et al.* (2004)). Forskjellen ligger innenfor typiske verdier for andre bomullssorter som er rapportert i litteraturen.

#### *Antinæringsstoffer*

Det ble ikke funnet signifikante forskjeller for innhold av fritt og total gossypol i frø. Gossypol kunne ikke påvises i prosessert olje. For syklopropanoidfettsyren dihydrosterulsyre var mengden i MON 15985 signifikant større enn kontroll (ca. 20 %). For de andre syklopropanoidfetttsyrene ble det ikke funnet statistisk signifikante forskjeller (Hamilton *et al.* (2004)).

#### *Toksiner*

Innhold av aflatoksinene B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> og G<sub>2</sub> var under påvisningsgrensen på 1 ppb (Hamilton *et al.* (2004)).

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

Monsanto henviser til tidligere analyser av raffinert bomullsolje for protein og DNA. Disse analysene viser at protein og DNA ikke kan påvises over påvisningsgrensene (Hamilton *et al.* (2004)).

### **3.4. Agronomiske egenskaper**

I dokumentasjonen fra Monsanto er det presentert data fra registreringer av følgende agronomiske karakterer; spiretidspunkt, plantetetthet, høyde/nodium-forhold, blomstring, modning/tidlighet, høstedata, avling, samt insekt- og sjukdomsresistens. I tillegg opplyses det at det er foretatt spiretester ved høsting av to av forsøksfeltene. Dokumentasjonen fra søker viser kun gjennomsnittsverdier for de observerte karakterene, og gir ingen informasjon om det er foretatt statistiske analyser av datamaterialet. Monsanto konkluderer med at MON 15985 ikke er forskjellig fra umodifiserte bomullssorter med hensyn på egenskaper knyttet til reproduksjon, morfologi, vekst, utvikling, samt sjukdoms- og insektresistens. På bakgrunn av tilgjengelig dokumentasjon er det imidlertid vanskelig å konkludere mhp agronomisk ekvivalens mellom testlinjen og kontrollsorter.

### **3.5. Delkonklusjon**

Det er funnet statistiske forskjeller i enkeltparametre, men forskjellene ligger innenfor ±10 % for de fleste komponentene. Verdiene for de enkelte analyserte komponentene ligger også innenfor verdiene for de elleve umodifiserte kommersielle referansesortene, den transgene kontrollsorten, samt typiske verdier for andre bomullssorter som er rapportert i litteraturen

Resultatene fra undersøkelsene som presenteres av agronomiske karakterer er ufullstendige. Det er derfor vanskelig å konkludere mht agronomisk ekvivalens.

## 4. Dokumentasjon av toksisitet og allergisitet

### 4.1. Toksisitet

#### *Akutt oral toksisitet studier med Cry1Ac-, Cry2Ab2-, GUS- og NPTII-proteiner*

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

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

Forsøket med Cry2Ab2 er utført i henhold til EPA (40 CFR Part 160) og FDA (21 CFR, Part 58) Good Laboratory Practice (GLP). Tre grupper á 10 hunn- og hannmus ble eksponert for henholdsvis 30, 300 og 1000 mg Cry2Ab2-protein per kg kroppsvekt. Vann og albumin (1000 mg/kg kroppsvekt) ble benyttet som kontroll, og kontrollgruppene bestod av 10 hunn- og 10 hannmus. Alle dyrene ble observert daglig mht kliniske tegn på forgiftning over en periode på 15 dager. Ved avslutning av forsøket ble alle dyrene avlivet, og bukhole, toraks, samt en rekke organer og vev ble undersøkt makroskopisk. Det ble ikke påvist signifikante endringer i mortalitet eller toksiske effekter på dyrene som ble eksponert for Cry2Ab2-protein.

Monsanto har i "Technical dossier Part I" laget en tabell over NOEL (no observed effect level) nivåer for Cry-proteiner som en finner i mikrobiologiske insektmidler, se Table 15 under.

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

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

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

<sup>2</sup> These No-observed effect levels (NOELs) represent the highest doses tested. Doses are expressed in various units for *B. thuringiensis* microbial technical grade materials, e.g., milligrams technical ingredient per kilogram body weight, or more commonly colony-forming units (CFU) or spores per animal or kilogram body weight. It is not possible to directly compare doses on a milligram technical material per kilogram of body weight basis. This is due to the fact that CFU or spore count can range from approximately 10<sup>8</sup> to 10<sup>11</sup> per gram of technical grade *B. thuringiensis* microbial material (McClintock *et al.*, 1995). Secondly, the Cry protein content in different *B. thuringiensis* microbial preparations may vary depending on the microorganism and fermentation conditions. Cry1Ac and Cry2A protein dosages administered to animals in the referenced studies range from milligrams to grams per kilogram of body weight.

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

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

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

Monsanto henviser til et 56 dagers fôringsforsøk med malle, 30 akvarier à 20 fisk. Fôret bestod av 20 % røstet bomullsfrømel fra MON 15985, MON 15813 (inneholder Cry2Ab2), umodifiserte kontrollsorter DP50 og DP50B, samt to kommersielle bomullssorter. Det ble benyttet 100 fisk per testgruppe. Filet fra malle ble analysert for innhold av protein, fett, vann og aske. Det ble ikke påvist endringer i gjennomsnittsverdiene for de undersøkte parametrene (p>0,05). Det ble ikke funnet signifikante forskjeller i overlevelse av fiskene. Det ble ikke påvist endringer i gjennomsnittsverdiene for de undersøkte parametrene (p>0,05). Monsanto konkluderer med at næringsverdien til mel fra genmodifisert MON 15985 er tilsvarende mel fra umodifisert bomull. Fôringsforsøket ble utført i henhold til United States EPA FIFRA Good Laboratory Practice Regulations (40 CFR Part 160), med unntak av ufullstendig dokumentasjon av bomullsmel MON 15985 før 1. doseringsdag. Karakteriseringen ble utført på forsøket 2. dag. Det ble heller ikke utført stabilitets- og homogenitetstester på mallefôret.

#### *Subkronisk fôringsforsøk på rotter*

Monsanto har utført et 13 ukers fôringsforsøk med fôr fra MON 15985. Fôringsforsøket inkluderte 6 uker gamle hann- og hunnrotter, 10 grupper à 20 rotter/kjønn. Det ble benyttet standard rottefôr tilsatt henholdsvis 2 og 5 % bomullsmel fra DP50BX (event 15985) og umodifisert kontrollsort DP50 til 4 av gruppene, mens standard rottefôr tilsatt 5 % mel fra seks kommersielle umodifiserte referansesorter ble gitt til de 6 andre gruppene. Det ble utført makroskopiske og mikroskopiske undersøkelser av organene, samt klinisk patologisk undersøkelser av urin og blod fra alle dyrene i hver gruppe. Det ble påvist noen få signifikante forskjeller mellom MON 15985 og DP50BX i noen av de undersøkte parametrene. Det ble imidlertid ikke påvist noe mønster i disse statistiske endringene som kunne tilskrives testfôrene. Søker konkluderer med at det ikke er påvist test-relaterte endringer i overlevelse, kliniske tegn, kroppsvekt, fôrintak, klinisk-patologi, organvekt, samt makroskopisk og mikroskopisk patologi.

Fôringsforsøket er utført i henhold til GLPS (U.S. EPA FIFRA 40 CFR part 160), OECDs retningslinjer nummer 408 subkroniske tester på dyr (Guidelines for Testing of Chemicals, Health Effects Test Guidelines, Section 408), U.S. EPA, OPPTS 870.3100 90-Day Oral Toxicity in Rodents, Health Effects Test Guidelines (1998) og Commission Directive 2001/59/EC, Part B.26, Methods for the Determination of Toxicity (2001).

#### **4.2. Allergenitet**

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

#### **4.3. Delkonklusjon**

Faggruppen konkluderer med at det er ingen 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 15985 under forordning 1829/2003/EF omfatter bruksområdene næringsmidler, fôrvarer, import og prosessering. Søknaden gjelder ikke dyrking. Miljørisikovurderingen av 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 fôret med biprodukter fra transgene bomullsfrø representere en mulig kilde til uønsket genspredning.

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

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

*G. hirsutum* L ('upland cotton') er opprinnelig en flerårig busk, men dagens kommersielle sorter dyrkes som ettårige kulturer. Bomullsplanten er tilpasset et subtropisk og tropisk klima og overvintring betinger månedlige gjennomsnittstemperaturer over 18 °C. *G. hirsutum* L er en tetraploid og overveiende selvbefruktende art. Pollenkornene er relativt store, tunge og klebrige, og eventuell pollenspredningen skjer primært med humler og bier som vektorer. Graden av utkryssing varierer mellom sorter og tilstedeværelse av pollinatorer, og skjer normalt ved lave frekvenser (0-25 %) (Xanthopoulos & Kechagia 2000; Turley & Kloth 2002). Det er ingen stedege eller introduserte viltvoksende arter i den europeiske flora som *G. hirsutum* L kan hybridisere med. Spredte forekomster av forvillede planter fra *G. herbaceum* L. og *G. hirsutum* L. kan imidlertid forekomme (ref. EFSA 2006b).

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

Spredning av bomull til andre habitater i Europa er i hovedsak begrenset av manglende frøkvile og liten toleranse for lave temperaturer. Det er ikke påvist forskjeller mellom den transgene bomullslinjen 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 2005b).

Ut fra dagens vitenskapelig innsikt med hensyn til barrierer for genoverføring mellom ubeslektede arter og flere års forskning for om mulig å framprovosere tilfeldig overføring av genetisk materiale fra planter til mikroorganismer er det lite som tyder på at transgenene i MON 863 skal kunne overføres til andre enn naturens kryssingspartnere ved detekterbare frekvenser i laboratoriestudier. Det er gjort forsøk som ser på stabilitet og opptak av DNA fra tarmkanalen hvor mus er oralt tilført M13 DNA. Det tilførte DNAet var sporbart i avføring opp til syv timer etter fôring. Svært små mengder av M13 DNA (< 0.1 %) kunne spores i blodbanene i en periode på maksimum 24 timer, mens M13 DNA ble funnet i opptil 24 timer i lever og milt (Schubbert *et al.* 1994). Ved oralt inntak av genmodifisert soya er det vist at DNA er mer stabilt i tarmen hos personer med utlagt tarm sammenlignet med kontrollgruppen (Netherwood *et al.* 2004). I kontrollgruppen ble det ikke påvist GM DNA i feces. Nielsen *et al.* (2000) og De Vries & Wackernagel (2002) har undersøkt persistens av DNA og opptak av GM DNA i jord. I disse laboratorieforsøkene ble det påvist svært små mengder DNA som var overført fra planter til bakterier. Forutsetningen for at dette kunne skje var sekvenshomologi mellom plantetransgenet og mottagerbakterien. I hvilken grad det forekommer tilfeldig sekvenshomologi mellom plantetransgener og naturlig forekommende bakterier er usikkert, men siden de fleste transgenene inneholder rekombinerte DNA sekvenser fra jordbakterier kan dette ikke utelukkes (Bensasson *et al.*, 2004)

Ved mangel på seleksjonspress i fordøyelseskanal og/eller miljøet, er sannsynligheten for at horisontal genoverføring av transgener vil gi selektive fordeler eller økt fitness på mikroorganismer svært liten (Nielsen 2003, Pettersen *et al.* 2005). Kunnskap om forekomsten av *nptII*-genet i miljøet er imidlertid mangelfull. De tilgjengelige data viser at forekomsten av *nptII*-genet i patogene bakterier i Norge er lav. Imidlertid benyttes aminoglykosidet neomycin, som *nptII*-genet gir resistens mot, i veterinærmedisin i Norge. Et seleksjonstrykk på bakterietransformanter kan derfor ikke utelukkes. Det er usannsynlig at gener fra MON 15985 vil etableres stabilt i genomet til mikroorganismer i miljøet eller i fordøyelseskanalen hos mennesker eller dyr uten et seleksjonstrykk. Ut fra tilgjengelig kunnskap er det ikke grunn til å forvente at det vil skje frekvente eller påvisbare horisontale genoverføringer av DNA-materiale fra MON 15985. 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 % (Normvet rapportene 2004-2007). Hvilke resistensgener som forårsaker resistensen er ikke beskrevet. *E. coli*, *E. faecalis* og *E. faecium* er i utgangspunktet neomycinsensitive arter. Med de resistensnivåene som er funnet i Norge er det rimelig å gå ut fra at resistensen i de langt fleste tilfeller skyldes tilstedeværelse av resistensgener. Norge er ikke mikrobiologisk isolert fra omverdenen. Vi importerer halvparten av all mat vi spiser. Fragmenter av *nptII*-gener er funnet i 5 % av DNA prøver fra importert fôr (VKM 2005b)

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

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

Bomullslinjen MON 15985 er transformert med de bakterielle genene *cry1Ac* og *cry2Ab2*, isolert fra *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaci*, og koder for  $\delta$ -endotoksiner som gir plantene resistens mot enkelte arter i ordenen *Lepidoptera*, eksempelvis *Helicoverpa armigera* ('cotton bollworm'), *Heliothis virescens* ('tobacco budworm') og *Pectinophora gossypiella* ('pink bollworm'). Med unntak av *Helicoverpa armigera* er målorganismene for denne transformasjonen ikke påvist i Norge (<http://www.faunaeur.org/distribution.php>).

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

### 5.4. Potensiale for samspill mellom GMP og ikke-målorganismer

Eventuelle spillplanter av MON 15985 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 føret 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 15985 vil eksponeringsnivået av Cry-proteinene 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, annekset VII, er formålet med overvåkingsplanen å bekrefte at alle antagelser i miljørisikovurderingen som gjelder forekomst og omfang av potensielle skadevirkninger av den genmodifiserte organismen, eller bruken av den er korrekt. Videre skal den identifisere forekomsten av skadevirkninger på menneskers helse eller miljøet som skyldes den genmodifiserte organismen eller bruken av den, og som ikke ble forutsett i miljørisikovurderingen.

Overvåking er relatert til risikohåndtering og en totalvurdering av overvåkingsplanen er derfor utenfor VKMs mandat. I henhold til oppdrag fra DN skal imidlertid VKM diskutere behovet for særskilt overvåking. Dette gjelder både i de tilfeller hvor søker ikke har foreslått særskilt overvåking og i de

tilfeller hvor søkers risikovurdering avdekker behov for en spesiell overvåkingsplan. I sistnevnte tilfelle skal VKM gi en vurdering av kvaliteten på søkers overvåkingsplan, om denne er egnet til å avdekke så vel umiddelbare og direkte virkninger som forsinkede og indirekte virkninger påvist i miljørisikovurderingen. VKM skal ikke vurdere innretningen av den generelle overvåkingen.

Søknaden EFSA/GMO/UK/2008/57 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 fôret 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 risikohandtering eller en særskilt plan for overvåking av MON 15985.

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

## 5.7. Delkonklusjon

Søknaden gjelder godkjenning av bomullslinjen MON 15985 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 fôret 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 *nptIII*-genet i patogene bakterier i Norge er lav. Kunnskap om forekomsten av *nptIII*-genet i miljøet er imidlertid mangelfull. Den veterinære bruken i Europa, inkludert i Norge, av aminoglykosider, som kanamycin og neomycin, er slik at disse kan gi selektive betingelser for bakterietransformanter som har tatt opp ARMG.

Flertallet i faggruppen konkluderer med bakgrunn i rapportene (EFSA 2004; VKM 2005b) at bidraget av *nptIII*-genet fra mat og fôr produsert fra 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 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 15985 være neglisjerbart og ikke innebære noen økt risiko.

Det er kunnskapshull knyttet til forekomsten av *nptIII*-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 *nptIII*-genet i Norge. I fravær av vitenskaplig dokumentasjon antas at 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 dypere 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 (EMEA 2007) og WHO (2005) som ”critically important”. Manglende datagrunnlag gjør at mindretallet ikke ønsker å konkludere med hensyn på risiko knyttet til bruk av *nptII*-genet som ARMG.

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

## KONKLUSJON

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

Flere studier viser at proteinene Cry1Ac, Cry2Ab2, GUS og NPTII ikke er akutt toksiske. Monsanto har utført og henviser til akuttstudier på rotter for disse proteinene. Disse studiene viser at proteinene ikke medfører påvisbare helseeffekter på testdyrene. Monsanto har også utført sub-kroniske studier på rotter med fôr fra MON 15985. Det er ikke påvist testrelaterte endringer hos dyrene. Faggruppen konkluderer med at det er lite sannsynlig at eksponering for 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 MON15985 er vesentlig lik olje fra umodifiserte bomullsfôr, og at bruk av olje fra MON15985 ikke utgjør noen større helseisriko 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 som gir et begrenset grunnlag for en dypere forståelse av de faktorer som påvirker utbredelsen av resistensgenet i Norge,

Flertallet i faggruppen konkluderer med at tilstedeværelse av *nptII*-gener i mat og fôr produsert fra den genmodifiserte bomullen 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 15985 være neglisjerbar 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 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 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 et mindretall i faggruppen (K. M. Nielsen, C. Linnestad, A. Myhr, T. Bøhn, O. Stabbetorp, H. Klungland) 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 MON15985 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>
- Bensasson, D., Boore, J. L. & Nielsen, K. M. (2004). Genes without frontiers. *Heredity*, **92**, 483-489.
- Brubaker, C.L., Bourland, F.M. & Wendel, J.E. (1999). The origin and domestication of cotton. *In*: C.W. Smith, J.T. Cothren, eda Cotton: Origin, History, Technology and Production. John Wiley and Sons, Inc., New York, pp 3-31.
- de Vries, J. & Wackernagel, W. (2002). Integration of foreign DNA during natural transformation of *Acinetobacter* sp. by homology-facilitated illegitimate recombination. *The Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **99**, 2094-2099.
- EFSA (2004). Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on the use of antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified plants. *The EFSA Journal*, **48**, 1-18. [http://www.efsa.europa.eu/en/science/gmo/gmo\\_opinions/384.html](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.
- EMEA (2007). European Medicines Agency – Committee for medicinal products for veterinary use and committee for medicinal products for human use. *Presence of the antibiotic resistance marker gene nptII in plant for food and feed uses*. EMEA/CVMP756937/2007, 22 Feb. 2007
- FAOSTAT (2006). Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://faostat.fao.org>
- Hamilton, K. A., Pyla, P. D., Breeze, M., Olson, T., Li, M., Robinson, E., Gallagher, S. P., Sorbet, R. & Chen, Y. (2004) Bollgard II cotton: compositional analysis and feeding studies of cottonseed from insect protected cotton (*Gossypium hirsutum* L.) producing the Cry1Ac and Cry2Ab2 proteins. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 6969-6976.
- Heinemann, J.A. og Traavik, T. (2004). Problems in monitoring horizontal gene transfer in field trials of transgenic plants. *Nature Biotechnology*, **22**: 1105-1109.
- Naylor, M.W. (1992) Acute Oral Toxicity Study of Neomycin Phosphotransferase II (NPTII) in Albino Mice, Monsanto Study ML-91-409, St. Louis, MO, USA.
- Netherwood, T., Martín-Orúe, S.M., O'Donnell, A.G., Gockling, S., Graham, J., Mathers, J.C. & Gilbert, H.J. (2004). Assessing the survival of transgenic plant DNA in the human gastrointestinal tract. *Nature Biotechnology*, **22**, 204-209.

- Nielsen, K.M., van Elsas, J.D. & Smalla, K. (2000). Transformation of *Acinetobacter* sp. 13(pFG4deltanpiII) 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 (2005a). *Uttalelse om Monsanto's genmodifiserte bomull MON531 x MON1445 (EFSA/GMO/UK/2005/09). Uttalelse fra Faggruppe for genmodifisert organismer 16.09.05*. Vitenskapskomiteen for mattrygghet, Oslo, Norge.
- VKM (2005b). *Report from an Ad Hoc Group appointed by the Norwegian Scientific Panel on Genetically Modified Organisms and Panel on Biological Hazards – An assessment on potentially long-term health effects caused by antibiotic resistance marker genes in genetically modified organisms based on antibiotic usage and resistance patterns in Norway*. Opinion 05/302-1-final. Norwegian Scientific Committee for Food Safety, Oslo. 62 p.
- VKM (2005c). *Risikovurdering av genmodifisert bomull MON 15985 og MON 15985 x MON 1445 fra Monsanto (EFSA/GMO/UK/2005/10). Uttalelse fra Faggruppe for genmodifiserte organismer 16.12.05*. Vitenskapskomiteen for mattrygghet, Oslo, Norge.

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