



Vitenskapskomiteen for mattrygghet  
Norwegian Scientific Committee for Food Safety

---

## Foreløpig helse- og miljørisikovurdering av genmodifisert soya DAS-68416-4 fra Dow AgroSciences LLC (EFSA/GMO/NL/2011/91)

---

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

**Innspill til EFSA's GMO Extranet**

Dato: 2.3. 2012

Dok. nr.: 11-311-endelig

ISBN: 978-82-8259-050-1

**VKM Report 2012: 07**



## 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.

### Takk til:

Arbeidsgruppen GMO-fôr og mat har vurdert søkers dokumentasjon knyttet til komparative analyser og toksisitetstester. Faggruppe for genmodifiserte organismer ønsker å takke arbeidsgruppen for GMO-fôr og mat for deres verdifulle bidrag til denne risikovurderingen.

### Medlemmer av arbeidsgruppe GMO-fôr og mat:

Aksel Bernhoft (leder, Faggruppe for fôr til terrestriske og akvatiske dyr ), Monica Sanden (*ad hoc*-ekspert), Åshild Andreassen og Rose Vikse (Faggruppe for GMO).

### Vurdert av

#### Faggruppe for genmodifiserte organismer:

Audun H. Nerland (leder), Åshild Andreassen, Per Brandtzæg, Hilde-Gunn Hoen-Sorteberg, Askild Holck, Olavi Junntila, Heidi Sjursen Konestabo, Richard Meadow, Kåre M. Nielsen, Rose Vikse

#### Koordinatorer fra sekretariatet:

Arne Mikalsen og Merethe Aasmo Finne

## Sammendrag

Helse- og miljørisikovurderingen av den herbicidtolerante soyalinjen DAS-68416-4 (EFSA/GMO/NL/2011/91) fra Dow AgroSciences LLC er utført av Faggruppe for genmodifiserte organismer i Vitenskapskomiteen for mattrygghet. Vitenskapskomiteen for mattrygghet er bedt av Mattilsynet og Direktoratet for naturforvaltning om å vurdere helse- og miljørisiko ved en eventuell godkjenning av DAS-68416-4 til import, prosessering, og til bruk i næringsmidler og fôrvarer. Søknaden gjelder ikke dyrking.

Den foreløpige risikovurderingen av den genmodifiserte soyalinjen er basert på uavhengige vitenskapelige publikasjoner og søkers dokumentasjon som er gjort tilgjengelig på EFSA's nettside EFSA GMO Extranet. Vurderingen er gjort i henhold til tiltenkt bruk i EU/EØS-området, og i overensstemmelse med miljø- og helsekravene i matloven og genteknologiloven med forskrifter, først og fremst forskrift om konsekvensutredning etter genteknologiloven. Videre er kravene i EU-forordning 1829/2003/EF, utsettingsdirektiv 2001/18/EF (vedlegg 2,3 og 3B) og veiledende notat til Annex II (2002/623/EF), samt prinsippene i EFSA's retningslinjer for risikovurdering av genmodifiserte planter og avledete næringsmidler (EFSA 2006, 2010, 2011) og Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) konsensusdokument for soya (OECD 2001, 2009) lagt til grunn for vurderingen.

Den vitenskapelige vurderingen omfatter transformeringsprosess, vektor, transgene konstrukt, komparativ analyse av ernæringsmessig kvalitet, mineraler, kritiske toksiner, metabolitter, antinæringsstoffer, allergener og nye proteiner. Videre er agronomiske egenskaper, potensiale for utilsiktede effekter på fitness, samt mulig horisontal og vertikal genoverføring vurdert.

Det presiseres at VKMs mandat ikke omfatter vurderinger av etikk, bærekraft og samfunnsnytte, i henhold til kravene i den norske genteknologiloven og dens konsekvensutredningsforskrift. Disse aspektene blir derfor ikke vurdert av Faggruppe for genmodifiserte organismer.

Soyalinjen DAS-68416-4 er fremkommet ved *Agrobacterium*-mediert transformasjon av frøplanter (nodier) av den kommersielle soyasorten "Maverick". Den innsatte genkonstruksjonen i DAS-68416-4 inneholder en enkelt kopi av et modifisert *aad-12*-gen fra bakterien *Delftia acidovorans* og *pat*-genet fra bakterien *Streptomyces viridochromogenes*.

*Aad-12*-genet koder for enzymet aryloxyalkanoat-dioxygenase-12 (AAD-12). Enzymet omdanner 2,4-diklorfenoksy-eddiksyre (2,4-D) til 2,4-diklorfenol (DCP), som gir soyaplantene økt toleranse mot herbicider med virkestoff 2,4-D. AAD-12-enzymet omdanner også visse herbicider i aryloksyfenoksypropionat (AOPP)-gruppen. 2,4-D er et selektivt bladherbicid med systemisk virkning, og hører til herbicidgruppen fenoksytyrer. Herbicidet er et syntetisk auxin, som benyttes til kontroll av tofrøbladete ugras. 2,4-D er godkjent i EU, men har ikke vært tillatt i Norge siden 1997. Det er heller ikke godkjente AOPP-preparater på det norske markedet (Plantevernguiden 2011).

*Pat*-genet koder for enzymet fosfinotricin acetyltransferase (PAT), som acetylerer og inaktiverer glufosinat-ammonium, virkestoffet i fosfinotricin-herbicider av typen Finale. Fosfinotricin er et ikke-selektivt kontaktherbicid som hemmer glutaminsyntetase, et enzym som deltar i assimilasjonen av nitrogen og katalyserer omdanning av glutamat og ammonium til aminosyren glutamin. Hemming av glutaminsyntetase fører til akkumulasjon av ammoniakk, og til celledød i planten. De transgene soyaplantene vil derfor tolerere høyere doser av sprøytemiddelet glufosinat sammenlignet med konkurrerende ugras.

DAS-68416-4 inneholder ingen markørgener for antibiotikaresistens.

**Molekylær karakterisering**

Faggruppen vurderer karakteriseringen av det rekombinante DNA-innskuddet i DAS-68416-4, og den fysiske, kjemiske og funksjonelle karakteriseringen av proteinene til å være tilfredsstillende. Faggruppen har ikke identifisert noen risiko knyttet til det som framkommer av den molekylærbiologiske karakteriseringen av det rekombinante innskuddet i soyalinjen.

**Komparative analyser**

Analysen av ernæringsmessige komponenter er i hovedsak utført i tråd med OECDs konsensusdokument for soya (OECD 2009). Søker har analysert for innhold av ernæringsrelaterte komponenter i testlinjen DAS-68416-4 (usprøytet og sprøytet med tiltenkte herbicider). Det er påvist statistisk signifikante forskjeller mellom DAS-68416-4 og kontroll i enkeltparametere. Forskjellene er imidlertid ikke konsistente over forsøksfelt, og verdiene for de analyserte komponentene ligger innenfor typiske verdier for andre soyasorter som er rapportert i litteraturen, og innenfor variasjonsområdene til kommersielle referansesorter som er inkludert i søkers dokumentasjon. Faggruppen konkluderer med at forskjellene som er påvist ikke har ernæringsmessig betydning.

Faggruppen påpeker at søker ikke har foretatt analyser av vitamin K og fosfatider i lecitin. Det understrekes at konsensusdokumentet i størst mulig grad skal følges når det legges fram dokumentasjon på nivåene av næringsstoffer, antinæringsstoffer og metabolitter.

Når det gjelder phytoøstrogener, har søker slått sammen resultatene for de enkelte isoflavoner innenfor hver av isoflavongruppene. Det er stor variabilitet innenfor hver gruppe og faggruppen etterspør statistiske analyser for hver enkelt forbindelse innenfor hver isoflavongruppe.

Feltforsøk over en vekstsesong i USA viser små eller ingen signifikante forskjeller mellom den transgene soyalinjen DAS-68416-4 (usprøytet og sprøytet med tiltenkte herbicider) og umodifisert kontroll med hensyn på morfologiske og agronomiske egenskaper.

**Toksisitet og allergisitet**

AAD-12- og PAT-proteinet, som uttrykkes som følge av genmodifiseringen, har ingen likheter med kjente allergener eller egenskaper som tilsier at de kan virke som allergener. Basert på testene som er omtalt i søkers dokumentasjon og som er vurdert av faggruppen, anser faggruppen det som lite trolig at tilstedeværelse av disse proteinene i soyalinjen DAS-68416-4 medfører et større potensiale for utvikling av matallergi hos mennesker sammenlignet med umodifisert soya.

Søker har utført 14-dagers akutt oral eksponeringsstudier (OECD retningslinje 401, 423) og 28-dagers føringforsøk (OECD retningslinje 407) på mus med AAD-12-protein. Når det gjelder akutt oral eksponeringsstudier med PAT-protein henviser søker til tidligere studier.

Faggruppen påpeker at søkers 28-dagers føringforsøk er utført med en renhet på 35,3 %. Faggruppen stiller spørsmålsteget ved bruk av testsubstans med så lav renhetsgrad, og mener at føringforsøket derfor er av begrenset verdi. Faggruppen etterlyser også analyseresultater av de øvrige komponentene i testsubstansen.

Faggruppen bemerker også at akutt oral toksisitetstudier med sonde er lite relevante i vurderingen av helseeffekter av mat og fôr fra genmodifiserte planter.

Søker har fastsatt en NOAEL fra akutt oral eksponeringsstudien på mus. Faggruppen påpeker at akutt oral toksisitetstudier (OECD 401 eller 423) ikke er anbefalte studier for beregning av NOAEL. Dette fordi disse studiene er basert på en enkelt dosering og ett dosenivå, med en observasjonsperiode på kun 14 dager. Fra akutt oral toksisitetstudier bestemmes LD50, ikke NOAEL.

Faggruppen har, via innspill til EFSA's GMO Extranet, påpekt at søker burde ha utført 90-dagers repeterte dosestudier. I slike sub-kroniske studier benyttes det minst to doser av både test- og

kontrollfôret, og forsøksdyrene blir eksponert over et så langt tidsrom at eventuelle uheldige helseeffekter ville blitt oppdaget.

Søker har også utført 42 dagers fôringsforsøk med fôr som inneholder mel fra soya DAS-68416-4, en umodifisert, nærisogen kontrollinje og tre referansesorter. Søker hevder at det ikke ble påvist relevante biologiske endringer i de målte parametrene ved fôring med DAS-68416-4, sammenlignet med kontroll og referansesorter. Faggruppen er ikke enig i søkers konklusjon. Dette fordi fôringsforsøket med broilere viste lavere fôrinntak, tilvekst og fôrutnyttelse hos hannbroilere fôret med DAS-68416-4 sammenlignet kontrollgruppen. Faggruppen påpeker også, ved innspill til EFSA's GMO Extranet, at søker heller ikke har brukt DAS-68416-4 sprøytet med de tiltenkte herbicidene i fôringsforsøket.

Fiskemel og fiskeolje har til en viss grad blitt erstattet av soyamel og soyaolje som fôr til oppdrettsfisk. Søker har imidlertid ikke utført toksisitetsstudier på fisk med fôr som inneholder soyalinjen DAS-68416-4. Faggruppen anmoder, ved innspill til EFSA's Extranet, søker om å utføre fôringsstudier på fisk, først og fremst på laksefisk. Denne informasjonen ville ha gitt et bedre grunnlag for å vurdere eventuelle toksiske effekter på oppdrettsfisk.

På bakgrunn av dyreforsøk av begrenset omfang og kvalitet er det vanskelig å vurdere om eksponering for AAD-12- og PAT-protein i seg selv og den genmodifiserte soyaen, vil føre til helseskader. Det eneste fôringsforsøket på produksjonsdyr er utført på broilere, med bruk av soya som ikke er sprøytet med de aktuelle herbicidene.

### **Miljørisiko**

Søknaden gjelder godkjenning av soyalinjen DAS-68416-4 for import og prosessering under direktiv 2001/18/EF del C og til bruk i næringsmidler og fôrvarer under forordning (EF) 1829/2003. Faggruppen har derfor ikke vurdert mulige miljøeffekter knyttet til dyrking av soyalinjen. Faggruppen finner ingen indikasjoner på økt sannsynlighet for spredning, etablering og invasjon av soyalinjen i naturlige habitater eller andre arealer utenfor jordbruksområder som resultat av frøspill i forbindelse med transport og prosessering. Soya dyrkes ikke i Norge, og arten har ikke viltvoksende populasjoner eller nærstående arter utenfor dyrking i Europa. Det er derfor ikke risiko for utkryssing med dyrkede sorter eller ville planter i Norge.

Risikovurderingen av den genmodifiserte soyalinjen vil ferdigstilles og slutføres av faggruppen når endelig dokumentasjon fra søker foreligger.

## **Nøkkelord**

Soya, *Glycine max* (L.) Merr., genmodifisert soyalinje, DAS-68416-4, EFSA/GMO/NL/2011/91, herbicidtoleranse, 2,4-D, Weedar, AAD-12, aryloxyalkanoat-dioxygenase-12, glufosinat, PAT, 5-enolpyruvylsikat-3-fosfatsyntetase, helsemessig trygghet, helse, miljørisiko, forordning 1829/2003/EF

## Forkortelser og ordforklaringer

<i>Aad-12</i>	Gen fra bakterien <i>Delftia acidovorans</i> . Koder for enzymet aryloxyalkanoat-dioxygenase-12 (AAD-12)
ADF	Acid detergent fiber, fiberfraksjon av ufordøyelig plantemateriale i fôr, vanligvis cellulosefiber dekket med lignin og silikat. Plantematerialet fordøyes med en syre-detergentløsning (ADF). Ufordøyd masse betegnes som ADF. Fôr med lavt ADF-innhold er mer fordøyelig og har større energiinnhold.
Ae/ha	2,4-D acid equivalent per hectar. 2,4-D syre-ekvivalenter per hektar
Ai/ha	Aktiv ingrediens per hektar
Allel	Et bestemt gen kan foreligge i ulike varianter (alleler). Allelene kan være dominante (bestemmende for fenotypen) eller recessive (vikende).
Assimilasjon	Opptak av uorganiske stoffer og omdannelse av disse til de organiske stoffene planten består av
Auxin	Auxiner er en gruppe plantehormoner som i svært lave konsentrasjoner fremmer lengdeveksten hos skudd og koleoptiler (kimbladslirer), mens de samme konsentrasjonene hemmer veksten av røtter. Naturlig forekommende auxin er nesten utelukkende indol-3-eddiksyre.
Backcross (BC)	Tilbakekryssing. Kryssing mellom en hybridlinje (avkom fra to genetisk ulike foreldre) og en av foreldrelinjene, alternativt en genetisk ekvivalent organisme. Strategi i planteforedling for å overføre primært kvalitative karakterer, for eksempel sjukdomsresistens, til elitelinjer av både kryssbefruktede og selvpollinerte arter. Gjentatte tilbakekryssinger reduserer det genetiske bidraget, som uønskede alleler fra den andre donorplanten.
	BC <sub>1</sub> , BC <sub>2</sub> etc: betegnelse på 1. og 2. tilbakekryssingsgenerasjon, etc.
BLASTn	Algoritme som benyttes for homologisammenligning av nukleotidsekvenser.
BLASTP	Algoritme som benyttes for homologisammenligning av aminosyresekvenser i proteiner.
BLASTx	Algoritme som benyttes for oversetting fra kodende nukleotidsekvenser til aminosyresekvenser.
bp	Basepar
Codex	FAO/WHO-organ som etablerer globale handelsstandarder for mat.
CP4	<i>Agrobacterium</i> sp. stamme CP4
2,4-D	2,4-Diklorfenoksyeddiksyre, handelsnavn Weedar og Ugress-Kverk D
DCP	2,4-Diklorfenol
DN	Direktoratet for naturforvaltning
DNA	Deoxyribonukleinsyre (DNA)
Dominant allel	Et allel som uttrykker samme fenotype, uavhengig av om allelene i genparet er like (homozygot) eller ulike (heterozygote).
EFSA	European Food Safety Authority
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EPSPS	5-enolpyruvylsukinat-3-fosfatase
FAO	Food and Agriculture Organization, FN's organisasjon for ernæring og landbruk.
FIFRA	US EPA Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act. USAs føderale lov om insektdrepende midler, soppdrepende midler og midler mot skadedyr.
Fitness	Det genetiske bidraget som et individ har og som gir fordeler i denne og kommende generasjoner, sammenlignet med andre individer i populasjonen.
GLP	Good Laboratory Practices, retningslinjer for godt laboratoriearbeid.
Glufosinat	Bredspektret herbicid
GMO	Genmodifisert organisme
GMP	Genmodifisert plante
Locus	Spesifikk posisjon på kromosomet der et gen er lokalisert.



MALDITOF	Massespektrometrimetode for å måle molekylvekt til peptider.
Mendelsk nedarving	Lovmessig nedarvingsmønster ved ulike typer kryssinger.
Meristem	Delingsvev. Meristemet er konsentrert til bestemte steder i planten og er et område hvor uddifferensierte celler deler seg.
MT	Mattilsynet
NDF	Neutral detergent fiber, dvs. fiberfraksjon som inneholder hemicellulose og ADF.
NOAEL	No observed adverse effect level – dosenivå hvor ingen skadelige effekter observeres.
NOEL	No observed effect level - nulleffektnivå
Northern blot	Teknikk for overføring av RNA til en membran for påvisning av uttrykte RNA-sekvenser.
Nær-isogen linje	Linjer eller sorter som er genetisk identiske, med unntak av ett lokus eller kromosomsegment.
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
ORF	Open Reading Frame (åpen leseramme)
OSWP	Overseason whole plant
PAT	Fosfinotricin-N-acetyltransferase
PCR	Polymerase chain reaction. Polymerase kjedereaksjon. Metode for å syntetisere et stort antall kopier av en DNA-sekvens vha primere.
RNA	Ribonukleinsyre
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat (SDS)-polyakrylamidelektroforese. Elektroforesemetode for separasjon av proteiner.
Southern blot	Teknikk for overføring av DNA til en membran for videre studier av overførte DNA-sekvenser.
T-DNA	DNA fra Ti-plasmidet som er i jordbakterien <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . Ti-plasmidet (Transfer-DNA) overføres fra bakterien, og settes inn i plantecellenes kjernegenom. T-DNAet som overføres avgrenses av V (venstre) og H (høyre) flankesekvenser, og begrenser derfor den delen av Ti-plasmidet som overføres og gjør at resten av vektoren ikke blir satt inn i plantekromosomene.

Utviklingsstadier hos soya:

Vegetative stadier

VE: oppspiring, synlige frøblad

V1: 1. nodium på hovedstengel med fullt utviklede blad

V(n): n'te nodium på hovedstengel med fullt utviklede blad

Reproduktive stadier

R1: begynnende blomstring (en åpen blomst ved et nodium)

R2: full blomstring

R3: begynnende belgdannelse

R4: fullt utviklede belger

R5: begynnende frødannelse

R6: fullt utviklede frø

R7: begynnende modning

R8: fysiologisk moden

USDA United States Department of Agriculture

U.S. EPA United States Environmental Protection Agency, USAs miljøvernmyndigheter

Western-blot Metode for overføring av proteiner til en membran som binder protein.

WHO World Health Organisation. Verdens helseorganisasjon, organ under FN.

# Innholdsfortegnelse

<b>Bidragstyttere</b> .....	<b>2</b>
<b>Sammendrag</b> .....	<b>3</b>
<b>Nøkkelord</b> .....	<b>5</b>
<b>Forkortelser og ordforklaringer</b> .....	<b>6</b>
<b>Innholdsfortegnelse</b> .....	<b>8</b>
<b>Bakgrunn</b> .....	<b>9</b>
<b>Oppdrag fra Mattilsynet og Direktoratet for naturforvaltning (DN)</b> .....	<b>9</b>
<b>Risikovurdering</b> .....	<b>11</b>
<b>1 Innledning</b> .....	<b>11</b>
1.1 Beskrivelse av egenskap(er) og virkningsmekanismer .....	11
<b>2 Molekylær karakterisering</b> .....	<b>12</b>
2.1 Transformasjonssystem og vektorkonstruksjon .....	12
2.2 Karakterisering av geninnsettingen/genkonstruksjonen.....	12
2.3 Informasjon vedrørende uttrykk av innsatte gener og åpne leserammer (ORF) .....	15
2.4 Nedarving og stabilitet av innsatt DNA .....	18
2.5 Vurdering basert på tilgjengelig datagrunnlag .....	19
<b>3 Komparative analyser</b> .....	<b>20</b>
3.1 Valg av komparator og produksjon av plantemateriale for komparative analyser .....	20
3.2 Analyser av ernæringsmessige komponenter .....	21
3.3 Agronomiske egenskaper .....	38
3.4 Vurdering basert på tilgjengelig datagrunnlag .....	38
<b>4 Dokumentasjon av toksisitet, allergenisitet og næringsverdi</b> .....	<b>41</b>
4.1 Toksisitet.....	41
4.2 Allergenisitet.....	44
4.3 Vurdering basert på tilgjengelig datagrunnlag .....	45
<b>5 Miljørisikovurdering</b> .....	<b>47</b>
5.1 Potensiale for ikke-tilsiktede effekter på fitness relatert til genmodifiseringen .....	47
5.2 Potensiale for genoverføring .....	47
5.2.1 Horisontal genoverføring .....	48
5.2.2 Vertikal genoverføring.....	48
5.3 Miljøovervåkningsplan .....	49
5.4 Vurdering basert på tilgjengelig dokumentasjon .....	49
<b>6 Vurdering av søkers dokumentasjon, kunnskapshull</b> .....	<b>50</b>
<b>7 Innspill til EFSA GMO Extranet søknad EFSA/GMO/NL/2011/91</b> .....	<b>51</b>
<b>Referanser</b> .....	<b>54</b>
<b>Vedlegg 1</b> .....	<b>58</b>
<b>Vedlegg II</b> .....	<b>61</b>



## Bakgrunn

Vitenskapskomiteen for mattrygghet (VKM) er bedt av Mattilsynet og Direktoratet for naturforvaltning om å utføre en vitenskapelig risikovurdering av den genmodifiserte soyalinjen DAS-68416-4 fra Dow AgroSciences LLC (EFSA/GMO/NL/2011/91) med hensyn på mulig helse- og miljørisiko. DAS-68416-4 er søkt omsatt i EU/EØS-området under forordning (EF) Nr. 1829/2003 om genmodifiserte næringsmidler og fôrvarer (artiklene 5,17,3 (1c) og 15(1c)), og i overensstemmelse med direktiv 2001/18/EF, del C. Søknaden omfatter bruksområdene import, prosessering, næringsmidler og fôrvarer, men gjelder ikke dyrking.

Søknaden ble fremmet og anbefalt av nederlandske myndigheter i januar 2011. Dokumentasjonen knyttet til søknaden ble lagt ut på EFSAs nettside GMO Extranet 8. september 2011, med frist på 90-dager for innspill fra EU- og EØS/EFTA-landene. Norge har ikke tidligere uttalt seg om soyalinjen DAS-68416-4.

DAS-68416-4 er søkt godkjent for alle bruksområder i USA og Canada (APHIS-USA 2010; Canada 2011). I tillegg oppgir søker at soyalinjen er søkt godkjent i Japan, Australia og Sør-Korea (EFSA/GMO/NL/2011/91).

## Oppdrag fra Mattilsynet og Direktoratet for naturforvaltning (DN)

### Mattilsynet

Mattilsynet har i brev datert 15.10.2010 (ref. 2010/195445) gitt Vitenskapskomiteen for mattrygghet i oppdrag å foreta løpende vitenskapelige vurderinger av helserisiko av genmodifiserte organismer til bruk som mat og fôr, samt avledete, prosesserte ikke-spiroydktige næringsmidler og fôrvarer som søkes godkjent under EUs forordning 1829/2003/EF. Videre er VKM bedt om å vurdere landbruksrelatert miljørisiko for genmodifiserte planter som søkes godkjent under samme forordning, og som er relevant for dyrking i Norge. Avhengig av hvilket bruksområde de genmodifiserte plantene søkes godkjent for, gjelder oppdraget miljørisiko knyttet til import, transport, videreføring/prosessering og dyrking. Ved dyrkingssøknader skal VKM vurdere miljørisiko som følge av introduserte egenskaper i den genmodifiserte planten i forhold til dagens sortsmateriale, og miljørisiko som følge av endret dyrkingspraksis ved dyrking av den genmodifiserte planten (bla plantevernbruk og jordarbeiding) i forhold til ordinært driftsopplegg. Oppdraget omfatter både direkte og sekundære effekter av endret dyrkingspraksis.

I forbindelse med søknader som omfatter dyrking skal VKM også vurdere risiko knyttet til sameksistens. Vurderingen skal omfatte potensielle for spredning av genmodifisert materiale til arealer og avlinger fra arealer der det ikke dyrkes genmodifiserte planter, utvikling av ugraspopulasjoner, samt spredning til ville populasjoner av samme art eller nærstående arter utenfor dyrking. Vurdering av søkers miljøovervåkingsplan (generell og spesifikk) inngår ikke i Mattilsynets oppdrag.

### Direktoratet for naturforvaltning

Direktoratet for naturforvaltning (DN) har i brev datert 15.6.2011 (ref. 2008/4367 ART-BI-BRH) gitt VKM i oppdrag å foreta vurderinger av miljørisiko for søknader om utsetting under EU-direktiv 2001/18 og søknader under EUs forordning 1829/2003, og som er relevante i forhold til den norske genteknologiloven. Oppdraget fra DN til VKM omfatter utarbeidelse av vitenskapelige spørsmål og kommentarer, samt foreløpige miljørisikovurderinger for disse søknadene. VKM er også bedt om å utarbeide endelige miljørisikovurderinger i forbindelse med nasjonal slutføring av søknadene.

Grunnlaget for vurdering av søkers miljørisikovurdering er nedfelt i lov om fremstilling og bruk av genmodifiserte organismer (genteknologiloven), forskrift om konsekvensutredning etter genteknologiloven, EUs utsettingsdirektiv 2001/18/EF, veiledende notat til Annex II til direktiv 2001/18 (2002/623/EC) og EU-forordning 1829/2003. Videre vil EFSAAs veiledningsdokumenter for risikovurdering av genmodifiserte planter og avledete produkter (EFSA 2006, 2010, 2011), og OECDs veiledningsdokumenter være nyttige i utarbeidelsen av en norsk risikovurdering.

I henhold til oppdragsbrev fra DN skal VKM fokusere på miljørisiko i EØS-området, og på miljørisiko som er spesifikke for Norge. VKMs miljørisikovurderinger skal for alle søknader som gjelder dyrking av genmodifiserte linjer i EØS-området omfatte produktets miljørisiko ved eventuelle endringer i landbrukspraksis. Oppdraget omfatter både direkte miljøeffekter av bruk av tiltenkt plantevernmidler i den genmodifiserte kulturen under norske forhold, og miljørisiko som følge av endret agronomi og mulige langsiktige endringer i bruksmønster av plantevernmidler.

VKMs foreløpige miljørisikovurdering skal også ta hensyn til søkers forslag til generell overvåking og eventuell særskilt overvåking. I de tilfeller hvor søker ikke har foreslått særskilt overvåking, må VKM vurdere hvorvidt det er behov for særskilt overvåking. I de tilfeller hvor søker har foreslått særskilt overvåking, skal VKM vurdere hvorvidt overvåkingsplanen er egnet til å avdekke så vel umiddelbare og direkte virkninger, som forsinkede og indirekte virkninger påvist i miljørisikovurderingen

I henhold til oppdragene fra Mattilsynet og DN skal VKM, for nevnte søknader uten særskilt oppdrag, gi innspill til EFSA GMO EXTRANet (første innspillsrunde). Kopi av innspill sendes Mattilsynet og DN. Dersom det ikke gis innspill til søknadene orienterer også VKM Mattilsynet og DN om dette. Mattilsynet ber også om at det synliggjøres i risikovurderingen om søker har fulgt EFSAAs retningslinjer for risikovurdering av genmodifiserte planter og avledete næringsmidler og fôrvarer (EFSA 2006, 2010, 2011).

VKM skal videre følge opp EFSAAs behandling av innspillene og vurdere hvorvidt VKMs innspill til EFSA GMO Extranet er tilfredsstillende ivarettatt i EFSAAs vurdering.

Søknad EFSA/GMO/NL/2011/91, genmodifisert soyalinje DAS-68416-4, ble lagt ut på EFSAAs GMO Extranet 8. september 2011. Faggruppe for genmodifiserte organismer skal i tråd med oppdragbrevene utarbeide helse- og miljørisikovurdering av soyalinjen til import og industriell prosessering, samt til bruk som næringsmiddel og fôrvare. Søknaden omfatter ikke dyrking. Vurderingen skal utføres i henhold til tiltenkt bruk og i overensstemmelse med prinsippene som er nedfelt i EFSAAs retningslinjer for risikovurdering av genmodifiserte planter og avledete næringsmidler og fôrvarer (EFSA 2006, 2010, 2011).

#### *Produktet som ønskes vurdert*

Genmodifisert soya, EFSA/GMO/NL/2011/91 (soya DAS-68416-4).

Unik kode: DAS-68416-4

Status i EU: Søknad under 1829/2003/EF. EFSAAs frist for innspill er 8.12.11.

Ønsket svarfrist til Mattilsynet og DN: 5. desember 2011.

# Risikovurdering

## 1 Innledning

Helse- og miljørisikovurderingen av den genmodifiserte soyalinjen DAS-68416-4 er basert på dokumentasjon som er gjort tilgjengelig på EFSAs nettside GMO Extranet. I tillegg er det benyttet uavhengige vitenskapelige publikasjoner med referee i vurderingen. Soyalinjen DAS-68416-4 er risikovurdert i henhold til tiltenkt bruk i EU/EØS-området, og i overensstemmelse med miljø- og helsekravene i matloven og 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 bærekraftig utvikling, samfunnsnytte og etikk, i henhold til 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 for risikovurdering av genmodifiserte planter. Prinsippene som er lagt til grunn for vurderingen, er derfor hentet fra EFSAs veiledningsdokumenter for risikovurdering av genmodifiserte planter og avledete næringsmidler og fôrvarer (EFSA 2006, 2010, 2011). Ved vurdering av vesentlig likhet har faggruppen lagt vekt på OECDs konsensusdokument for soya (OECD 2001, 2009), som gir anbefalinger over hvilke parametere som bør undersøkes.

### 1.1 Beskrivelse av egenskap(er) og virkningsmekanismer

Soyalinjen DAS-68416-4 er fremkommet ved *Agrobacterium*-mediert transformasjon av nodier fra frøplanter fra den umodifiserte, kommersielle soyasorten ”Maverick”. Den innsatte genkonstruksjonen i DAS-68416-4 inneholder en enkelt kopi av et modifisert *aad-12*-gen fra bakterien *Delftia acidovorans*, samt en enkel kopi av *pat*-genet fra bakterien *Streptomyces viridochromogenes*.

*Aad-12*-genet koder for enzymet 2,4-D mono-oksygenase (AAD-12). Enzymet omdanner 2,4-diklorfenoksy-eddiksyre (2,4-D) til 2,4-diklorfenol (DCP), som gir plantene økt toleranse mot herbicider med virkestoff 2,4-D. AAD-12-enzymet omdanner også visse herbicider i aryloksyfenoksypropionat (AOPP)-gruppen. 2,4-D er et selektivt bladherbicid med systemisk virkning, og hører til herbicidgruppen fenoksyeddiksyrer. Herbicidet er et syntetisk auxin, med virkning som indoleddiksyre (IAA), og benyttes til kontroll av ettårige og flerårige tofrøbladete ugras i blant annet korn, mais og gras. 2,4-D er godkjent i EU, men har ikke vært tillatt i Norge siden 1997. Da mistet preparatet Weedar 64 sin godkjenning basert på substitusjonsprinsippet og ble erstattet av preparater med gunstigere helse- og miljøegenskaper (Spikkerud, Mattilsynet, pers. med.). Det er heller ikke godkjente AOPP-preparater på det norske markedet (Plantevernguiden 2011).

*Pat*-genet koder for enzymet PAT (Phosphinothricin-Acetyl-Transferase), som har høy spesifisitet overfor fosfinitricin (glufosinat), den aktive komponenten i herbicider av glufosinat-typen (eksempelvis Liberty, Basta og Finale). PAT inaktiverer fosfinitricin ved N-acetylering og beskytter derved planten i et fosfinitricinmiljø. Basesequensene i genet er endret slik at genet kan uttrykkes i planter. PAT-proteinets aminosyresekvens i planten er lik bakterieproteinets aminosyresekvens.

## 2 Molekylær karakterisering

### 2.1 Transformasjonssystem og vektorkonstruksjon

DAS-68416-4 er fremkommet ved *Agrobacterium*-mediert transformasjon av nodier fra frøplanter av cv. Maverick. Den binære vektoren pDAB4468, som inneholder to rekombinante DNA-fragmenter, ble benyttet til transformasjonen. De rekombinante DNA-fragmentene inneholder henholdsvis en *AAD-12*-ekspresjonskassett og en *pat*-ekspresjonskassett. Ved transformasjonen ble ekspresjonskassetene satt inn som et uavhengig lokus. Transformanter ble selektert ved at de overlevde og vokste i nærvær av virkestoffet glufosinat.

### 2.2 Karakterisering av geninnsettingen/genkonstruksjonen

*AAD-12*-ekspresjonskassetten inneholder promotersekvensen *AtUbi10* fra vårskrinneblom (*Arabidopsis thaliana*), modifisert *aad-12*-gen fra bakterien *Delftia acidovorans* og polyadenyleringssekvensen *AtuORF23* fra bakterien *Agrobacterium tumefaciens*. *PAT*-ekspresjonskassetten inneholder promotersekvenser fra mosaikkviruset "Cassava vein" (CsVMV), *pat*-genet fra bakterien *Streptomyces viridochromogenes* og DNA-sekvens fra *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTI15955, som avslutter transkripsjonen. DNA fragmentet inneholder ikke antibiotikaresistensgener.

Southern blot og sekvensanalyse er benyttet for å karakterisere det rekombinante DNA-fragmentet i planten. Molekylærbiologisk karakterisering viser at det er satt inn en enkel kopi av DNA-fragmentet i soyaens genom. Gener og DNA-elementer i dette fragmentet er vist i figur 1 og 2, og tabell 1 og 2.



Figur 1. Rekombinant T-DNA-fragment i soyaens genom.

Tabell 1. Størrelsesfordeling av gener og regulatoriske elementer som er satt inn i DAS-68416-4.

Location on T-DNA insert of pDAB4468 <sup>1</sup>	Genetic Element	Size (base pairs)	Description
1–24	T-DNA Border B	24	Transferring DNA sequences
25–160	Intervening sequence	136	Sequence from Ti plasmid pTi15955 (Barker et al., 1983)
161–1326	RB7-MAR	1166	Matrix attachment region (MAR) from <i>Nicotiana tabacum</i> (Hall et al., 1991)
1327–1421	Intervening sequence	95	Sequence from plasmid pENTR/D-TOPO (Invitrogen Cat. No. A10465) and multiple cloning sites
1422–2743	AtUbi10	1322	<i>Arabidopsis thaliana</i> polyubiquitin UBQ10 comprising the promoter, 5' untranslated region and intron (Norris et al., 1993)
2744–2751	Intervening sequence	8	Sequence used for DNA cloning
2752–3633	aad-12	882	Synthetic, plant-optimized version of an aryloxyalkanoate dioxygenase gene from <i>Delftia acidovorans</i> (Wright et al., 2007)
3634–3735	Intervening sequence	102	Sequence used for DNA cloning
3736–4192	AtuORF23	457	3' untranslated region (UTR) comprising the transcriptional terminator and polyadenylation site of open reading frame 23 (ORF23) of <i>Agrobacterium tumefaciens</i> pTi15955 (Barker et al., 1983)
4193–4306	Intervening sequence	114	Sequence from plasmid pENTR/D-TOPO (Invitrogen Cat. No. A10465) and multiple cloning sites
4307–4823	CsVMV	517	Promoter and 5' untranslated region derived from the cassava vein mosaic virus (Verdaguer et al., 1996)
4824–4830	Intervening sequence	7	Sequence used for DNA cloning
4831–5382	pat	552	Synthetic, plant-optimized version of phosphinothricin N-acetyl transferase (PAT) gene, isolated from <i>Streptomyces viridochromogenes</i> (Wohlleben et al., 1988)
5383–5484	Intervening sequence	102	Sequence from plasmid pCRI2.1 (Invitrogen Cat. No. K205001) and multiple cloning sites
5485–6188	AtuORF1	704	3' untranslated region (UTR) comprising the transcriptional terminator and polyadenylation site of open reading frame 1 (ORF1) of <i>Agrobacterium tumefaciens</i> pTi15955 (Baker et al., 1983)
6189–6416	intervening sequence	228	Sequence from Ti plasmid C58 (Zambryski et al., 1982; Wodd et al., 2001),
6417–6440	T-DNA border A	24	Transferring DNA sequences
6441–6459	intervening sequence	19	Sequence from Ti plasmid C58 (Zambryski et al., 1982; Wodd et al., 2001),
6460–6483	T-DNA border A	24	Transferring DNA sequences
6484–6770	intervening sequence	287	Sequence from Ti plasmid pTi15955 (Baker et al., 1983)
6771–6794	T-DNA border A	24	Transferring DNA sequences

Tabell 2. Ekspresjonskassetter i DAS-68416-4

AAD-12-ekspresjonskassett	
<i>RB7-MAR</i>	MAR (Matrix attachment regions) fra tobakksplanten <i>Nicotiana tabacum</i> er antatt å føre til stabil integrering av DNA, økt ekspresjon og redusert hendelse for geninaktivering.
<i>AtUbi10</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> polyubiquitin <i>UBQ10</i> - promoter
<i>Aad-12</i>	Gen som koder for et AAD-12-protein. Genet stammer fra bakterien <i>Delftia acidovorans</i>
<i>AtuORF23</i>	DNA-sekvens fra <i>Agrobacterium tumefaciens</i> plasmid pTI15955, avslutter transkripsjonen (se tabell 1). Uttrykkes ikke i planten
PAT-ekspresjonskassett	
<i>CsVMV</i>	Promoter og 5' ikke-translatert område fra Cassava vein mosaic virus
<i>pat</i>	Syntetisk, optimalisert versjon av <i>phosphinothricin N-acetyl transferase</i> ( <i>pat</i> )-gen fra den gram-positive jordbakterien <i>Streptomyces hygrosopicus</i> .
<i>AtuORF1</i>	DNA-sekvens fra <i>Agrobacterium tumefaciens</i> plasmid pTI15955, avslutter transkripsjonen (se tabell 1). Uttrykkes ikke i planten

Molekylærbiologiske analyser viser at det rekombinante fragmentet i planten inneholder de samme gener som er på det tilsvarende rekombinante fragmentet i plasmidet pDAB4468. Ett DNA-fragment på 6794 bp gjenfinnes som et enkelt lokus i soyaens genom. Bladestrakter er undersøkt med Lateral Flow Membrane Strip Assay. Immunoblotting av ekstraktene viste tilstedeværelse av AAD-12- og PAT proteinene.

AAD-12- og PAT-proteinene, som ble benyttet til molekylærbiologiske analyser, er renset fra blad fra T5-generasjonen. PAT-proteinet er undersøkt ved SDS-PAGE og Western-blot analyse. Andre analyser av PAT-proteinet er ikke lagt ved gjeldende søknad, men søker henviser til tidligere EFSA-søknader. AAD-12-proteinet ble undersøkt med Western-blot analyse og densitometri, SDS-PAGE og densitometri. Videre er det foretatt opprensing av AAD-12 proteinet med SDS-PAGE, proteolytisk peptidkartlegging av renset AAD-12 protein med MALDI-TOF MS, ESI-LC/MS-analyser av peptider, samt glykoliseringsanalyse. Det ble ikke påvist glykoliseringsseter på proteinet.

Søker har sekvensert 2730 baser oppstrøms for 5'-enden og 1082 baser nedstrøms for 3'-enden av innskuddet. I henhold til søker er flankesekvensene brukt ved søk i forskjellige databaser (se tabell 3). Søker har benyttet BLASTn og BLASTx algoritmer i sekvenssøkene. Søkene viser at flankesekvensene er soyasekvenser. DNA-analyser ved hjelp av Southern blot, DNA-sekvensanalyser, PCR og primere, som er spesifikke for sekvensene ved 5'-enden og 3'-enden for det transgene innskuddet, viser at ved innsettingen av plasmidets rekombinante DNA-fragment ble 55 bp fjernet fra 5'-enden, samt 9 bp ble satt i 3'-enden til det rekombinante DNA-fragmentet. Søker har også vist at "backbone" elementer og seleksjonsmarkørsekvenser fra plasmidet pDAB4468 ikke er til stede i genomet til DAS-68416-4. Videre er det vist at insertet er stabilt over fem generasjoner. Søker



konkluderer ut fra sine sekvensanalyser med at innsettingen av det rekombinante DNA-fragmentet ikke har ødelagte kode- eller regulatoriske sekvenser i området rundt innskuddet.

**Tabell 3. Sammenheng av bioinformatiske søk.**

Flanking sequences (both against DNA and protein databases)								
General Database	Date	Algorithms	Ref. to place in dossier	EST Database	Date	Algorithms	Ref. to place in dossier	
<b>Nucleotide:</b> GenBank non-redundant nucleotide collection	February 12, 2010	BLASTn	EFSa-GMO-NL-2011-91; Part I of the Technical dossier (Song, 2010a)	GenBank No-mouse No-human ESTs	February 12, 2010	BLASTn	EFSa-GMO-NL-2011-91; Part I of the Technical dossier (Song, 2010a)	
<b>Protein:</b> GenBank non-redundant protein sequences	February 12, 2010	BLASTx	EFSa-GMO-NL-2011-91; Part I of the Technical dossier (Song, 2010a)					
ORF analyses <input checked="" type="checkbox"/> insert-plant (a)/ <input type="checkbox"/> insert-insert (b)/ <input type="checkbox"/> whole insert (c)								
Allergen database	Date	Algorithms	Ref. to place in dossier	General (and toxin) Database	Date	Algorithms	Ref. to place in dossier	
(a) FARRP v10	January, 2010	FASTA and 8-mer match	EFSa-GMO-NL-2011-91; Part I of the Technical dossier (Song, 2010c)	GenBank non-redundant protein sequences	April 23, 2010	BLASTp	EFSa-GMO-NL-2011-91; Part I of the Technical dossier (Song, 2010c)	
Newly expressed proteins								
Allergen database	Date	Algorithms	Ref. to place in dossier	General (and toxin) Database	Date	Algorithms	Ref. to place in dossier	
AAD-12	FARRP v10	March, 2010	FASTA and 8-mer match	EFSa-GMO-NL-2011-91; Part I of the Technical dossier (Song, 2010e)	GenBank non-redundant protein sequences	March 18, 2010	BLASTp	EFSa-GMO-NL-2011-91; Part I of the Technical dossier (Song, 2010b)
PAT	FARRP v10	January, 2010	FASTA and 8-mer match	EFSa-GMO-NL-2011-91; Part I of the Technical dossier (Song, 2010f)	GenBank non-redundant protein sequences	January, 2010	BLASTp	EFSa-GMO-NL-2011-91; Part I of the Technical dossier (Song, 2010d)

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

I dokumentasjonen fra søker presenteres resultater fra en enkelt proteinkspresjonsstudie med soyalinjen DAS-68416-4 (generasjon T6, figur 3). Feltforsøkene, som ligger til grunn for studiene, ble utført på åtte lokaliteter i 2009 på representative områder for soyadyrking i USA. Forsøkene ble lagt ut som fullstendig randomiserte blokkdesign med tre gjentak per lokalitet, og inkluderte foruten testlinjen DAS-68416-4 en umodifisert kontrollsort med tilsvarende genetisk bakgrunn (cv. Maverick). I begge forsøksseriene ble det tatt prøver av bønne (frø), fôrfraksjon, røtter, samt blad på ulike tidspunkt gjennom vekstsesongen. Ekspresjonen av AAD-12- og PAT-protein ble målt ved hjelp av SDS-PAGE gelelektroforese etterfulgt av Westernblot. Proteinene på Westernblotet ble påvist med spesifikk protein-antistoff interaksjon, samt densitometriske analyse av de fargede proteinene på blotet.

Uttrykket av henholdsvis AAD-12- og PAT-proteinene kontrolleres av de konstitutive promoterene *AtUbi10* og *CsVMV*, som uttrykkes i de aller fleste vev. Nivået av AAD-12 og PAT proteinene i blad, fôrfraksjon, rotvev og frø er vist i tabellene 4 og 5. Nivåene av AAD-1 og PAT er høyest i bladvev og lavest i modne frø. Nivået av PAT i fôrfraksjon R3 (R4) (test entry 8) som er sprøytet med glufosinat viser unormalt høye verdier i forhold til de andre analysene av fôrfraksjon (R3) (se min/max i tabell 5). Analysene viser henholdsvis 58,56 – og 54,40 ng/mg tørrvekt for to av prøvene (tabell 13, Phillips and Lepping, 2010a i søknad). I nevnte referanse vises det til at de to prøvene er tatt ved utviklingsstadium R4. Søker har ikke kommentert de påviste forskjellene mellom R3 og R4 prøvene.



**Tabell 4. Nivå av AAD-12-protein i blad, fôrfraksjon, røtter og frø fra umodifisert kontroll og testlinjen DAS-68416-4, ubehandlet og sprøytet med henholdsvis glufosinat ammonium (GA), 2,4-D og GA+ 2,4-D. Resultater fra feltforsøk i USA i 2009.**

Vevstype & utviklingstrinn <sup>1</sup>	Beskrivelse	Gjennomsnitt (SD) (AAD-12 ng/g tørrvekt)	Variasjonsområde
<b>Blad</b> V5	Kontroll	ND	ND-ND
	DAS-68416-4	74,99 (8,53)	55,53-94,39
	DAS-68416-4 GA	74,78 (27,26)	19,09-152,22
	DAS-68416-4 2,4-D	81,62 (24,89)	48,90-132,69
	DAS-68416-4GA+2,4D	82,68 (23,31)	46,99-146,97
	Total gj.snitt	78,52	
V10-12	Kontroll	ND	ND-ND
	DAS-68416-4	73,98 (26,06)	26,31-161,47
	DAS-68416-4 GA	62,47 (20,69)	22,60-99,01
	DAS-68416-4 2,4-D	77,37 (34,87)	34,66-162,63
	DAS-68416-4GA+2,4D	77,84 (21,26)	38,28-129,69
	Total gj.snitt	72,92	
<b>Fôr</b> R3	Kontroll	ND	ND-ND
	DAS-68416-4	41,95 (16,59)	0,56-75,14
	DAS-68416-4 GA	46,02 (12,73)	28,35-75,67
	DAS-68416-4 2,4-D	43,76 (13,98)	23,63-73,67
	DAS-68416-4GA+2,4D	49,32 (11,97)	26,78-68,94
	Total gj.snitt	45,26	
<b>Rot</b> R3	Kontroll	ND	ND-ND
	DAS-68416-4	18,60 (5,56)	ND-29,65
	DAS-68416-4 GA	18,69 (5,21)	10,09-31,64
	DAS-68416-4 2,4-D	16,87 (3,95)	10,01-25,53
	DAS-68416-4GA+2,4D	17,61 (3,95)	9,78-25,13
	Total gj.snitt	17,94	
<b>Frø</b> R8	Kontroll	ND	ND-ND
	DAS-68416-4	22,92 (4,17)	16,29-32,18
	DAS-68416-4 GA	21,67 (4,47)	14,21-31,59
	DAS-68416-4 2,4-D	20,19 (4,16)	12,14-29,77
	DAS-68416-4GA+2,4D	21,16 (4,63)	11,51-31,97
	Total gj.snitt	21,49	

<sup>1</sup>Utviklingstrinnene er beskrevet i oversikten over ordforklaringer/forkortelser

**Tabell 5. Nivå av PAT-protein i blad, fôrfraksjon, røtter og frø fra umodifisert kontroll og testlinjen DAS-68416-4, ubehandlet og sprøytet med henholdsvis glufosinat ammonium (GA), 2,4-D og GA+ 2,4-D. Resultater fra feltforsøk i USA i 2009.**

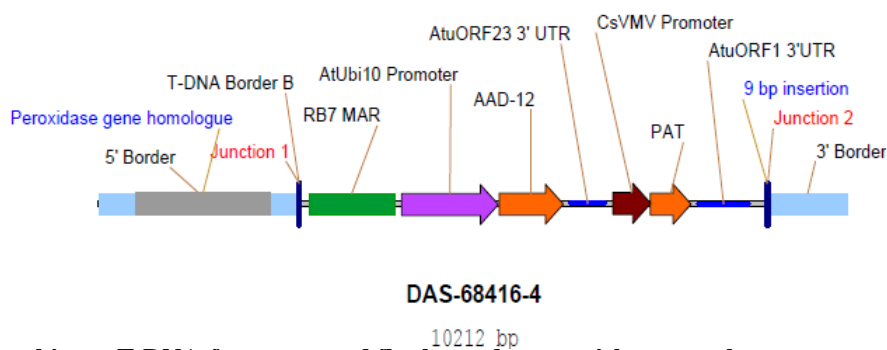
Vevstype & utviklingstrinn <sup>1</sup>	Beskrivelse	Gjennomsnitt (SD) (AAD-12 ng/g tørrvekt)	Variasjonsområde
<b>Blad</b> <b>V5</b>	Kontroll	ND	ND-ND
	DAS-68416-4	7,13 (2,80)	3,15-13,30
	DAS-68416-4 GA	6,53 (2,48)	ND-11,60
	DAS-68416-4 2,4-D	7,18 (3,14)	1,60-12,75
	DAS-68416-4GA+2,4D	7,30 (3,97)	2,25-13,65
	Total gj.snitt	7,04	
<b>V10-12</b>	Kontroll	ND	ND-ND
	DAS-68416-4	8,16 (2,30)	2,30-13,30
	DAS-68416-4 GA	7,36 (3,30)	ND-12,85
	DAS-68416-4 2,4-D	7,68 (1,60)	3,50-11,65
	DAS-68416-4GA+2,4D	7,99 (2,36)	0,28-12,30
	Total gj.snitt	7,80	
<b>Fôr</b> <b>R3</b>	Kontroll	ND	ND-ND
	DAS-68416-4	4,01 (0,85)	ND-5,34
	DAS-68416-4 GA	8,28 (13,64)	3,46-58,56
	DAS-68416-4 2,4-D	4,23 (1,01)	0,42-5,58
	DAS-68416-4GA+2,4D	4,93 (0,57)	3,04-5,90
	Total gj.snitt	5,36	
<b>Rot</b> <b>R3</b>	Kontroll	ND	ND-ND
	DAS-68416-4	1,79 (0,42)	ND-2,73
	DAS-68416-4 GA	1,86 (0,45)	0,72-2,58
	DAS-68416-4 2,4-D	1,90 (0,36)	0,90-2,60
	DAS-68416-4GA+2,4D	1,84 (0,45)	0,85-2,93
	Total gj.snitt	1,85	
<b>Frø</b> <b>R8</b>	Kontroll	ND	ND-ND
	DAS-68416-4	2,66 (0,46)	1,80-3,71
	DAS-68416-4 GA	2,66 (0,37)	1,81-3,52
	DAS-68416-4 2,4-D	2,57 (0,40)	1,91-3,34
	DAS-68416-4GA+2,4D	2,62 (0,44)	1,55-3,41
	Total gj.snitt	2,63	

<sup>1</sup>Utviklingstrinnene er beskrevet i oversikten over ordforklaringer/forkortelser

I henhold til søkers dokumentasjon er det gjort studier for å påvise endogene åpne leserammer som koder for mer enn 8 aminosyrer i 5'- og 3' flankerende ende til det rekombinante DNA-fragmentet i soyaens genom. Det ble søkt i alle seks leserammer. Det ble ikke påvist slike endogene åpne leserammer ved 3'-enden. Totalt ble det påvist 12 nye leserammer, åtte av dem ble vurdert mhp allergenisitet og toksisitet. Fire av leserammene ble forkastet fordi de besto av 4 aminosyrer. Når det gjelder de åtte åpne leserammene i endene av innskuddet ble det undersøkt for polypeptider som er lik eller større enn 8 aminosyrer. Det er ikke påvist polypeptider som kan uttrykkes fra hver ende av innskuddet. Videre er det utført søk etter potensielle åpne leserammer i de genomiske flankesekvensene på hver side av insertet. Analysene viser at flankesekvensene er genomisk DNA, og

de teoretiske analysene indikerer ingen åpne leserammer i de flankesekvensene som ble undersøkt. For analyser av mulige polypeptider fra hver leseramme er det brukt oppdaterte versjoner av FARRP Allergen database 2010 (allergendatabase), BLOSUM62 (identifiserer sekvenslikheter som omfatter gaps), SWISS-PROT, PIR (Protein Information Resource), PRF (Protein Research Foundation) og PDB (Protein Data Bank). Databasene viser ingen biologisk relevante strukturelle likheter til allergener, toksiner eller farmakologiske aktive proteiner. Resultatene fra disse teoretiske analysene viser at dersom noen av disse leserammene skulle bli transkribert, er det lite sannsynlig at dette vil resultere i polypeptid(er) som medfører potensielle toksiske, allergene eller har andre uheldige helsemessige konsekvenser.

Ved sekvensering av 5'- og 3' flankerende ende til det rekombinante DNA-fragmentet ble det påvist at insertet antageligvis er satt inn i et lokus nær 3'-enden av et peroksidase gen, se figur 2.

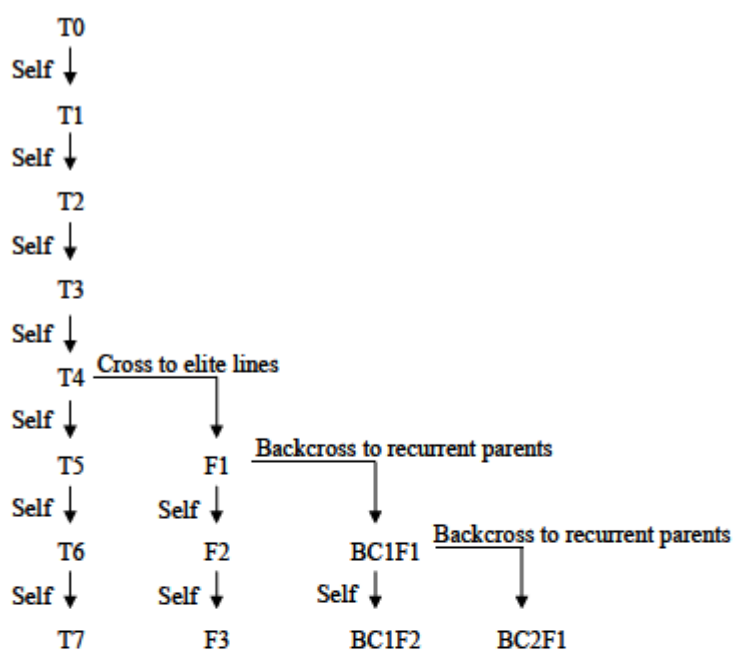


**Figur 2.** Rekombinant T-DNA-fragment med flankerende genomiske soya sekvenser.

## 2.4 Nedarving og stabilitet av innsatt DNA

I henhold til dokumentasjonen fra søker er genetisk stabilitet undersøkt ved analyse av genomisk DNA fra tre ulike foredlingsgenerasjoner, T3-T5 (A og B) (se figur 3), som også ble benyttet til den molekylære karakteriseringen av soyalinjen. For å analysere stabiliteten til T-DNA innskuddet ble DNA fra T3, T4 og T5 (T5-A og T5-B) undersøkt både vha "Specific lateral flow strip test kit" og Southern blot. Resultatene fra disse analysene viser at det rekombinante DNA-innskuddet er integrert i genomet og nedarves stabilt over generasjoner.

Fenotypisk stabilitet er vist ved spaltingsdata fra en foredlingsgenerasjon ( $F_2$ ) (figur 3). 146 frøplanter fra  $F_2$  ble testet for tilstedeværelse eller fravær av *AAD-12*-protein vha "Specific lateral flow strip test kit". Segregasjons-analysene (chi-kvadrat-test) på spaltingsdata fra  $F_2$  viser forventet spaltingsstall for uttrykk av *AAD-12*-protein på 3:1. Det konkluderes med at det rekombinante DNA-fragmentet følger mønsteret for mendelsk nedarving av et enkelt, dominant lokus (forventet hemizygot nedarving).



	<i>DAS-68416-4</i> <i>Soybean</i>	
<i>Analysis</i>	<i>Generation Used</i>	<i>Control</i>
<i>Molecular Analysis</i>	<i>T3, T4, T5</i>	<i>Maverick</i>
<i>Segregation Analysis</i>	<i>F2</i>	<i>Maverick</i>
<i>Protein Characterization</i>	<i>T5</i>	<i>Maverick</i>
<i>Protein Expression</i>	<i>T6</i>	<i>Maverick</i>
<i>Agronomics</i>	<i>T6</i>	<i>Maverick</i>
<i>Germination/Dormancy</i>	<i>T6</i>	<i>Maverick</i>
<i>Composition</i>	<i>T6</i>	<i>Maverick</i>
<i>Efficacy</i>	<i>T4</i>	<i>Maverick</i>

Figur 3. Kryssingsskjema for generering av spaltingsdata fra DAS-68416-4. Generasjoner som har inngått i analyse av genetisk stabilitet, molekylære analyser m.m.

## 2.5 Vurdering basert på tilgjengelig datagrunnlag

Den transgene soyalinjen DAS-68416-4 har fått tilført genene *aad-12*- og *pat*. I henhold til søkers informasjon vedrørende integreringsplass og flankesekvenser til de integrerte transgenene, samt analyser vha Southern blot og sekvensering er det grunn til å tro at transgenene sitter i et lokus i genomet. Det konkluderes med at nedarvingen av *aad12*- og *pat*-genene i soyalinjen DAS-68416-4 følger mønsteret for mendelsk nedarving av et enkelt, dominant lokus, og at fusjonsproteiner ikke uttrykkes i DAS-68416-4.

Faggruppen vurderer karakteriseringen av det rekombinante DNA-innskuddet i DAS-68416-4, og den fysiske, kjemiske og funksjonelle karakteriseringen av proteinene til å være tilfredsstillende.

Faggruppen har ikke identifisert noen risiko knyttet til det som framkommer av den molekylærbiologiske karakteriseringen av det rekombinante innskuddet i soyalinjen.

## 3 Komparative analyser

### 3.1 Valg av komparator og produksjon av plantemateriale for komparative analyser

I henhold til søkers dokumentasjon er den transgene soyalinjen DAS-68416-4 testet i feltforsøk i USA vekstsesongen 2009. Feltforsøkene for komparative analyser av ernæringsmessige, fenotypiske og agronomiske karakterer ble utført på til sammen åtte ulike lokaliteter i statene Arkansas, Illinois (2 lokaliteter), Indiana, Iowa, Missouri (2 lokaliteter) og Nebraska (2 lokaliteter). I tillegg ble det etablert to forsøksfelt i Canada (Ontario). På grunn av tidlig frost nådde ikke plantene modningsstadiet, og forsøket ble ikke høstet. I henhold til søker var forsøksfeltene lokaliserte i områder med kommersiell soyaproduksjon i USA, og representerer ulike dyrkingsbetingelser og miljøforhold.

Den konvensjonelle soyasorten "Maverick", med tilsvarende genetisk bakgrunn som testlinjen, men som ikke uttrykker AAD-12- og PAT-protein, ble benyttet som umodifisert kontroll. I tillegg var det inkludert seks umodifiserte, kommersielt tilgjengelige soyalinjer som referansesorter i forsøkene (tre sorter på hvert forsøkssted). De kommersielle sortene var av samme tidlighetsklasse som testlinje og umodifisert kontroll, og var inkludert for å vise naturlig variasjonsområde for de enkelte analyserte komponentene.

Testlinje, komparator og referansesorter ble plantet i fullstendig randomiserte blokkdesign med fire gjentak på hver lokalitet. Hver forsøksrute bestod av åtte om lag 6 m lange rader, med en radavstand på 0,75 cm. Det ble tatt ut prøver fra tre gjentak per lokalitet for analyser av ernæringsmessig viktige komponenter både hos test- og kontrollinjen, mens prøver fra ett gjentak ble lagt til grunn for analyser av referansesortene.

Utvalgte forsøksruter med testlinjen ble sprøytet med herbicider med henholdsvis 2,4D (preparat Weedar 64), glufosinat-ammonium (GA) (preparat Liberty) og en kombinasjon av 2,4D og GA. Sprøyting med 2,4D ble foretatt før oppspiring, og på vekststadiene V4 og R2, mens glufosinat ble benyttet to ganger i løpet av vekstsesongen (vekststadiene V4 og V6-R2). Det ble benyttet maksimal tillatt dose av begge virkestoffene, dvs. 1,12 kg ae/ha av 2,4-D og henholdsvis 0,37 kg ai/ha og 0,45 kg ai/ha ved 1. og 2. sprøyting med GA. Søker viser ellers til at dyrkingsregimet for øvrig var i henhold til vanlig praksis i den enkelte region der forsøkene var lokaliserte.

#### Statistiske analyser

I henhold til søkers dokumentasjon er det utført variansanalyse over og innen lokaliteter for de enkelte karakterene. For analyser over lokaliteter ble det benyttet en blandet variansanalysemodell, med forsøksledd (genotype) som fast effekt, og sted, blokk innen lokalitet og samspill sted x forsøksledd som tilfeldige effekter (se Phillips & Lepping 2010b). Effekt av behandling/forsøksledd ble estimert ved hjelp av F-test, og parede t-tester ble kjørt mellom ubehandlede ledd (umodifisert kontroll og usprøytet DAS-68416-4), DAS-68416-4 sprøytet med GA, DAS-68416-4 sprøytet med 2,4D og DAS-68416-4 sprøytet med GA og 2,4D. I tillegg er det kjørt deskriptiv statistikk (gj. snitt, standardfeil, min. og maks. verdi) for testlinjen og kontroll.

På grunn av det store antall kontraster ved slike multiple tester, vil sannsynligheten for å detektere falske signifikante effekter være høy ( $1 - 0,95^{\text{antall sammenligninger}}$ ). 4 parvise sammenligninger per parameter resulterer i 276 sammenligninger for ernæringsmessige parametre. Sannsynligheten for å påvise en eller flere falske positive effekter vil derfor være  $>99,99\%$  for ernæringskarakterer. Dersom signifikansnivået for hver enkelt test ikke justeres vil sannsynligheten for type I feil (feilaktig forkastning av nullhypotesen) bli stor. I disse studiene har søker valgt å benytte "False discovery rate"

(FDR) (Benjamini & Hochberg 1995) for å korrigere p-verdiene fra den multiple testingen og dermed redusere problemet med falske positive effekter. Detekterte forskjeller ble vurdert signifikant hvis den FDR-justerte p-verdien var under 0,05.

Søker har ikke utført multivariat analyse (MANOVA) på datasettene, eller analysert materiale som et split-plot design (split-plot ANOVA). Det er ikke foretatt statistiske sammenligninger mellom testlinje og referansesorter, men det er beregnet referanseområde for hver karakter basert på minimums- og maksimumsverdier for de kommersielle sortene.

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

### 3.2 Analyser av ernæringsmessige komponenter

Med unntak for analyser av fosfatider i lecitin og aminosyrer i proteinisolat, er valg av analyseparametere gjort i henhold til OECDs konsensusdokument for soya (OECD 2001) (tabell 3). Det er foretatt en rekke analyser av hovedkomponenter i fôr og bønne, og resultatene av analysene er sammenlignet med analytiske data for soya fra databasen ILSI Crop Composition (ILSI 2008).

**Tabell 3. OECDs anbefalte analyser av ernæringskomponenter i soya og soyaprodukter til bruk som næringsmiddel (ENV/JM/FOOD(2009)5/REV2/ (OECD 2009).**

Parametere	Frø	Soyaolje	Proteinisolat	Lecitin
Vanninnhold	X			
Råprotein	X			
Fett	X			
Totalfiber	X			
Karbohydrater	X			
Aske	X			
Aminosyrer	X		X	
Fettsyrer	X	X		
Vitamin E, K	X			
Mineraler	X			
Fytinsyre	X			
Lektiner	X			
Isoflavoner	X			
Fosfatider	x			x

### **Fôrfraksjon**

Fôrfraksjonen, hel plante høstet mellom utviklingstrinn R6 og belgstadiet, ble analysert med hensyn på innhold av aske, fett, protein, kalorier, total fiber, vann, ADF (acid detergent fiber), NDF (neutral detergent fiber) og karbohydrater (beregnet, ikke analysert). På grunn av at bruksområdet for søknaden kun omfatter import og prosessering og ikke dyrking, har Dow AgroSciences valgt å ikke inkludere analysene av fôrfraksjonen i Part I Technical dossier. Det henvises i stedet til et vedlegg til søknaden (Phillips & Lepping 2010b).

Tabell 4 viser resultater fra analyser av fôrfraksjonen som er dokumentert i studien utført av Phillips & Lepping (2010b). Det ble ikke påvist signifikante forskjeller mellom kontroll og testlinjene ved analyse over steder for aske, fett, vann, ADF og NDF. Variansanalysen over lokaliteter og behandlinger viser signifikante forskjeller mellom umodifisert kontroll og testlinjen for protein (tabell 4). Resultater fra de parede t-testene (justerte p-verdier) viser signifikante forskjeller mellom kontroll og DAS-68416-4 sprøytet med GA ( $p < 0,05$ ) for denne parameteren.

Verdiene ligger innenfor toleranseintervallene for de seks referansesortene som inngikk i studien og innenfor typiske verdier for andre soyasorter som er rapportert i ILSI Crop Composition Database (ILSI 2008) og OECDs konsensusdokument for soya (2009).

### **Soyabønne**

I henhold til søkers dokumentasjon ble følgende komponenter analysert i hel soyabønne: protein, fett, aske, karbohydrater, ADF, NDF, total fiber, råfiber, vann, karbohydrater, aminosyrer (18), fettsyrer (22 syrer fra C8-C22), fosfor, jern, kalium, kalsium, magnesium, vitaminer, isoflavoner (daidzein, glycitein, genistein), oligosakkaridene raffinose og staktyose, sekundære metabolitter og anti-næringsstoffene (lektiner, trypsinhemmer, og fytinsyre).

#### *Hovedkomponenter*

Følgende hovedkomponenter i soyabønne er analysert: vann, protein, fett, aske, ADF, NDF, råfiber og karbohydrater (tabell 5). Analysene ble utførte under god laboratoriepraksis (GLP). Variansanalysen over lokaliteter og behandlinger viser signifikante forskjeller mellom umodifisert kontroll og testlinjen for protein (tabell 5). Resultater fra de parede t-testene (justerte p-verdier) viser signifikante forskjeller mellom kontroll og DAS-68416-4 sprøytet med 2,4-D ( $p < 0,05$ ) for denne parameteren. Verdiene ligger innenfor toleranseintervallene for de seks referansesortene som inngikk i studien og innenfor typiske verdier for andre soyasorter som er rapportert i ILSI Crop Composition Database (ILSI 2008) og OECDs konsensusdokument for soya (2001). Det ble påvist signifikante forskjeller mellom DAS-68416-4 og nær-isogen kontroll for protein ved analyse over steder ( $p < 0,05$ ).



**Tabell 4. Resultater fra variansanalyse over steder av fôrfraksjon fra umodifisert kontrollinje cv. Maverick og testlinjen DAS-68416-4 (ubehandlet eller sprøytet med henholdsvis glufosinat ammonium (GA), 2,4-D eller GA + 2,4-D). Fra feltforsøk i USA 2009.**

Komponenter analysert (enheter)*	Gjennomsnitt ± S.E. [Variasjonsområde] (p-verdi, justert p-verdi t-test)					Referansesorter [Min-maks]	Litteraturverdier [Min-maks]
	Nær-isogen kontroll	DAS-68416-4 usprøytet	DAS-68416-4 GA	DAS-68416-4 2,4-D	DAS-68416-4 GA + 2,4-D		
Protein (% t.v.) (p=0,015)	20,6 ± 0,68 [14,6-26]	20,38 ± 0,68 [14,6-23,8] (0,507, 0,762)	19,57 ± 0,68 [14,4 – 23,4] (0,003, 0,043)	19,85 ± 0,68 [15,3 – 22,6] (0,028, 0,151)	19,75 ± 0,68 [15,4 – 22,4] (0,014, 0,092)	[14,1 – 25]	[ 11,2 – 24,71]
Fett (% t.v.) (p=0,93)	3,03± 0,23 [1,43 – 4,86]	3,17 ± 0,23 [1,92-5,02] (0,488, 0,756)	3,1 ± 0,23 [2,26-5,99] (0,713, 0,854)	3,19 ± 0,23 [2,27 – 5,19] (0,145, 0,68)	3,1 ± 0,23 [1,78-6,44] (0,722, 0,856)	[1,69 – 4,54 ]	[1,302 – 5,132]
Aske (% t.v.) (p=0,352)	9,57 ± 0,64 [7,34 – 12,3]	10,17 ± 0,64 [7,05-12,2] (0,309, 0,586)	10,6 ± 0,64 [6,99 – 17,1] (0,087, 0,28)	10,44 ± 0,64 [7,59 – 15,9] (0,142, 0,377)	10,64 ± 0,65 [7,38 – 18,4] (0,075, 0,276)	[7,77 - 16]	[6,72 – 10,78]
Vann (% råvekt) (p=0,151)	77,5 ± 1 [72,8 – 82,9]	78 ± 1 [72,7 – 81,7] (0,153, 0,396)	77,4 ± 1 [72,2 - 82,1] (0,758, 0,874)	77,3 ± 1 [70,2 – 82,1] (0,551, 0,795)	77,1 ± 1 [69,4 – 81, 9] (0,305, 0,586)	[72,6 – 82,7]	[73,5 – 81,6]
Karbohydrater (% t.v.) (p=0,961)	66,8 ± 1,3 [60,4- 75,8]	66,3 ± 1,3 [61,1 – 75,5] (0,504, 0,762)	66,7 ± 1,3 [59,4- 76] (0,947, 0,986)	66,5 ± 1,3 [58,2 – 74,1] (0,687, 0,84)	66,5 ± 1,3 [55,6 – 75,4] (0,717, 0,854)	[57,8 – 75,5]	[59,8 – 74,7]
ADF (% t.v.) (p=0,331)	30,2 ± 1,3 [20,2 – 38]	29,7 ± 1,3 [21,6-37,9] (0,56, 0,795)	29 ± 1,3 [21,5 - 35,8] (0,126, 0,343)	30,2 ± 1,3 [21,5 - 39,9] (0,659, 0,828)	29,1 ± 1,3 [20,3 – 43,4] (0,18, 0,446)	[19,8 – 42,7]	[32 - 38]
NDF (% t.v.) (p=0,492)	35,8 ± 1,3 [23,1 - 43,8]	35,3 ± 1,3 [24,3-44,8] (0,617, 0,821)	34,7 ± 1,3 [27,3 – 45,1] (0,242, 0,53)	35,3 ± 1,3 [27 - 45,4] (0,659, 0,828)	34,2 ± 1,3 [24,4 – 44,6] (0,107, 0,31)	[23,1 – 51,4]	[34 - 40]

<b>Tabell 4, forts.</b>							
Kalsium (mg/100g t.v.) (p=0,515)	1440 ± 40 [1120 - 1650]	1460 ± 40 [1070 -1690 ] (0,48, 0,751)	1440 ± 40 [1170-1720] (1,1)	1430 ± 40 [1140 - 2250] (0,843, 0,94)	1400 ± 40 [1100 - 1590] (0,283, 0,575)	[900 - 1830]	NR
Fosfor (mg/100g t.v.) (p=0,239)	300 ± 10 [241 - 367]	300 ± 10 [229-399] (0,714, 0,854)	290 ± 10 [236-371] (0,516, 0,762)	300 ± 10 [242-527] (0,332, 0,608)	290 ± 10 [220 - 374] (0,238, 0,528)	[230 - 400]	NR

**Tabell 5. Resultater fra analyser av hovedkomponenter og fiber i bønner fra umodifisert kontrollinje cv. Maverick og testlinjen DAS-68416-4 (ubehandlet eller sprøytet med henholdsvis glufosinat ammonium (GA), 2,4-D eller GA + 2,4-D). Fra feltforsøk i USA 2009.**

Komponenter analysert (enheter)*	Gjennomsnitt ± S.E. [Variasjonsområde] (p-verdi, justert p-verdi t-test)					Referansesorter [Min-maks]	Litteraturverdier [Min-maks]	
	(F-test <sup>1</sup> )	Nær-isogen kontroll	DAS-68416-4 usprøytet	DAS-68416-4 GA	DAS-68416-4 2,4-D			DAS-68416-4 GA + 2,4-D
Protein (% t.v.) (p=0,007)		38,7 ± 0,5 [34,5 – 40,2]	38,2 ± 0,5 [33,7 – 40] (0,031, 0,16)	38,1 ± 0,5 [34,9 – 39,9] (0,011, 0,084)	37,8 ± 0,5 [32,9 – 39,7] (<0,001, 0,007)	38,1 ± 0,5 [34,3 – 39,6] (0,014, 0,092)	[32,4 - 43]	[32 – 45,48]
Fett (% t.v.) (p=0,127)		18,01 ± 0,59 [12,9 - 22]	18,36 ± 0,59 [15,5 – 21,6] (0,191, 0,460)	18,48 ± 0,59 [16 - 22] (0,084, 0,28)	18,54 ± 0,59 [15,9 – 22,2] (0,054, 0,228)	18,71 ± 0,59 [15,6 - 22] (0,013, 0,092)	[13,9 – 23,6 ]	[8,1 – 24,7]
Aske (% t.v.) (p=0,515)		5,27 ± 0,18 [4,7 – 6]	5,49 ± 0,18 [4,83 – 7,04] (0,313, 0,586)	5,56 ± 0,18 [4,66 – 10,3] (0,185, 0,454)	5,24 ± 0,18 [4,42 – 5,85] (0,885, 0,953)	5,39 ± 0,18 [4,82 – 8,09] (0,583, 0,8)	[4,22 – 9,35]	[3,89 – 6,99]
Vann (% råvekt) (p=0,567)		13,7 ± 0,9 [10,8 – 16,8]	13,8 ± 0,9 [10,2 – 19,4] (0,853 – 0,941)	13,7 ± 0,9 [10,1 – 19,1] (1, 1)	13,2 ± 0,9 [9,78 – 17,7] (0,314, 0,586)	13,2 ± 0,9 [10,2 – 17,3] (0,295, 0,586)	[10,5 – 17,5]	[4,7 – 34,4]
Karbohydrater (% t.v.) (p=0,278)		38,1 ± 0,6 [35-44,5]	37,9 ± 0,6 [33,5 – 41,3] (0,647, 0,828)	37,8 ± 0,6 [32,9 – 40,9] (0,434, 0,695)	38,4 ± 0,6 [33,9 – 41,9] (0,298, 0,586)	37,8 ± 0,6 [34,5 – 41,1] (0,323, 0,595)	[31 – 41,7]	[29,6 – 50,2]
ADF (% t.v.) (p=0,953)		16 ± 0,8 [12,6 – 23,1]	16,5 ± 0,8 [12 – 22,5] (0,517, 0,762)	16,2 ± 0,8 [10,6 – 22,1] (0,84, 0,94)	16,3 ± 0,8 [10,5 – 22,4] (0,654, 0,828)	16 ± 0,8 [11,8 - 21] (0,992, 0,999)	[10,1 – 22,7]	[7,81 – 18,61]
NDF (% t.v.) (p=0,538)		18,1 ± 0,8 [14,1 - 26]	18,9 ± 0,8 [12 - 24] (0,266, 0,555)	18,5 ± 0,8 [13,6 – 25,5] (0,581, 0,8)	18,6 ± 0,8 [14,8 – 23,4] (0,498, 0,758)	17,8 ± 0,8 [13-24,8] (0,626, 0,823)	[12,8 – 25,7]	[8,53 – 21,25]

<b>Tabell 5, forts.</b>							
TDF (% t.v.) (p=0,727)	21,5 ± 0,5 [17,6 – 27,5]	22,1 ± 0,5 [18 – 28,2] (0,397, 0,677)	21,2 ± 0,5 [14,6 – 27,2] (0,61, 0,821)	21,6 ± 0,5 [18-26,9] (0,908, 0,963)	21,4 ± 0,5 [18,9 – 25,5] (0,878, 0,952)	[17,4 – 28,2]	NR

**Tabell 6. Resultater fra analyser av fettsyrer i bønner fra umodifisert kontrollinje cv. Maverick og testlinjen DAS-68416-4 (ubehandlet eller sprøytet med henholdsvis glufosinat ammonium (GA), 2,4-D eller GA + 2,4-D). Fra feltforsøk i USA 2009.**

Komponent er analysert (% av totale fettsyrer) (F-test <sup>1</sup> )	Gjennomsnitt ± S.E. [Variasjonsområde] (p-verdi, justert p-verdi t-test)					Referansesorter [Min-maks]	Litteraturverdier [Min-maks]
	Nær-isogen kontroll	DAS-68416-4 usprøytet	DAS-68416-4 GA	DAS-68416-4 2,4-D	DAS-68416-4 GA + 2,4-D		
Palmitinsyre (0,688)	10,72 ± 0,23 [9,8 – 11,43]	10,83 ± 0,23 [9,81-12,65] (0,339-0,617)	10,88 ± 0,23 [10,04-12,84] (0,157, 0,403)	10,83 ± 0,23 [10,15-12,56] (0,31, 0,586)	10,82 ± 0,23 [10,03-12,58] (0,394, 0,677)	[8,87 – 11,89]	[9,55-15,77]
Stearinsyre (p=0,331)	4,464±0,075 [4,059-4,921]	4,414 ± 0,075 [4,09-5,053] (0,555, 0,795)	4,361 ± 0,075 [4,007-5,071] (0,227, 0,516)	4,376 ± 0,075 [4,145-4,614] (0,3, 0,586)	4,291 ± 0,075 [3,967-4,595] <b>(0,046, 0,207)</b>	[3,055 – 4,428]	[2,7-5,88]
Oljesyre (p<0,001)	22,85 ± 0,48 [20,76-24,95]	20,96 ± 0,48 [19,09-23,7] <b>(&lt;0,001, &lt;0,001)</b>	20,5 ± 0,48 [18,55-23,27] <b>(&lt;0,001, &lt;0,001)</b>	20,97 ± 0,48 [19,33– 24,77] <b>(&lt;0,001, &lt;0,001)</b>	20,66 ± 0,48 [18,58-24,82] <b>(&lt;0,001, &lt;0,001)</b>	[18,41 – 28,57]	[14,3-32,3]
Linolsyre (p<0,001)	53,04 ± 0,42 [51,41 – 54,59]	54,56 ± 0,42 [51,19-56,38] <b>(&lt;0,001, 0,005)</b>	54,83 ± 0,42 [51,62-56,71] <b>(&lt;0,001, &lt;0,001)</b>	54,61 ± 0,42 [50,97-55,95] <b>(&lt;0,001, 0,004)</b>	54,79 ± 0,42 [51,23-56,61] <b>(&lt;0,001, &lt;0,001)</b>	[49,5 – 57,36]	[42,3-58,8]

<b>Tabell 6, forts.</b>							
Linolensyre (p< <b>0,001</b> )	8,17 ± 0,39 [6,67 – 9,86]	8,49 ± 0,39 [6,57-10,19] <b>(0,001, 0,021)</b>	8,68 ± 0,39 [6,21-10,61] <b>(&lt;0,001, &lt;0,001)</b>	8,46 ± 0,39 [6,38-10,18] <b>(0,003, 0,039)</b>	8,69 ± 0,39 [6,5-10,69] <b>(&lt;0,001, &lt;0,001)</b>	[6,53 – 10,86]	[3-12,52]
Arkidonsyre (p=0,478)	0,3226 ± 0,007 [0,3016-0,347]	0,317 ± 0,007 [0,291-0,382] (0,371, 0,653)	0,3141 ± 0,007 [0,288-0,388] (0,206, 0,480)	0,314 ± 0,0072 [0,2904-0,3636] (0,198, 0,470)	0,3109 ± 0,0072 [0,288-0,3674] (0,085, 0,28)	[0,2514–0,3763]	[0,163-0,482]
Eikosensyre (p=0,337)	0,159 ± 0,009 [<LOQ-0,203]	0,163 ± 0,009 [<LOQ-0,218] (0,115, 0,317)	0,1611 ± 0,009 [<LOQ–0,2204] (0,342, 0,618)	0,1628 ± 0,0091 [<LOQ-0,2089] (0,099, 0,298)	0,1594 ± 0,0091 [<LOQ-0,2095] (0,8, 0,911)	[<LOQ-0,2095]	[0,14-0,35]
Behensyre (p=0,948)	0,3179 ± 0,01 [0,2835-0,387]	22,1 ± 0,5 [18 – 28,2] (0,397, 0,677)	0,3149 ± 0,095 [0,2848-0,3977] (0,535, 0,78)	0,315 ± 0,0095 [0,2868-0,4169] (0,546, 0,793)	0,3154 ± 0,0095 [0,2879-0,3948] (0,612, 0,821)	[0,2617-0,4196]	[0,277-0,595]

**Tabell 7. Resultater fra analyser av aminosyrer i bønner fra umodifisert kontrollinje cv. Maverick og testlinjen DAS-68416-4 (ubehandlet eller sprøytet med henholdsvis glufosinat ammonium (GA), 2,4-D eller GA + 2,4-D). Fra feltforsøk i USA 2009.**

Komponent er analysert (% t.v.)	Gjennomsnitt ± S.E. [Variasjonsområde] (p-verdi, justert p-verdi t-test)					Referansesorter [Min-maks]	Litteraturverdier [Min-maks]	
	(F-test <sup>1</sup> )	Nær-isogen kontroll	DAS-68416-4 usprøytet	DAS-68416-4 GA	DAS-68416-4 2,4-D			DAS-68416-4 GA + 2,4-D
Alanin (p=0,026)		1,76 ± 0,02 [1,62-1,86]	1,73 ± 0,02 [1,52-1,82] (0,006, 0,06)	1,73 ± 0,02 [1,56-1,82] (0,003, 0,041)	1,74 ± 0,02 [1,63-1,83] (0,036, 0,176)	1,74 ± 0,02 [1,62-1,82] (0,075, 0,276)	[1,5-1,96]	[1,51-2,1]
Arginin (p=0,017)		2,93±0,04 [2,63-3,14]	2,84 ± 0,04 [2,41-3,05] (0,005, 0,058)	2,83± 0,04 [2,39-3,01] (0,002, 0,03)	2,87 ± 0,04 [2,59-3,06] (0,038, 0,184)	2,85 ± 0,04 [2,51-3,06] (0,031, 0,092)	[2,41-3,41]	[2,29-3,4]
Asparagin-syre (p=0,078)		4,46 ± 0,06 [4,03-4,76]	4,37 ± 0,06 [3,71-4,66] (0,019, 0,116)	4,36 ± 0,06 [3,76-4,64] (0,009, 0,076)	4,4 ± 0,06 [3,99- 4,64] (0,096, 0,295)	4,4 ± 0,06 [3,91-4,76] (0,08, 0,276)	[3,66-5,02]	[3,81-5,12]
Cystein (p=0,548)		0,572 ± 0,013 [0,502-0,656]	0,563 ± 0,013 [0,502-0,692] (0,23, 0,518)	0,568 ± 0,013 [0,499-0,658] (0,558, 0,795)	0,563 ± 0,013 [0,502-0,682] (0,227, 0,516)	0,573 ± 0,013 [0,519-0,682] (0,971, 0,987)	[0,475-0,686]	[0,37-0,808]
Glutamin-syre (p=0,04)		6,63 ± 0,11 [5,81-7,08]	6,45 ± 0,11 [5,26-7,06] (0,023, 0,129)	6,38 ± 0,11 [5,33-6,95] (0,003, 0,039)	6,49 ± 0,11 [5,62-6,91] (0,077, 0,276)	6,49 ± 0,11 [5,56-7,14] (0,079, 0,276)	[5,47-7,5]	[5,84-8,2]
Glycin (p=0,088)		1,74 ± 0,02 [1,58-1,87]	1,71 ± 0,02 [1,46-1,81] (0,03, 0,157)	1,7 ± 0,02 [1,47-1,82] (0,009, 0,076)	1,72 ± 0,02 [1,58-1,82] (0,143, 0,377)	1,71 ± 0,02 [1,56-1,81] (0,075, 0,276)	[1,47-1,98]	[1,46-2]
Histidin (p=0,277)		1,036 ± 0,014 [0,868-1,26]	1,034 ± 0,014 [0,93-1,11] (0,885-0,953)	1,006 ± 0,014 [0,812-1,08] (0,081, 0,276)	1,033 ± 0,014 [0,918-1,14] (0,851, 0,941)	1,014 ± 0,014 [0,926-1,11] (0,192, 0,460)	[0,832-1,25]	[0,88-1,22]

<b>Tabell 7, forts.</b>							
Isoleucin (p=0,52)	0,89 ± 0,02 [1,73-2,06]	1,87 ± 0,02 [1,59-2] (0,253, 0,537)	0,86 ± 0,02 [1,59-1,97] (0,086, 0,28)	1,87 ± 0,002 [1,73-2,01] (0,402, 0,677)	1,87 ± 0,02 [1,68-1,98] (0,401, 0,677)	[1,58-2,13]	[1,54-2,08]
Leucin (p=0,289)	3±0,04 [2,71-3,21]	2,96±0,04 [2,55-3,14] (0,091, 0,288)	2,95±0,04 [2,49-3,14] <b>(0,041, 0,194)</b>	2,97±0,04 [2,69-3,17] (0,278, 0,569)	2,97±0,04 [2,64-3,17] (0,202, 0,474)	[2,45-3,39]	[2,2-4]
Lysin (p=0,067)	2,62±0,03 [2,4-2,83]	2,56±0,03 [2,18-2,84] (0,074, 0,276)	2,53±0,03 [2,23-2,78] <b>(0,015, 0,092)</b>	2,61±0,03 [2,34-2,77] (0,613, 0,821)	2,55±0,03 [2,3-2,79] <b>(0,042, 0,194)</b>	[2,08-3]	[2,29-2,84]
Metionin (p= <b>0,01</b> )	0,536±0,01 [0,45-0,624]	0,546±0,01 [0,461-0,632] (0,253, 0,537)	0,522±0,01 [0,423-0,611] (0,109, 0,31)	0,515±0,01 [0,466-0,575] <b>(0,021, 0,124)</b>	0,526±0,01 [0,459-0,624] (0,27, 0,56)	[0,409-0,619]	[0,431-0,681]
Fenylalanin (p=0,066)	2,01±0,03 [1,8-2,18]	1,96±0,03 [1,69-2,1] <b>(0,01, 0,079)</b>	1,96±0,03 [1,66-2,09] <b>(0,012, 0,088)</b>	1,98±0,03 [1,78-2,12] (0,075, 0,276)	1,97±0,03 [1,74-2,11] (0,059-0,247)	[1,64-2,28]	[1,6-2,35]
Prolin (p= <b>0,027</b> )	2,03±0,03 [1,79-2,17]	2±0,03 [1,67-2,12] (0,086, 0,28)	1,97±0,03 [1,72-2,13] <b>(0,002, 0,03)</b>	1,99±0,03 [1,71-2,12] <b>(0,015, 0,092)</b>	2±0,03 [1,7-2,16] (0,101, 0,301)	[1,64-2,22]	[1,69-2,28]
Serin (p=0,2)	1,95±0,03 [1,76-2,12]	1,92±0,03 [1,66-2,08] (0,176, 0,441)	1,9±0,03 [1,66-2,03] <b>(0,022, 0,129)</b>	1,94±0,03 [1,75-2,1] (0,441-0,701)	1,92±0,03 [1,74-2,11] (0,149-0,389)	[1,64-2,29]	[1,11-2,48]
Treonin (p=0,064)	1,62±0,02 [1,49-1,73]	1,59±0,02 [1,41-1,67] <b>(0,028, 0,151)</b>	1,59±0,02 [1,39-1,68] <b>(0,006, 0,06)</b>	1,6±0,02 [1,5-1,73] (0,109, 0,31)	1,6±0,02 [1,47-1,67] <b>(0,036, 0,176)</b>	[1,34-1,82]	[1,14-1,89]
Tryptofan (p=0,909)	0,591±0,007 [0,52-0,679]	0,589±0,007 [0,541-0,666] (0,865, 0,942)	0,594±0,007 [0,525-0,686] (0,736, 0,860)	0,597±0,007 [0,555-0,659] (0,495, 0,758)	0,59±0,007 [0,527-0,665] (0,959, 0,986)	[0,494-0,666]	[0,356-0,67]



Tabell 7 forts.							
Valin (p=0,041)	1,97±0,03 [1,78-2,16]	1,93±0,03 [1,61-2,07] (0,008, 0,071)	1,93±0,03 [1,65-2,05] (0,006, 0,058)	1,94±0,03 [1,73-2,08] (0,047, 0,21)	1,94±0,03 [1,71-2,05] (0,074, 0,276)	[1,59-2,17]	[1,5-2,44]

Tabell 8. Resultater fra analyser av vitaminer i bønner fra umodifisert kontrollinje cv. Maverick og testlinjen DAS-68416-4 (ubehandlet eller sprøytet med henholdsvis glufosinat ammonium (GA), 2,4-D eller GA + 2,4-D). Fra feltforsøk i USA 2009.

Komponent er analysert (mg/kg t.v.)  (F-test <sup>1</sup> )	Gjennomsnitt ± S.E. [Variasjonsområde] (p-verdi, justert p-verdi t-test)					Referansesorter [Min-maks]	Litteraturverdier [Min-maks]
	Nær-isogen kontroll	DAS-68416-4 usprøytet	DAS-68416-4 GA	DAS-68416-4 2,4-D	DAS-68416-4 GA + 2,4-D		
Betakaroten NA	NA	NA [<LOQ]	NA [<LOQ]	NA [<LOQ]	NA [<LOQ]	[<LOQ-0,406]	NR
Vitamin B1 (p=0,811)	2,6±0,17 [1,73-3,87]	2,66 ± 0,17 [1,76-3,85] (0,663, 0,828)	2,71± 0,17 [1,73-4,17] (0,421, 0,682)	2,58 ± 0,17 [1,66-3,84] (0,890, 0,955)	2,57 ± 0,17 [1,37-3,84] (0,806, 0,913)	[1,35-4,87]	[1,01-2,54]
Vitamin B2 (p=0,156)	4,31 ± 0,16 [3,19-5,46]	4,55 ± 0,16 [3,2-6,09] (0,161, 0,410)	4,59 ± 0,16 [3,49-5,96] (0,095, 0,295)	4,39 ± 0,16 [3,52-5,7] (0,634, 0,825)	4,69 ± 0,16 [3,56-5,49] (0,026, 0,147)	[3,13-6,28]	[1,9-3,21]
Vitamin B3 (p=0,442)	21,8 ± 0,6 [18,7-24,5]	22,3 ± 0,6 [19,2-27,8] (0,218, 0,504)	22,2 ± 0,6 [19,4-27] (0,309, 0,586)	21,7 ± 0,6 [17,7-25,7] (0,758, 0,874)	21,9 ± 0,6 [19,1-26,2] (0,959, 0,986)	[17,2-30,8]	NR
Vitamin B5 (p=0,039)	13,4 ± 0,8 [10-20,2]	12,78 ± 0,8 [9,12-18,2] (0,043, 0,200)	12,56 ± 0,8 [8,08-19,5] (0,007, 0,069)	13,01 ± 0,8 [9,12-20,1] (0,187, 0,454)	12,56 ± 0,8 [8,77-18,8] (0,008, 0,072)	[7,38-19,7]	NR

<b>Tabell 8, forts.</b>							
Vitamin B6 (p=0,436)	4,51 ± 0,15 [3,34-5,73]	4,55 ± 0,15 [3,5-5,3] (0,625, 0,823)	4,54 ± 0,15 [3,62-5,69] (0,768, 0,881)	4,65 ± 0,15 [3,56-5,6] (0,111, 0,310)	4,51 ± 0,15 [3,74-5,19] (0,921, 0,969)	[3,19-6,11]	NR
Folsyre (p=0,002)	2,83 ± 0,13 [2,37-4,14]	2,59 ± 0,13 [2,03-3,97] ( <b>&lt;0,001, 0,021</b> )	2,55 ± 0,13 [1,89-3,42] ( <b>&lt;0,001, 0,005</b> )	2,6 ± 0,13 [2,1-3,89] ( <b>0,002, 0,027</b> )	2,66 ± 0,13 [2,09-4,04] ( <b>0,014, 0,092</b> )	[2,08-4,44]	[2,39-4,71]
Vitamin C (p=0,690)	66,9 ± 8,8 [30,6-103]	64,8 ± 8,8 [12,3-103] (0,513, 0,762)	68,4 ± 8,8 [<LOQ-110] (0,637, 0,825)	65,2 ± 8,8 [143-106] (0,586, 0,800)	68,3 ± 8,8 [17,7-103] (0,664, 0,828)	[16,6-124]	NR
Vitamin E (p=0,709)	14,79±1,78 [8,03-26,8]	14,23±1,78 [8,43-26,2] (0,376, 0,654)	14,07±1,78 [8,47-27,5] (0,258, 0,543)	14,77±1,78 [8,4-28,1] (0,969, 0,987)	14,35±1,78 [8,46-26,2] (0,486, 0,755)	[<LOQ-28,1]	[1,9-61,7]
Beta- tokoferol NA	NA [<LOQ]	NA [<LOQ]	NA [<LOQ]	NA [<LOQ]	NA [<LOQ]	[<LOQ-7,66]	NR
Gamma- tokoferol (p=0,968)	156,1±9,5 [131-196]	152,8±9,5 [81,4-214] (0,653, 0,828)	153,3±9,5 [76,9-195] (0,709, 0,854)	155,3±9,5 [100-199] (0,911, 0,963)	157,3±9,5 [105-206] (0,864, 0,942)	[122-244]	NR
Delta- tokoferol (p=0,488)	82,8±6,6 [59,1-104]	81,1±6,6 [35,4-106] (0,412, 0,680)	82,5±6,6 [33,2-111] (0,854, 0,941)	80,3±6,6 [44,3-105] (0,242, 0,530)	83,8±6,6 [45,3-110] (0,643, 0,828)	[51,9-138]	NR
Toltalt tokoferol (p=0,940)	254±13 [227-291]	248±13 [133-315] (0,581, 0,800)	250±13 [126-300] (0,704, 0,854)	250±13 [161-293] (0,737, 0,860)	256±13 [168-303] (0,837, 0,940)	[210-349]	NR

### *Fettsyresammensetning i bønner*

Fettsyresammensetningen i bønner ble målt i henhold til OECDs konsensusdokument for soya (OECD 2001). Det ble analysert for innhold av 22 ulike fettsyrer. I henhold til søker var innholdet av 14 av fettsyrene ved eller lavere enn de respektive påvisningsgrensene. Disse fettsyrene ble derfor ikke tatt med i tabell 6. Resultatene av variansanalysene viste signifikante forskjeller mellom testlinjene og kontroll (over behandlinger) for oljesyre, linolsyre og linolensyre (tabell 6). Resultater fra de parede t-testene (justerte p-verdier) viser signifikante forskjeller mellom kontroll og DAS-68416-4 henholdsvis usprøytet, og sprøytet med GA, 2,4-D og GA+2,4D ( $p < 0,05$ ) for alle tre fettsyrene. Forskjellene som er målt er imidlertid mindre enn 20 %. Verdiene ligger innenfor toleranseintervallene for de seks referansesortene som inngikk i studien og innenfor typiske verdier for andre soyasorter som er rapportert i ILSI Crop Composition Database (ILSI 2008) og OECDs konsensusdokument for soya (2001).

### *Aminosyrer*

I henhold til søkers dokumentasjon er innholdet av både essensielle og ikke-essensielle aminosyrer analysert (tabell 7). Analysene er gjort i henhold til OECDs konsensusdokument for soya (OECD 2001, 2009). Resultatene av variansanalysene viste signifikante forskjeller mellom testlinjene og kontroll (over behandlinger) for alanin, arginin, glutaminsyre, metionin, prolin og valin (tabell 7). Videre viste t-testene signifikante forskjeller mellom umodifisert kontroll og testlinjen behandlet med glufosinat med hensyn på innhold av alanin, arginin, glutaminsyre og prolin (FDR-justerte p-verdier) (tabell 7). Forskjellene som er målt er imidlertid mindre enn 20%. Verdiene ligger innenfor toleranseintervallene for de seks referansesortene som inngikk i studien og innenfor typiske verdier for andre soyasorter som er rapportert i ILSI Crop Composition Database (ILSI 2006) og OECDs konsensusdokument for soya (2001).

### *Vitaminer*

OECDs konsensusdokument fra 2001 har ikke satt opp vitaminer som komponenter det skal måles for i soya (OECD 2001). I utkast til revidert konsensusdokumentet for soya (2009 revisjon 2) har imidlertid OECD anbefalt at når det gjelder soya og soyaprodukter til bruk som næringsmiddel, bør det analyseres for vitaminer (tabell 9). I siste utkast til konsensusdokument for soya (revisjon 3) foreslås det at det bør analyseres for vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol) og vitamin K<sub>1</sub>. Det fremheves at soyabønne er en god kilde til vitaminene folinsyre, vitamin E og vitamin K<sub>1</sub>, og at soyaolje en god kilde til vitamin K<sub>1</sub>. Data vedrørende disse vitaminene kommer fra de internasjonale databasene ILSI (ILSI 2006, 2008), Japan (Japan 2009), USDA Nutrient database (USDA-ARS 2009), US National Research Council (NCR 1994, 1998, 2000) og Stuttgart (DFL 1991). OECDs soyadokument er foreløpig ikke deklassifisert og publisert.

Dokumentasjonen knyttet til foreliggende søknad inneholder analyser av vitaminene A, B1, B2, B3 (niacin), B5, B6, C, E og folat (tabell 8). Vitamin A er målt som  $\beta$ -karoten. Når det gjelder vitamin E er det målt for  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - og  $\delta$ -tokoferol, samt totalinnholdet av tokoferoler. Kombinerte analyser over lokaliteter viser ingen statistisk signifikante forskjeller mellom testlinjene og kontroll for flertallet av de analyserte vitaminene. Det ble imidlertid funnet signifikante forskjeller mellom testlinjene og kontroll (over behandlinger) med hensyn på innhold av vitaminet folsyre og vitamin B5. De parede t-testene viste signifikante forskjeller mellom umodifisert kontroll og testlinjen (både usprøytet og behandlet med GA og 2,4-D) (FDR-justerte p-verdier) (tabell 8). Verdiene for begge parametrene ligger imidlertid innenfor toleranseintervallene for de seks referansesortene som inngikk i studien og typiske verdier som er rapportert i ILSI Crop Composition Database (ILSI 2007) og OECDs konsensusdokument for soya (2001).

**Tabell 9. Innhold av ulike vitaminer i soyabønne (per kg t.s.). Data fra OECDs konsensusdokument (OECD 2009)**

Vitamin	Enhet per kg t.s.	ILSI (2006, 2008)	NRC <sup>1</sup> (1994, 1998, 2000)	USDA-ARS <sup>2</sup> (2009)	DFL <sup>2</sup> (1991)	Japan <sup>1</sup> (2009)	Variasjons-område
Folsyre	mg	2,39-4,71	3,60-4,60	4,10	2,54	-	2,39-4,71
Vitamin A	IU		1600	2405			1600-2405
Beta-karoten	mg			14,21	4,15		4,15-14,21
Vitamin B <sub>1</sub>	mg	1,01-2,54	12,2	9,6	10,82	0,79-1,31	0,79-12,2
Vitamin B <sub>2</sub>	mg	1,90-3,21	2,9	9,5	5,68	0,25-0,51	0,25-9,5
Vitamin E	mg	1,9-61,7	20,1-44,4	9,3	16,39	1,25-10,75	1,25-61,7
Vitamin K	mg			0,51	2,08	4,47-45,86	0,47-45,86
Niacin	mg		24,4	17,8	27,43	0,80-2,23	0,80-27,43
Vitamin B <sub>4</sub>	mg		12,0	14,12	13,01	0,37-1,18	0,37-13,01

<sup>1</sup> NRC (National Research Council, USA) - Nutrient Requirements of Poultry (1994); of Swine (1998); of Beef Cattle (2000). Data based on roasted seeds <sup>2</sup> Data converted from fresh weight to dry weight basis based on given moisture level.

### Mineraler

OECDs konsensusdokument fra 2001 har ikke satt opp mineraler som komponenter det skal måles for i soya (OECD 2001). I utkast til revidert konsensusdokument fra 2009 (revisjon 3) foreslås det at det bør analyseres for kalsium og fosfat i soyaprodukter som benyttes i fôr. Det blir også fremhevet at soyabønne er en god kilde til mineralene jern, kalium og magnesium. Data vedrørende disse mineralene kommer fra de internasjonale databasene ILSI (ILSI 2006, 2008), USDA Nutrient database (USDA-ARS 2009), US National Research Council (NRC 1998, 2000, 2001) og Stuttgart (DFL 1991).

Dokumentasjonen knyttet til foreliggende søknad inneholder analyser av mineralene jern, kalium, kalsium, kobber, magnesium, mangan, natrium, sink og for fosfat (tabell 10). Med unntak for kalsium ble det ikke funnet signifikante forskjeller mellom testlinjen og kontroll. Resultater av de parede t-testene (justerte verdier) viser signifikante forskjeller mellom kontroll og ubehandlet testlinje ( $p < 0,05$ ). Verdiene for denne parameteren ligger imidlertid innenfor toleranseintervallene for de seks referansesortene som inngikk i studien og typiske verdier som er rapportert i ILSI Crop Composition Database (ILSI 2007) og OECDs konsensusdokument for soya (2001).

### Isoflavoner (fytoøstrogener)

Valget av analyseparametere er gjort i henhold til OECDs konsensusdokument for soya (OECD 2001, 2009). I henhold til søkers dokumentasjon er følgende isoflavoner målt: daidzein, glycitein, og genistein. Kombinerte analyser over steder viser signifikante forskjeller mellom kontroll og testlinje (over behandlinger) med hensyn på innhold av glycitein ( $p < 0,05$ ). Videre viste t-testene signifikante

forskjeller mellom umodifisert kontroll og testlinjen, behandlet med henholdsvis glufosinat og GA+2,4-D med hensyn på denne parameteren (FDR-justerte p-verdier) (tabell 11).

Søker har kun beregnet totalmengdene for isoflavongruppene daidzeiner, genisteiner og glyciteiner over steder (tabell 11). Verdiene for parameterne ligger innenfor toleranseintervallene for de seks referansesortene som inngikk i studien og typiske verdier som er rapportert i ILSI Crop Composition Database (ILSI 2007) og OECDs konsensusdokument for soya (2001).

#### *Oligosakkarider og antinæringsstoffer*

Valget av analyseparametere er gjort i henhold til OECDs konsensusdokument for soya (OECD 2001, 2009) (tabell 12). Variansanalyse over steder viser ingen statistisk signifikante forskjeller mellom DAS-68416-4 og kontroll for noen av de analyserte komponentene.

#### *Fosfolipider*

I OECDs konsensusdokument for soya for 2009 (revisjon 3) er det ikke foreslått at fosfatider, som er en sekkebetegnelse på fosfolipider, bør måles i lecitin. Konsensusdokumentet nevner imidlertid at lecitin benyttes i spebarnsmat. Søker har ikke analysert for innhold av fosfolipider i soyabønner og i lecitin.

#### **Prosesserte produkter**

Soyabønne blir prosessert til en rekke ulike formål, hovedsakelig fôr, olje og mel (OECD 2009) ([vedlegg 1](#)). Avfettet rostet mel blir hovedsakelig benyttet til fôr, mens avfettet mel blir brukt som mat. De ulike proteinfraksjonene fra avfettet soyamel blir brukt i forskjellige matvarer for mennesker. Soyaolje brukes primært i næringsmidler, som matolje og i salatdressinger.

#### *Analyser av soyaolje*

I dokumentasjonen fra Dow AgroScience er det ikke presentert data fra analyser av soyaolje. I henhold til OECDs konsensusdokument (OECD 2009) er soyaolje en god kilde til vitamin K.

Grønne bladgrønnsaker, vegetabiliske oljer og plantemargarin er gode kilder for vitamin K. Et fermentert soyaprodukt er en god kilde for vitamin K<sub>2</sub>, som er formen som produseres av bakterier. Vitamin K<sub>2</sub> produseres også av bakterier i menneskets tarm. Litteraturstudier utført av EFSA viser at gjennomsnittinntaket hos voksne i europeiske land og USA varierer fra 60 til 250 mikrogram/dag (EFSA 2008). Anbefalt inntak for både barn og voksne er 1 mikrogram/kg kroppsvekt/dag (EFSA 2008).

Etter faggruppens oppfatning er analyser av vitamin K i soyaolje ikke påkrevet. Dette fordi vitamin K-mangel er svært sjelden eller ikke eksisterende hos voksne.

#### *Analyser av allergener fra soya.*

I OECDs konsensusdokument for 2009 er ett av kapitlene viet allergener i soya. Soyabønner inneholder ca. 16 proteiner som binder IgE (L'Hocine & Boye 2007), og disse betraktes som potensielle allergener. Både uraffinert og raffinert soyaolje er vist å inneholde allergene proteiner (Ramazzoti et al. 2008).

OECDs konsensusdokument for 2009 gir ingen anbefalinger med hensyn på hvilke allergene proteiner i soya som bør analyseres.

**Tabell 10. Resultater fra analyser av mineraler i bønner fra umodifisert kontrollinje cv. Maverick og testlinjen DAS-68416-4 (ubehandlet eller sprøytet med henholdsvis glufosinat ammonium (GA), 2,4-D eller GA + 2,4-D). Fra feltforsøk i USA 2009.**

Komponenter analysert mg/100 g t.v. (F-test <sup>1</sup> )	Gjennomsnitt ± S.E. [Variasjonsområde] (p-verdi, justert p-verdi t-test)					Referansesorter [Min-maks]	Litteraturverdier [Min-maks]
	Nær-isogen kontroll	DAS-68416-4 usprøytet	DAS-68416-4 GA	DAS-68416-4 2,4-D	DAS-68416-4 GA + 2,4-D		
Kalsium (0,032)	281 ± 23 [231-418]	312 ± 23 [243-497] <b>(0,004, 0,049)</b>	308 ± 23 [243-504] <b>(0,011, 0,084)</b>	300 ± 23 [249-401] (0,067, 0,276)	293 ± 23 [250-393] (0,234, 0,523)	[187-406]	[117-307,1]
Kobber (p=0,344)	1,32±0,056 [0,797-1,6]	1,371 ± 0,056 [0,847-2,51] (0,128, 0,344)	1,323± 0,056 [0,733-1,65] (0,926, 0,971)	1,322± 0,056 [1,04-1,54] (0,943, 0,986)	1,305 ± 0,056 [0,921, 1,53] (0,652, 0,828)	[0,633-2,15]	NR
Jern (p=0,373)	9,16 ± 2,47 [7,19-12,5]	11,45 ± 2,47 [7,02-32,9] (0,45, 0,708)	14,07 ± 2,47 [6,94-92,2] (0,111, 0,31)	8,76 ± 2,47 [7,34-11,5] (0,895, 0,956)	12,35 ± 2,48 [7,06-8,5] (0,296, 0,586)	[6,05-79,1]	[5,54, 10,95]
Magnesium (p=0,449)	234 ± 6 [207-281]	236 ± 6 [209-297] (0,418, 0,68)	236 ± 6 [213-284] (0,368, 0,653)	233 ± 6 [205-266] (0,751, 0,873)	232 ± 6 [218-256] (0,524, 0,769)	[192-282]	[219,4-312,8]
Mangan (p=0,885)	3,4 ± 0,28 [2,2-6,69]	3,4 ± 0,28 [2,21, 5,54] (0,712, 0,854)	3,45 ± 0,28 [2,12-6,43] (0,95, 0,986)	3,3 ± 0,28 [2,18-5,8] (0,354, 0,631)	3,38 ± 0,28 [2,25-6,5] (0,636, 0,825)	[2,35-5,91]	NR
Fosfor (p=0,503)	596 ± 21 [492-707]	609 ± 21 [492-717] (0,305, 0,586)	617 ± 21 [475-702] (0,098, 0,298)	603 ± 21 [471-716] (0,564, 0,797)	601 ± 21 [481-710] (0,679, 0,839)	[430-716]	[506,7-935,2]
Kalium (p=0,832)	1788±36 [1650-1990]	1803±36 [1560-2130] (0,404, 0,677)	1803±36 [1510-2080] (0,413,0,68)	1794±36 [1600-2110] (0,725, 0,856)	1787±36 [1620-1960] (0,976, 0,987)	[1580-2110]	[1868-2316]

Tabell 10, forts.							
Natrium NA	NA [<LOQ]	NA [<LOQ]	NA [<LOQ-15,5]	NA [<LOQ-18]	NA [<LOQ-13,3]	[<LOQ-15,7]	NR
Sink (p=0,687)	4,23 ± 0,12 [3,69-5,23]	4,17 ± 0,12 [3,33-5,31] (0,567, 0,797)	4,2 ± 0,12 [3,73-5,55] (0,729, 0,858)	4,1 ± 0,12 [3,58-5,1] (0,173, 0,438)	4,14 ± 0,12 [3,67-5,3] (0,374, 0,654)	[3,14-5,71]	NR

Tabell 11. Resultater fra analyser av isoflavoner i bønner fra umodifisert kontrollinje cv. Maverick og testlinjen DAS-68416-4 (ubehandlet eller sprøytet med henholdsvis glufosinat ammonium (GA), 2,4-D eller GA + 2,4-D). Fra feltforsøk i USA 2009.

Komponenter analysert µg/g t.v. (F-test <sup>1</sup> )	Gjennomsnitt ± S.E. [Variasjonsområde (p-verdi, justert p-verdi t-test)]					Referansesorter [Min-maks]	Litteraturverdier [Min-maks]
	Nær-isogen kontroll	DAS-68416-4 usprøytet	DAS-68416-4 GA	DAS-68416-4 2,4-D	DAS-68416-4 GA + 2,4-D		
Daidzein (0,555)	764,8 ± 110,9 [299-1180]	757 ± 110,9 [192,2-1260] (0,784, 0,895)	738,1 ± 110,9 [174,1-1250] (0,517, 0,762)	759,7 ± 110,9 [186-1210] (0,859, 0,942)	797,6 ± 110,9 [191-1210] (0,251, 0,537)	[106-1520]	[60-2453,5]
Genistein (p=823)	1133,1±143,8 [486-1580]	1110,2 ± 143,8 [348,5-1770] (0,585, 0,8)	1142,5± 143,8 [312-1840] (0,821, 0,927)	1112 ± 143,8 [380-1760] (0,615, 0,821)	1150,4 ± 143,8 [385,2-1740] (0,68, 0,839)	[161-1790]	[144,3-2837,2]
Glycitein (p=0,01)	250,5 ± 15,2 [188-300]	267,5 ± 15,2 [159,7-309] (0,027, 0,148)	273,7 ± 15,2 [151-334] (0,004, 0,043)	272,8 ± 15,2 [150– 356] (0,005, 0,055)	276,3 ± 15,2 [152-360] (0,001, 0,027)	[99-334]	[15,3-310,4]



**Tabell 12. Resultater fra analyser av oligosakkarider og antinæringsstoffer i bønner fra umodifisert kontrollinje cv. Maverick og testlinjen DAS-68416-4 (ubehandlet eller sprøytet med henholdsvis glufosinat ammonium (GA), 2,4-D eller GA + 2,4-D). Fra feltforsøk i USA 2009.**

Komponenter analysert (enhet)	Gjennomsnitt ± S.E. [Variasjonsområde] (p-verdi, justert p-verdi t-test)					Referansesorter [Min-maks]	Litteraturverdier [Min-maks]	
	(F-test <sup>1</sup> )	Nær-isogen kontroll	DAS-68416-4 usprøytet	DAS-68416-4 GA	DAS-68416-4 2,4-D			DAS-68416-4 GA + 2,4-D
Fytinsyre (% t.v.) (p=0,328)		1,289 ± 0,075 [0,845-1,74]	1,251±0,075 [0,781-1,59] (0,38, 0,657)	1,337 ± 0,075 [0,753-1,69] (0,279, 0,569)	1,308 ± 0,075 [0,817-1,83] (0,666, 0,828)	1,324 ± 0,075 [0,773-1,72] (0,432, 0,694)	[0,669-1,85]	[0,63-2,74]
Raffinose (% t.v.) (p=0,321)		0,588±0,041 [0,366-0,742]	0,563 ± 0,041 [0,247-0,697] (0,068, 0,276)	0,566± 0,041 [0,205-0,738] (0,112, 0,311)	0,575 ± 0,041 [0,28-0,722] (0,351, 0,629)	0,581± 0,041 [0,366-0,698] (0,619, 0,821)	[0,379-0,899]	[0,212-1,62]
Staktyose (% t.v.) (p=0,23)		3,54 ± 0,2 [2,52-4,21]	3,36 ± 0,2 [1,68-4,12] (0,05, 0,215)	3,38 ± 0,2 [1,51-4,15] (0,077, 0,276)	3,47 ± 0,2 [2,22-4] (0,409, 0,68)	3,49 ± 0,2 [2,38-4,02] (0,574, 0,8)	[2,39-5,04]	[1,21-6,1]
Lektin (H.U./mg t.v.) (p=0,281)		58,4 ± 9,6 [22,3-223]	58±9,6 [18,2-124] (0,961, 0,986)	58,6±9,6 [19,6-132] (0,973, 0,987)	71,3±9,6 [29-166] (0,07, 0,276)	61,2±9,6 [25-163] (0,686, 0,84)	[12,2-140]	[37-323]
Trypsin-hemmer (TIU/mg t.v.) (p=0,509)		31,9 ±3,8 [16,2-57,5]	34,2±3,8 [20-71,4] (0,253, 0,537)	35,5±3,8 [20,7-77,1] (0,081, 0,276)	33,9±3,8 [21,9-66,1] (0,323, 0,595)	34±3,8 [24-60,6] (0,302, 0,586)	[17,1-59,5]	[19,59-118,7]

### **3.3 Agronomiske egenskaper**

I henhold til søkers dokumentasjon ble det foretatt registreringer av 11 morfologiske og agronomiske karakterer, inkludert plantevitalitet (både hos frøplanten (VC-V2) og på vekststadium V4, R1, R2), plantetetthet, legde, plantehøydetidlighet og avling (Vedlegg II). I tillegg ble det registrert sjukdoms- og insektangrep på plantebestandet.

Variansanalyse over steder viste, med unntak av parameteren plantevitalitet på utviklingsstadium R2, ingen signifikante forskjeller mellom forsøksledd med hensyn på de registrerte variablene ( $p > 0,05$ ) (tabell 13). Resultater fra de parede t-testene viste signifikante forskjeller mellom kontrollsorten og testlinjen DAS-68416-4 sprøytet med henholdsvis GA og en kombinasjon av virkestoffene GA+2,4D ( $p = 0,04$  og  $p = 0,036$ ). De FDR-justerte p-verdiene (se kap. 3.1) viser imidlertid ingen signifikante forskjeller mellom linjene (tabell 13). Gjennomsnittverdiene for variablene var også innen variasjonsområdet for referansesortene som var inkludert i studien.

### **3.4 Vurdering basert på tilgjengelig datagrunnlag**

Analysen av ernæringsmessige komponenter er i hovedsak utført i tråd med OECDs konsensusdokument for soya (OECD 2001). Det er påvist statistisk signifikante forskjeller mellom DAS-68416-4 og nær-isogen kontroll i enkeltparametere. Forskjellene er imidlertid ikke konsistente over forsøksfelt, og verdiene for de analyserte komponentene ligger innenfor typiske verdier for andre soyasorter som er rapportert i litteraturen, og innenfor variasjonsområdene til kommersielle referansesorter som er inkludert i søkers dokumentasjon. Faggruppen konkluderer med at forskjellene som er påviste ikke har ernæringsmessig betydning.

Faggruppen påpeker imidlertid at søker ikke har foretatt analyser av fosfatider i lecitin, samt vitaminer som er nevnt i OECD dokumentet fra 2009. Det understrekes at konsensusdokumentet i størst mulig grad skal følges når det legges fram dokumentasjon på nivåene av næringsstoffer, antinæringsstoffer og metabolitter.

Når det gjelder phytoøstrogener, har søker slått sammen resultatene for de enkelte isoflavoner innenfor hver av isoflavongruppene. Det er stor variabilitet innenfor hver gruppe og faggruppen etterspør statistiske analyser for hver enkelt forbindelse innenfor hver isoflavongruppe.

Feltforsøk over en vekstsesong i USA viser små eller ingen signifikante forskjeller mellom den transgene soyalinjen DAS-68416-4 (usprøytet og sprøytet med tiltenkte herbicider) og umodifisert kontroll med hensyn på morfologiske og agronomiske egenskaper.

**Tabell 13. Resultater fra variansanalyse over steder for morfologiske, agronomiske og sjukdomskarakterer fraforsøksruter med umodifisert kontroll (cv. Maverick), kommersielle referansesorter og testlinjen DAS-68416-4 (usprøytet og behandlet med henholdsvis glufosinat ammonium (GA), 2,4D og GA+2,4D). Fra feltforsøk i USA vekstsesongen 2009.**

Analyserte karakterer (enhet) (F-test)	Gjennomsnitt ± S.E. [Variasjonsområde] (p-verdi, justert p-verdi t-test)					Ref.sorter [Min-maks]
	Nær-isogen kontroll	DAS-68416-4 usprøytet	DAS-68416-4 GA	DAS-68416-4 2,4-D	DAS-68416-4 GA + 2,4-D	
Plantebestand vår (VC-V2)(#/forsøksrute) (p=0,099)	187±6 [141-215]	181±6 [141-215]	177±6 [134-208] <b>(0,009, 0,322)</b>	182±6 [123-216] (0,226, 0,683)	184±6 [148-220] (0,474, 0,905)	[102-211]
Andel planter spirt (VC-V2) (%) (p=0,107)	82,3±2,3 [63-93,3]	79,7 ± 2,3 [66,7-92,4] (0,127, 0,559)	77,7±2,3 [59,8-93] <b>(0,010, 0,322)</b>	80,2±2,3 [55-94,6] (0,221, 0,683)	81,1±2,3 [66-94,6] (0,463, 0,905)	[46-94,2]
Frøplantevitalitet (V4) (1-10) (p=0,931)	10 ± 0,3 [7-10]	9 ± 0,3 [8-10] (0,623, 0,905)	10±0,3 [8-10] (0,806, 0,919)	10±0,3 [7-10] (1,00, 1,00)	9±0,3 [7-10] (0,452, 0,905)	[8-10]
Plantebestand høst (R8) (#/forsøksrute) (p=0,250)	152 ± 19 [15-198]	150 ± 19 [9-196] (0,659, 0,905)	145±19 [8-201] (0,070, 0,559)	149±19 [14-198] (0,432, 0,905)	153±19 [0-201] (0,778, 0,905)	[5-203]
Plantevitalitet V4 (1-10) (p=0,255)	10 ± 0,2 [9-10]	10 ± 0,2 [8-10] (1,000, 1,000)	9±0,2 [7-10] (0,148, 0,559)	10±0,2 [8-10] (0,952, 1,00)	9±0,2 [7-10] (0,148, 0,559)	[8-10]
Plantevitalitet R1 (1-10) (p=0,201)	10 ± 0,2 [8-10]	10 ± 0,2 [9-10] (0,725, 0,905)	10±0,2 [8-10] (0,124, 0,559)	10±0,2 [9-10] (0,725, 0,905)	10±0,2 [8-10] (0,276, 0,769)	[8-10]
<b>Plantevitalitet R2 (1-10) (p=0,036)</b>	10 ± 0,1 [8-10]	10 ± 0,1 [9-10] (0,762, 0,905)	10±0,1 [9-10] <b>(0,042, 0,559)</b>	10±0,1 [8-10] (0,763, 0,905)	10±0,2 [8-10] <b>(0,036, 0,559)</b>	[8-10]

<b>Tabell 13, forts.</b>						
Legde (R8) (0-100 %) (p=0,514)	6 ± 5 [0-50]	5 ± 5 [0-50] (0,605, 0,905)	7 ± 5 [0-50] (0,354, 0,853)	7 ± 5 [0-60] (0,522, 0,905)	7 ± 5 [0-60] (0,348, 0,853)	[0-20]
Sjukdomsforekomst (R6) (0-100 %) (p=0,078)	9 ± 4 [0-40]	8 ± 4 [0-40] (0,673, 0,905)	9 ± 4 [0-40] (0,833, 0,919)	10 ± 4 [0-40] (0,295, 0,787)	7 ± 4 [0-30] (0,061, 0,559)	[0-25]
Insektsangrep (R6) (0-100 %) (p=0,762)	5 ± 3 [0-30]	5 ± 3 [0-20] (0,718, 0,905)	6 ± 3 [0-30] (0,425, 0,905)	6 ± 3 [0-30] (0,360, 0,853)	6 ± 3 [0-30] (0,235, 0,683)	[0-30]
Antall dager til 50 % blomstring (varmesum) (p=0,441)	958,8 ± 30,9 [835,1-1056]	946,3 ± 30,9 [835,1-1056] (0,203, 0,683)	962,9 ± 30,9 [859,7-1074] (0,672, 0,905)	958,7 ± 30,9 [835,1-1056] (0,987, 1,00)	962 ± 30,9 [835,1-1056] (0,744, 0,905)	[835,1-1074]
Antall dager til 50 % modning (varmesum) (p=0,124)	2063 ± 69,1 [1696-2272,4]	2063 ± 69,1 [1696-2272,4] (0,859, 0,943)	2070,3 ± 69,1 [1696-2272,4] (0,052, 0,559)	2063,5 ± 69,1 [1696-2272,4] (0,969, 1,00)	2069,2 ± 69,1 [1696-2272,4] (0,098, 0,559)	[1696-2290,8]
Antall belger (5 planter) (p=0,356)	254 ± 41 [137-460]	249 ± 41 [159-460] (0,691, 0,905)	273 ± 41 [155-490] (0,123, 0,559)	261 ± 41 [144-461] (0,527, 0,905)	258 ± 41 [154-440] (0,757, 0,905)	[107-562]
Antall frø (5 planter) (p=0,324)	642 ± 92 [254-1289]	698 ± 92 [406-1256] (0,102, 0,559)	704 ± 92 [420-1330] (0,072, 0,559)	693 ± 92 [472-1114] (0,136, 0,559)	667 ± 92 [443-1109] (0,443, 0,905)	[321-1221]
Avling (g frø/plot) (p=0,742)	2730 ± 310 [1900-4500]	2800 ± 310 [1700-4400] (0,503, 0,905)	2680 ± 310 [1860-4300] (0,696, 0,905)	2700 ± 310 [1750-4700] (0,829, 0,919)	2800 ± 310 [1950-4800] (0,527, 0,905)	[1360-4600]
Plantehøyde (cm) (p=0,518)	90 ± 9 [27-140]	89 ± 9 [30-142] (0,620, 0,905)	88 ± 9 [21-142] (0,214, 0,683)	89 ± 9 [46-140] (0,767, 0,905)	90 ± 9 [48-155] (0,656, 0,905)	[32-140]

## 4 Dokumentasjon av toksisitet, allergisitet og næringsverdi

### 4.1 Toksisitet

#### 4.1.1 Akutt oral toksisitetsstudie på mus ved eksponering av renfremstilt AAD-12- protein

Dow AgroSciences har utført en akutt-toksisk studie på mus (se vedlegg *Wiescinski & Golden 2008*) med oral eksponering med sonde av AAD-12-protein produsert av bakterien *Pseudomonas fluorescens*. Forsøket er utført i henhold til god laboratoriepraksis (GLP) (EU-direktiv 88/320/EC) og akutt oral toksisitetsretningslinjene fra U.S. EPA og OECD (U.S. EPA Health Effects Test Guidelines. OPPTS 870.1100, EPA712-C-190, Acute Oral Toxicity (2002), OECD Guideline for Testing of Chemicals; Guideline No. 423: Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method; December 17, 2001), JMAFF Japan MAFF Acute Oral Toxicity Study 2002; EC EEC Methods Number B.1 tris Acute oral Toxicity, 2004.

Fem hunn- og hannmus fra stamme Crl:CD-1 ble eksponert for 5666 mg/kg kroppsvekt (kv) testmateriale. Testmaterialet inneholder 35,3 % AAD-12 protein. 20 % testmateriale ble suspendert i vann som inneholder 0,5 % metylcellulose. Musene ble sondeført med totalt 28,3 ml/kg kv, dvs. en AAD-12 dose på 2000 mg/kg kroppsvekt. Studien er utført hos Toxicology & Environmental Research and Consulting, The Dow Chemical Company.

Samtlige forsøksdyr ble observert for kliniske tegn på forgiftning over en periode på 14 dager etter dosering. Observasjonene ble foretatt en gang daglig. Dyrene ble veid før eksponering, ved eksponering, samt ved dag 2, 8 og 15.

Følgende parametre ble vurdert: "Unormal oppførsel ved håndtering", pels, skinn, holdning (posture), spyttavsondring, respirasjon, unormale bevegelser, unormalt ganglag ("gait abnormalities"), tåreflyt, palpebal mass/swellings, avføring, urin, samt pupillestørrelse. Ved avslutning av forsøket ble alle dyrene avlivet, og det ble utført grov nekropsi. Det ble ikke påvist økt mortalitet eller toksiske effekter på dyrene som ble eksponert for AAD-1. Det ble utført deskriptiv statistikk på kroppsvekter ved dag 0, 2, 8 og 15. Det ble beregnet aritmetisk middelværdi og standardavvik på kroppsvekt hos hann- og hunnmus. I henhold til dokumentasjonen ble det påvist forskjell i kroppsvekt hos et enkelte dyr ved dag 2 etter eksponering. Det ble ikke påvist store forskjeller mellom dyrene ved avslutning av forsøket. Alle musene overlevde forsøket. Søker har beregnet NOEL til >2000 mg/kg kroppsvekt. Faggruppen konkluderer med en LD50 >2000 mg AAD-12/kg kroppsvekt.

#### 4.1.2 Akutt oral toksisitetsstudie på mus ved eksponering av PAT-protein

Søker henviser til akutt oral toksisitetsstudier utført på mus. (Brooks 2000). (Referansen mangler i vedlagte dokumentasjon fra søker).

#### Arbeidsgruppens kommentarer fra tidligere sondeføringsforsøk:

Akutt oral toksisitetsstudier (OECD 401 eller 423) er ikke anbefalte studier for beregning av NOAEL, siden disse studiene er basert på en enkelt dosering og ett dosenivå, med en observasjonsperiode på 14 dager. Fra akutt oral toksisitetsstudier bestemmes LD50, ikke NOEL/NOAEL.

#### 4.1.3 28-dagers fôringsforsøk på mus

Det er foretatt 28-dagers fôringsforsøk på mus med fôr som inneholdt bakteriefremstilt AAD-1-protein produsert av bakterien *Pseudomonas fluorescens*. I tillegg er det utført fôringsforsøk med bovint serumalbumin (BSA). Forsøkene er utført i henhold til god laboratoriepraksis (GLP) (EU-direktiv 2004/10/EC), OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring, Number 1, ENV/MC/CHEM(98)17, US EPA-FIFRA GLPs Title 40 CFR, Part 160, JMAFF GLP standards Notification No. 8628 december 2000). Oral toksisitetsretningslinjene for 28 dager

fôringsforsøk på mus fra U.S. EPA OPPTS 870.3050, EPA 712-C-00-366 (2000); OECD Guideline for Testing of Chemicals; Guideline No. 407: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity-Study in Rodents; October 03, 2008); EC EEC Part B.7 Repeated Dose(28 days) Toxicity (Oral) Directive 96/54/EC, 1996.

Fem hunn- og hannmus fra stamme Crl:CD-1 ble eksponert for bakteriefremstilt AAD-1-protein i fôret. Gjennomsnittlig mengde AAD-1-protein tilsatt fôret tilsvarer en gjennomsnittlig dose hos hannmus på henholdsvis 0; 0,47; 4,7 og 47 mg/kg kroppsvekt (kv)/dag. Den tidsvektete gjennomsnittlige dosen for hannmus var 0; 0,464; 4,65 og 45,8 mg/kg kv/dag. Tilsvarende dose for hunnmus var 0; 0,467; 4,7 og 46,9 mg/kg kv/dag. Kontrollgruppene (fem hunn- og hannmus i hver gruppe), ble fôret med fôr som inneholdt BSA. Gjennomsnittlig mengde BSA i fôret tilsvarer en gjennomsnittlig dose på 47 mg BSA/kg kv/dag, og tidsvektete dose på henholdsvis 50,6 – og 51,6 mg/kg kv/dag for hann- og hunnmus.

Søker har foretatt undersøkelser av relevante organer, hematologiske parametere, fôrkonsum, klinisk-kjemiske parametere samt grov- og mikroskopisk patologiundersøkelser. Det ble ikke påvist dose-respons forhold for disse parametrene.

Ut fra dosene som ble benyttet har Dow AgroSciences beregnet NOEL for AAD-1 til 47 mg/kg kroppsvekt/dag basert på dette 28-dagers fôringsforsøk på mus.

I henhold til Dow AgroSciences (se vedlegg *Cleveland 2010* i søknad) er WHO's høyest beregnede gjennomsnittlig daglig inntak av soya hos mennesker 39,2 g soya/dag pluss 0,4 g soyasaus/dag (WHO GEMS/Food Consumption cluster F, Northern EU countries, (WHO 2011)). Totalinntak av soya er beregnet til 0,66 g/kg kroppsvekt/dag. Denne utregningen av totalinntaket er basert på et inntak av på 39,6 g soya/dag, som er delt på 60 kg kroppsvekt.

Gjennomsnittlig konsentrasjon av AAD-12 protein i soyabønner fra DAS-68416-4 oppgis til 21,49 µg/g tørrvekt, med en spredning fra 11,51 til 32,18 µg/g tørrvekt.

Den største AAD-12 dosen (47 mg/kg kv/dag) som mus ble fôret med tilsvarer derfor mer enn 2000 ganger inntaket av AAD-12 protein for mennesker, dersom hele det daglige inntaket av soyaprodukter, dvs 39,6 g, stammer fra DAS-68416-4.

Faggruppen bemerker at fôringsforsøket ikke er utført i henhold til EFSA's reviderte retningslinjer for risikovurdering av mat og fôr fra genmodifiserte organismer (EFSA 2011). Retningslinjene ble imidlertid utgitt i april 2011, men et utkast ble lagt ut på høring i 2008. EFSA's GMO Panel anbefaler 10 dyr/kjønn for å få adekvat statistisk styrke.

#### 4.1.3 42-dagers fôringsforsøk på broiler

Søknaden inneholder dokumentasjon fra et 42-dagers fôringsforsøk (se vedlegg *Fletcher 2010*) Ross/Ross 708 broilere (n = 120/gruppe, 50 % hann- and 50 % hunnfugler). Fôringsforsøket ble utført av Genesis Midwest Laboratories (GML)(WI). Studien ble utført i henhold til prinsippene for U.S. EPA FIFRA (40 CFR part 160) Good Laboratory Practice Standards.

Forsøket omfattet 600 dyr, fordelt på fem behandlingsgrupper à 120 dyr. Forsøksdyrene ble fôret med fôr som inneholdt henholdsvis 40,4 % soyamel som startfôr (dag 0 t.o.m dag 15), 23,4 % soya som vekstfôr (dag 16 t.o.m 29) og 31,5 % soya som slutfôr (dag 30 t.o.m dag 42). Soya i de forskjellige fôrene bestod av henholdsvis DAS-68416-4, en umodifisert kontrollsort (nær-isogen soyalinje) og tre kommersielle, umodifiserte referansesorter. Fôrene ble undersøkt for en rekke ernæringsmessige komponenter, mykotoksiner, og antinæringsstoffer. Det ble foretatt målinger av nivået av PAT og AAD-12-protein i fôr som er produsert fra DAS-68416-4. Det ble ikke påvist verken AAD-12- eller PAT-protein i fôret. Årsaken er at soya-mel blir røstet ved ca. 110 °C.

Forsøksdyrene ble observert to ganger per dag for generelle helseparametere og mortalitet. Ved slutten av hver fôringsfase ble dyrene veid, fôrintaket målt, og forholdet mellom fôrintak og vektøkning beregnet. Etter avliving ble vekt av skrott, bryst, lår, vinger, og abdominalt fett, samt vann-, protein- og fettinnhold i bryst og lår (% av kroppsvekt til levende broilere) målt. Det ble tatt ut 240 dyr, 24 hann og 24 hunn fra hver gruppe til nekropsi-undersøkelser. I henhold til søkers dokumentasjon ble de statistiske analysene utført som et split-plot design med 12 gjentak (6 rep for hann- og 6 rep for hunndyr) som hovedplot. Fôringsregimene og samspill gjentak x behandling ble betraktet som sub-plot (med henholdsvis 4 & 44 df).

Søker hevder at det ikke ble påvist relevante biologiske endringer i de målte parametrene ved fôring med soya fra DAS-68416-4, sammenlignet med kontroll og referansesorter. Det ble imidlertid påvist 3,7 % lavere fôrintak hos hannbroilere som ble fôret med DAS-68416-4 sammenlignet med hannfugl som ble fôret med umodifisert nær-isogen soya. Søker hevder at denne endringen ikke er biologisk relevant fordi det bare er observert hos hannfugl. Faggruppen er ikke enig i søkers konklusjon. I tillegg finner faggruppen statistisk signifikante forskjeller på tilvekst og fôrutnyttelse mellom hannbroilere som er fôret med GM-soya sammenlignet med hannbroilere fôret med umodifisert nær-isogen soya.

*Kommentarer til kvaliteten i søkers dokumentasjon*

AAD-12-proteinet som er brukt i akutt- og 28 dagers studiene har en renhet på 35,3 %. Faggruppen stiller spørsmålstegn ved bruk testsubstans med så lav renhetsgrad. Faggruppen etterlyser analyseresultater av de øvrige komponentene i testsubstansen.

Faggruppen og arbeidsgruppen påpeker at søker ikke har brukt GM-soya sprøytet med de relevante herbicidene (2,4-D og glufosinat-ammonium).

Det understrekes også at NOAEL bør vurderes ut fra 90-dagers repeterte dosestudier. I disse sub-kroniske studiene benyttes minst to doser av henholdsvis testfôr og umodifisert kontrollfôr. Forsøksdyrene er eksponert over et så langt tidsrom at eventuelle uheldige helseeffekter ville blitt oppdaget. Musene er også eksponert for høyere konsentrasjoner av AAD-12 og PAT enn hva mennesker (>2000 ganger), og dyr ville vært eksponert for i en naturlig ernæringsmessig situasjon.



## 4.2 Allergenitet

### *Undersøkelse av nedbrytning av AAD-12-protein i simulert magesaft*

Med enkelte unntak, er proteiner som er matallergener generelt varme- og syrestabile. Proteinene er stabile både overfor mage- og tarmsafter, og er ofte hovedprotein-komponenter i matvaren. Typiske mengder er fra 1 til 80 % av proteininnholdet. AAD-12-proteinet som er benyttet i undersøkelsene for allergenitet er produsert av bakterien *Pseudomonas fluorescens*. Proteinene hadde i denne sammenhengen en renhet på 35,3 %. AAD-12 ble testet i simulert magesaft (SGF). Mengde AAD-12 i SGF-analysen var 1,67 µg. Nedbrytning av bakterie-produsert AAD-12 i SGF ved pH 2 er hurtig, og AAD-12 protein ble degradert fullstendig innen 30 sekunder. Påvisningsgrensen med fargestoffet GelCode Blue G på SDS-PAGE gel er 0,0025 µg. Påvisningen av AAD-12 og fragmenter fra proteinet er utført med Western-blot ved bruk av antistoff mot proteinet. Søker hevder med grunnlag i denne testen at proteinet brytes raskt ned i menneskets magesekk. Degradering av proteinet ble ikke videre undersøkt i simulert tarmsaft. Som positiv og negativ kontroll ble det benyttet henholdsvis bovint serum albumin (BSA) og β-laktoglobulin. BSA ble brutt ned i løpet av 30 sekund, mens β-laktoglobulin var stabilt i 16 minutter.

### *Undersøkelse av eventuell glykolisering av AAD-12-protein*

Søkers dokumentasjon inkluderer en undersøkelse av glykosylering av AAD-12-proteinet. AAD-12-protein er produsert av bakterien *Pseudomonas fluorescens*. Analyse av eventuelle bundne suktermolekyler på AAD-12-protein ble foretatt med metoden GelCode Glycoprotein Stain fra firmaet Pierce. Soya-trypsinhemmerprotein og BSA ble brukt som negativ kontroll, og proteinet pepperrotperoksidase ble brukt som positiv kontroll. Det ble ikke påvist suktermolekyler på AAD-12-proteinet.

På bakgrunn av at det ikke ble funnet sekvenshomologi til allergene proteiner, glykosyleringssteder på AAD-12-proteinet, rask nedbrytning i magesaft ved pH=2, og varmelabilitet, samt at mengden av AAD-12-protein i frø fra DAS-68416-4 er målt til ca. 30 µg/g tørrvekt frø, konkluderer faggruppen med at det er lite sannsynlig at AAD-12-proteinet vil utgjøre et allergent potensiale for mennesker.

### *Spesifikk serumscreening:*

For å evaluere om DAS-68416-4 har fått endret innhold av endogene allergener i forhold til kontrollsoya, har søker foretatt spesifikke *in vitro* serumscreening ved bruk av sera fra fire personer med soyaproteinallergi (se vedlegg *Stagg 2010*). Vannekstrakter fra nær isogen soyalinje Maverick og DAS-68416-4 ble med sera fra fire soyaallergikere analysert enkeltvis ved hjelp av enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (*Stagg 2010*). Sera fra de samme fire personene med soyaallergi ble også slått sammen og brukt til analyse av vannekstrakter fra nær isogen soyalinje Maverick, DAS-68416-4 og 3 kontrollinjer ved hjelp av enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (*Stagg 2010*). I henhold til søker viser påvisning med sera fra soyaallergikere, ingen forskjeller i reaktivitet mot ekstrakter fra DAS-68416-4, Maverick og de kommersielle soyalinjene (*Stagg 2010*). Det bemerkes at avvikene fra middelverdien for de enkelte ELISA testene er svært store.

Når det gjelder undersøkelse av allergent potensiale av PAT-proteinet henvises det tidligere negative undersøkelser i andre risikovurderinger gjort av søker (s 136 i søknad).

### *Gelelektroforese av proteiner i vannekstrakter fra DAS-68416-4*

Både 1-D og 2-D natriumdodecylsulfat (SDS)-polyakrylamidgelelektroforese (SDS-PAGE) ble benyttet for å undersøke på ekstrakter fra DAS-68416-4 og isogen kontroll Maverick. I tillegg er det utført 1-D gelelektroforese på ekstrakter fra fem kommersielle soyalinjer. Søker har utført tre undersøkelser med SDS-PAGE.

I den første undersøkelsen ble gelene etter proteinseparasjon med SDS-PAGE farget med Commassie Blue (Stagg 2010). I henhold til søker er det ikke påvist endringer i protein mønster og - nivå mellom DAS-68416-4, Maverick og de fem forskjellige soyalinjene ved farging med Commassie Blue.

#### *Undersøkelse av sammensetning av allergene proteiner i DAS-68416-4*

For om mulig å påvise endret sammensetning av allergene proteiner i DAS-68416-4 ble det foretatt 1D SDS-gelelektroforetiske undersøkelser av soyaekstrakter fra DAS-68416-4, Maverick og fem kontroller av umodifisert soya (Stagg 2010). Gelelektroforesene ble etterfulgt av Western-blot av gelene og påvisning med sera fra soya-allergikere. Ved 1D-gel, Western-blot og påvisning av allergene proteiner ved bruk av sera enkeltvis fra 20 soya-allergikere, ble det i henhold til søker ikke påvist forskjeller mellom ekstraktene fra umodifisert soya Maverick, fem kontrollsoyaer og DAS-68416-4 (Stagg 2010). Det ble også utført todimensjonal (2D) gelelektroforese av ekstrakter fra DAS-68416-4 og Maverick, etterfulgt av Western-blot og påvisning enkeltvis med sera fra seks soya-allergikere. Analysene viser i henhold til søker at det ikke er påvist endringer med hensyn til soya-allergener i umodifisert- og genmodifisert soya (Technical Dossier side 139 og 140, ref. Harpham & Stagg 2010).

Søker hevder at innsetting av AAD-12-proteinet i soya ikke fører til kvalitative og kvantitative endringer av endogene allergene proteiner i DAS-68416-4.

Faggruppen bemerker at 1D-Western blottene og de spesifikke IgE immunologiske påvisningene av soya-allergener er svært variable. Det synes som om det kan være forskjeller mellom DAS-68416-4 og næringslinje Maverick.

### **4.3 Vurdering basert på tilgjengelig datagrunnlag**

AAD-12- og PAT-proteinene, som uttrykkes som følge av genmodifiseringen, har ingen likheter med kjente allergener eller egenskaper som tilsier at de kan virke som allergener. Basert på testene som er omtalt i søkers dokumentasjon og som er vurdert av faggruppen, anser faggruppen det som lite trolig at tilstedeværelse at disse proteinene i soyalinjen DAS-68416-4 medfører et større potensiale for utvikling av matallergi hos mennesker sammenlignet med umodifisert soya. Det bemerkes at de antistoffbaserte analysene viste stor variasjon mellom enkeltprøver.

Søker har utført 14-dagers akutt oral eksponeringsstudier (OECD retningslinje 401, 423) og 28-dagers føringforsøk (OECD retningslinje 407) på mus med AAD-12-protein. Når det gjelder akutt oral eksponeringsstudier med PAT-protein henviser søker til tidligere studier.

Faggruppen påpeker at søkers 28-dagers føringforsøk er utført med en renhet på 35,3 %. Faggruppen stiller spørsmålsteget ved bruk av testsubstans med så lav renhetsgrad, og mener at føringforsøket derfor er av begrenset verdi. Faggruppen etterlyser også analyseresultater av de øvrige komponentene i testsubstansen.

Faggruppen bemerker også at akutt oral toksisitetsstudier med sonde er lite relevante i vurderingen av helseeffekter av mat og fôr fra genmodifiserte planter.

Søker har fastsatt en NOAEL fra akutt oral eksponeringsstudien på mus. Faggruppen påpeker at akutt oral toksisitetsstudier (OECD 401 eller 423) ikke er anbefalte studier for beregning av NOAEL. Dette fordi disse studiene er basert på en enkelt dosering og ett dosenivå, med en observasjonsperiode på kun 14 dager. Fra akutt oral toksisitetsstudier bestemmes LD50, ikke NOAEL.

Faggruppen har, via innspill til EFSA's GMO Extranet, påpekt at søker burde ha utført 90-dagers repeterte dosestudier. I slike sub-kroniske studier benyttes det minst to doser av både test- og

kontrollfôret, og forsøksdyrene blir eksponert over et så langt tidsrom at eventuelle uheldige helseeffekter ville blitt oppdaget.

Søker har også utført 42 dagers fôringsforsøk med fôr som inneholder mel fra soya DAS-68416-4, en umodifisert, nærisonogen kontrollinje og tre referansesorter. Søker hevder at det ikke ble påvist relevante biologiske endringer i de målte parametrene ved fôring med DAS-68416-4, sammenlignet med kontroll og referansesorter. Faggruppen er ikke enig i søkers konklusjon. Dette fordi fôringsforsøket med broilere viste lavere fôrinntak, tilvekst og fôrutnyttelse hos hannbroilere fôret med DAS-68416-4 sammenlignet kontrollgruppen. Faggruppen påpeker også, ved innspill til EFSA's GMO Extranet, at søker heller ikke har brukt DAS-68416-4 sprøytet med de tiltenkte herbicidene i fôringsforsøket.

Fiskemel og fiskeolje har til en viss grad blitt erstattet av soyamel og soyaolje som fôr til oppdrettsfisk. Søker har imidlertid ikke utført toksisitetsstudier på fisk med fôr som inneholder soyalinjen DAS-68416-4. Faggruppen anmoder, ved innspill til EFSA's Extranet, søker om å utføre fôringsstudier på fisk, først og fremst på laksefisk. Denne informasjonen ville ha gitt et bedre grunnlag for å vurdere eventuelle toksiske effekter på oppdrettsfisk.

På bakgrunn av dyreforsøk av begrenset omfang og kvalitet er det vanskelig å vurdere om eksponering for AAD-12- og PAT-protein i seg selv og den genmodifiserte soyaen, vil føre til helseskader. Det eneste fôringsforsøket på produksjonsdyr er utført på broilere, med bruk av soya som ikke er sprøytet med de aktuelle herbicidene.

## 5 Miljørisikovurdering

Søknad om godkjenning av soyalinjen DAS-68416-4 under EU forordning 1829/2003/EF omfatter bruksområdene fôrvarer, næringsmidler, import og prosessering. Søknaden gjelder ikke dyrking. Miljørisikovurderingen av den transgene soyalinjen er derfor avgrenset til mulige effekter av utilsiktet frøspredning i forbindelse med transport og prosessering til mat, fôr og ulike industrielle formål. I tillegg vil indirekte eksponering gjennom gjødsel fra husdyr fôret med genmodifisert soya representere en mulig kilde til uønsket genspredning.

### 5.1 Potensiale for ikke-tilsiktete effekter på fitness relatert til genmodifiseringen

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

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

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

Spredning av soya til andre habitater i Europa er i hovedsak begrenset av manglende frøkvile, liten toleranse for lave temperaturer og dårlig konkurransevne. Det er ikke påvist forskjeller mellom soyalinjen DAS-68416-4 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 soya.

### 5.2 Potensiale for genoverføring

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

### 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, 2009; VKM 2005).

Ut fra dagens vitenskapelige 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 DAS-68416-4 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; Rizzi et al. 2012). 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.

Disse mengdene må imidlertid multipliseres med skalaen for dyrking, som er svært omfattende. I studiene til De Vries & Wackernagel var forutsetningen for overføring sekvenshomologi mellom plantetransgenet og mottagerbakterien. I hvilken grad det forekommer tilfeldig sekvenshomologi mellom plantetransgener og andre naturlig forekommende bakterier er usikkert (Bensasson et al. 2004).

Med bakgrunn i opprinnelse og karakter/egenskaper av de innsatte genene og mangel på seleksjonspress i fordøyelseskanal, er sannsynligheten for at horisontal genoverføring vil gi selekterbare fordeler til eksponerte mikroorganismer svært liten (Nielsen 2003). Det er derfor usannsynlig at gener fra DAS-68416-4 vil etableres stabilt i genomet til mikroorganismer i miljøet eller i fordøyelseskanalene hos mennesker eller dyr. Det påpekes imidlertid at det er begrensninger i metodikk (Nielsen & Townsend 2004).

### 5.2.2 Vertikal genoverføring

Soya dyrkes ikke i Norge, og arten har ikke viltvoksende populasjoner eller nærstående arter utenfor dyrking i Europa. Utilsiktet 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.

Potensialet for krysspollinering mellom DAS-68416-4 og konvensjonelt foredlete soyasorter i dyrkingsområder for soya i Europa vil avhenge av utilsiktet frøspredning i forbindelse med transport, håndtering og prosessering. Det er imidlertid lite sannsynlig at sporadiske enkeltplanter vil spre signifikante mengder pollen til konvensjonelle dyrkingsfelt, og risiko for utkryssing med dyrkede sorter vurderes derfor til å være ubetydelig. Økt herbicidtoleranse vil ikke representere noen selektiv fordel for spredning av soya i Europa.

### 5.3 Miljøovervåkingsplan

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

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

Søknaden EFSA/GMO/NL/2011/91 omfatter ikke dyrking, og potensiell miljøeksponering av den transgene soyalinjen er derfor avgrenset til mulige effekter av utilsiktet frøspredning i forbindelse med transport og prosessering til mat, fôr og industrielle formål. I tillegg vil indirekte eksponering gjennom gjødsel fra husdyr fôret med genmodifisert soya representere en mulig kilde til uønsket genspredning. Miljørisikovurderingen som er presentert av søker identifiserer ingen endret risiko for miljø i forhold til annen soya. Dow AgroScience har derfor ikke utarbeidet spesifikke strategier for risikohåndtering eller en særskilt plan for overvåking av denne eventen.

Tatt i betraktning tiltenkt bruksområde for DAS-68416-4 anser Faggruppe for GMO at det ikke er behov for å iverksette særskilt program for overvåking av soyalinjen.

### 5.4 Vurdering basert på tilgjengelig dokumentasjon

Søknaden gjelder godkjenning av soyalinjen DAS-68416-4 for import, prosessering og til bruk i næringsmidler og fôrvarer, og omfatter ikke dyrking. Med bakgrunn i tiltenkt bruksområde er miljørisikovurderingen avgrenset til mulige effekter av utilsiktet frøspredning i forbindelse med transport og prosessering, samt indirekte eksponering gjennom gjødsel fra husdyr fôret med genmodifisert soya.

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

## 6 Vurdering av søkers dokumentasjon, kunnskapshull

Helse- og miljørisikovurderingen av den genmodifiserte soyalinjen DAS-68416-4 er basert på søkers dokumentasjon som er gjort tilgjengelig på EFSA's nettside GMO Extranet. I tillegg er det benyttet uavhengige faglig ekspertise og andre vitenskapelige publikasjoner i vurderingen.

På bakgrunn av dyreforsøk av begrenset omfang og kvalitet, finner faggruppen søkers dokumentasjon ufullstendig til å foreta en fullstendig helserisikovurdering av den genmodifiserte soyalinjen i henhold til tiltenkt bruk i EU/EØS-området, og i overensstemmelse med miljø- og helsekravene i matloven og genteknologiloven med forskrifter, samt i henhold til kravene i EUs forordning 1829/2003/EF og utsettingsdirektiv 2001/EF.

Det eneste fôringsforsøket på produksjonsdyr er utført på broilere, med bruk av soya som ikke er sprøytet med de aktuelle herbicidene.

Faggruppen har derfor, via innspill til EFSA GMO Extranet, etterspurt mer informasjon relatert til manglende analyser av restnivå av tiltenkte herbicider og deres metabolitter. Videre etterlyses 90 dagers subkroniske studier, samt fôringsstudier på fisk, først og fremst på laksefisk. Denne informasjonen vil gi et bedre grunnlag for å vurdere eventuelle toksiske effekter på oppdrettsfisk.

Studiene på fôringsforsøk på broilere viser også effekter som ikke er diskutert av søker.

Risikovurdering av den genmodifiserte soyalinjen vil ferdigstilles av faggruppen når endelig dokumentasjon fra søker foreligger.



## **7 Innspill til EFSA GMO Extranet søknad EFSA/GMO/NL/2011/91**

### **Innspill til EFSA GMO Extranet søknad EFSA/GMO/NL/2011/91**

#### **D.07.08**

#### **Toxicology**

The Norwegian Panel on Genetically Modified Organism (GMO Panel) has evaluated the DAS-68416-4 as a food and feed ingredient.

All animal experiments are performed using soybean unexposed to 2,4-D and glufosinate. Herbicide treated soya should have been included in the animal experiments, and the residue level of the herbicides and their metabolites should have been analysed.

Fish meal and fish oil has to some extent been replaced by plant meal and plant oil in the aquaculture industry. Soy meal and soy oil is today important ingredients in feed for marine fish. The Norwegian GMO Panel request that the applicant perform feeding studies on fish, primarily in salmonides.

The Panel points out that the effects in males on feed intake, daily gain and feed efficiency in the broiler study should not be overlooked. Moreover, a NOEL is determined based on the acute study Guideline No. 423. According to the OECD guidelines it is recommended to determine NOAEL based on a 90 days sub-chronic study (OECD guidelines 408).

OECD Guideline for Testing of Chemicals; Guideline No. 423: Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method and OECD Guideline for Testing of Chemicals; Guideline No. 407: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity-Study in Rodents; are not recommended for setting an NOEL since they are limited to 14 and 28 days observation period. The acute study is designed for determination of LD<sub>50</sub>.

The opinion of the GMO Panel is that 90 days sub-chronic study should have been conducted (OECD 408) because that study gives a longer observation period for detection of eventually toxic effects. The GMO Panel finds it difficult to conclude that soy meal is non-toxic since there are indications of effects on males from the 42 days broiler study.

Limited studies make it challenging to perform a complete risk assessment.



## Foreløpig vurdering basert på tilgjengelig datagrunnlag

### Molekylær karakterisering

Faggruppen vurderer karakteriseringen av det rekombinante DNA-innskuddet i DAS-68416-4, og den fysiske, kjemiske og funksjonelle karakteriseringen av proteinene til å være tilfredsstillende. Faggruppen har ikke identifisert noen risiko knyttet til det som framkommer av den molekylærbiologiske karakteriseringen av det rekombinante innskuddet i soyalinjen.

### Komparative analyser

Analysen av ernæringsmessige komponenter er i hovedsak utført i tråd med OECDs konsensusdokument for soya (OECD 2009). Søker har analysert for innhold av ernæringsrelaterte komponenter i testlinjen DAS-68416-4 (usprøytet og sprøytet med tiltenkte herbicider). Det er påvist statistisk signifikante forskjeller mellom DAS-68416-4 og kontroll i enkeltparametere. Forskjellene er imidlertid ikke konsistente over forsøksfelt, og verdiene for de analyserte komponentene ligger innenfor typiske verdier for andre soyasorter som er rapportert i litteraturen, og innenfor variasjonsområdene til kommersielle referansesorter som er inkludert i søkers dokumentasjon. Faggruppen konkluderer med at forskjellene som er påvist ikke har ernæringsmessig betydning.

Faggruppen påpeker at søker ikke har foretatt analyser av vitamin K og fosfatider i lecitin. Det understrekes at konsensusdokumentet i størst mulig grad skal følges når det legges fram dokumentasjon på nivåene av næringsstoffer, antinæringsstoffer og metabolitter.

Når det gjelder fitoøstrogener, har søker slått sammen resultatene for de enkelte isoflavoner innenfor hver av isoflavongruppene. Det er stor variabilitet innenfor hver gruppe og faggruppen etterspør statistiske analyser for hver enkelt forbindelse innenfor hver isoflavongruppe.

Feltforsøk over en vekstsesong i USA viser små eller ingen signifikante forskjeller mellom den transgene soyalinjen DAS-68416-4 (usprøytet og sprøytet med tiltenkte herbicider) og umodifisert kontroll med hensyn på morfologiske og agronomiske egenskaper.

### Toksisitet og allergisitet

AAD-12- og PAT-proteinet, som uttrykkes som følge av genmodifiseringen, har ingen likheter med kjente allergener eller egenskaper som tilsier at de kan virke som allergener. Basert på testene som er omtalt i søkers dokumentasjon og som er vurdert av faggruppen, anser faggruppen det som lite trolig at tilstedeværelse av disse proteinene i soyalinjen DAS-68416-4 medfører et større potensiale for utvikling av matallergi hos mennesker sammenlignet med umodifisert soya.

Søker har utført 14-dagers akutt oral eksponeringsstudier (OECD retningslinje 401, 423) og 28-dagers føringsforsøk (OECD retningslinje 407) på mus med AAD-12-protein. Når det gjelder akutt oral eksponeringsstudier med PAT-protein henviser søker til tidligere studier.

Faggruppen påpeker at søkers 28-dagers føringsforsøk er utført med en renhet på 35,3 %. Faggruppen stiller spørsmålsteget ved bruk av testsubstans med så lav renhetsgrad, og mener at føringsforsøket derfor er av begrenset verdi. Faggruppen etterlyser også analyseresultater av de øvrige komponentene i testsubstansen.

Faggruppen bemerker også at akutt oral toksisitetsstudier med sonde er lite relevante i vurderingen av helseeffekter av mat og fôr fra genmodifiserte planter.

Søker har fastsatt en NOAEL fra akutt oral eksponeringsstudien på mus. Faggruppen påpeker at akutt oral toksisitetsstudier (OECD 401 eller 423) ikke er anbefalte studier for beregning av NOAEL. Dette fordi disse studiene er basert på en enkelt dosering og ett dosenivå, med en observasjonsperiode på kun 14 dager. Fra akutt oral toksisitetsstudier bestemmes LD50, ikke NOAEL.

Faggruppen har, via innspill til EFSA's GMO Extranet, påpekt at søker burde ha utført 90-dagers repeterte dosestudier. I slike sub-kroniske studier benyttes det minst to doser av både test- og kontrollfôret, og forsøksdyrene blir eksponert over et så langt tidsrom at eventuelle uheldige helseeffekter ville blitt oppdaget.

Søker har også utført 42 dagers fôringsforsøk med fôr som inneholder mel fra soya DAS-68416-4, en umodifisert, nær-isogen kontrollinje og tre referansesorter. Søker hevder at det ikke ble påvist relevante biologiske endringer i de målte parametrene ved fôring med DAS-68416-4, sammenlignet med kontroll og referansesorter. Faggruppen er ikke enig i søkers konklusjon. Dette fordi fôringsforsøket med broilere viste lavere fôrintak, tilvekst og fôrutnyttelse hos hannbroilere fôret med DAS-68416-4 sammenlignet kontrollgruppen. Faggruppen påpeker også, ved innspill til EFSA's Extranet, at søker heller ikke har brukt DAS-68416-4 sprøytet med de tiltenkte herbicidene i fôringsforsøket.

Fiskemel og fiskeolje har til en viss grad blitt erstattet av soyamel og soyaolje som fôr til oppdrettsfisk. Søker har imidlertid ikke utført toksisitetsstudier på fisk med fôr som inneholder soyalinjen DAS-68416-4. Faggruppen anmoder, ved innspill til EFSA's GMO Extranet, søker om å utføre fôringsstudier på fisk, først og fremst på laksefisk. Denne informasjonen ville ha gitt et bedre grunnlag for å vurdere eventuelle toksiske effekter på oppdrettsfisk.

På bakgrunn av dyreforsøk av begrenset omfang og kvalitet er det vanskelig å vurdere om eksponering for AAD-12- og PAT-protein i seg selv og den genmodifiserte soyaen, vil føre til helseskader. Det eneste fôringsforsøket på produksjonsdyr er utført på broilere, med bruk av soya som ikke er sprøytet med de aktuelle herbicidene.

### **Miljørisiko**

Søknaden gjelder godkjenning av soyalinjen DAS-68416-4 for import og prosessering under direktiv 2001/18/EF del C og til bruk i næringsmidler og fôrvarer under forordning (EF) 1829/2003. Faggruppen har derfor ikke vurdert mulige miljøeffekter knyttet til dyrking av soyalinjen. Faggruppen finner ingen indikasjoner på økt sannsynlighet for spredning, etablering og invasjon av soyalinjen i naturlige habitater eller andre arealer utenfor jordbruksområder som resultat av frøspill i forbindelse med transport og prosessering. Soya dyrkes ikke i Norge, og arten har ikke viltvoksende populasjoner eller nærstående arter utenfor dyrking i Europa. Det er derfor ikke risiko for utkryssing med dyrkede sorter eller ville planter i Norge.

Risikovurderingen av den genmodifiserte soyalinjen vil ferdigstilles og slutføres av faggruppen når endelig dokumentasjon fra søker foreligger.

## Referanser

- Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society B* 57: 289-300.
- Bensasson D, Boore JL, Nielsen KM. (2004) Genes without frontiers. *Heredity*, 92: 483-489.
- Canada (2011) <http://www.inspection.gc.ca/english/plaveg/bio/subs/subliste.shtml>
- CERA (2010) Center for Environmental Risk Assessment. GM Database for safety information. [http://cera-gmc.org/index.php?action=gmc\\_crop\\_database](http://cera-gmc.org/index.php?action=gmc_crop_database)
- 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.
- DFL (1991) (Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, 1991), "Composition of Soybeans-Distribution of Nutrients (in Dried Seeds)", WVG, Stuttgart, - available online at the Internet Symposium on Food Allergens Vol. 12: pp. 51-79 (1991-35 (2000), Allergen data Collections; Soybean (*Glycine max*). [www.food-allergens.de/symposium-vol1\(2\)/data/soy/soy-composition.htm](http://www.food-allergens.de/symposium-vol1(2)/data/soy/soy-composition.htm)
- 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 (2006) 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 (2008) Vitamin K2 added for nutritional purposes in foods for particular nutritional uses, food supplements and foods intended for the general population, and Vitamin K2 as a source of vitamin K added for nutritional purposes to foodstuffs, in the context of Regulation (EC) N° 258/971. *The EFSA Journal* 822: 1- 31.
- EFSA (2009) Use of antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified plants. Scientific Opinion of the Panel on Genetically Modified Organisms (GMO) and the Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). *The EFSA Journal* 1034: 1-82. [http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/Statement/gmo\\_biohaz\\_st\\_ej1108\\_ConsolidatedARG\\_en.pdf?ssbinary=true](http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/Statement/gmo_biohaz_st_ej1108_ConsolidatedARG_en.pdf?ssbinary=true)
- EFSA (2010) Guidance on the environmental risk assessment of genetically modified plants. Scientific opinion from the EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO). *The EFSA Journal* 8 (11):1-111. <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/1879.pdf>
- EFSA (2011) Guidance for risk assessment of food and feed from genetically modified plants. *The EFSA Journal* 9(5): 2150. <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2150.pdf>

- EPA-FIFRA (1989) US Environmental Protection Agency, Title 40 CFR, Part 160-Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act (FIFRA); Good Laboratory Practice Standards, Final Rule.
- FAOSTAT (2006) <http://faostat.fao.org>
- Herman PL, Behrens M, Chakraborty S, Chrastil BM, Barycki J, Weeks DP. (2005) A three-component dicamba O-demethylase from *Pseudomonas maltophilia*, strain DI-6: gene isolation, characterization, and heterologous expression, *J Biol Chem* 280: 24759-24767.
- ILSI (2006) Crop Composition Database, International Life Science Institute. Washington D.C., website. <http://www.cropcomposition.org>
- ILSI (2008) ILSI Crop Composition Database (2008) International Life Science Institute, Washington, DC. Accessible at: <http://www.cropcomposition.org/>.
- Japan (2009) NFRI-NARO (National Food Research Institute; NARO, Japan) (2009), "Food Composition Database for Safety Assessment of Genetically Modified Crops as Foods and Feeds", Soybean, available online at: <http://afdb.dc.affrc.go.jp/afdb/index-e.asp>  
[http://www.bch.biodic.go.jp/download/en\\_lmo/DAS-68416-4enUR.pdf](http://www.bch.biodic.go.jp/download/en_lmo/DAS-68416-4enUR.pdf)
- L'Hocine L, Boye JI (2007) Allergenicity of Soybean: New Developments in Identification of Allergenic Proteins, Cross-Reactivities and Hypoallergenization Technologies. *Crit Rev Food Sci and Nutr*, 47: 2127-2143.
- Lid J, Lid DT (2005) Norsk flora. Det Norske Samlaget, Oslo. 7. utgave. 1230 s. ISBN: 82-521-6029-8.
- Lu BR (2005) Multidirectional gene flow among wild, weedy and cultivated soybeans. In: (Gressel J ed.): *Crop Fertility and Volunteerism*. CRC- Taylor and Friends (Boca Raton): 137-147.
- Netherwood T, Martín-Orúe SM, O'Donnell AG, Gockling S, Graham J, Mathers JC, Gilbert HJ (2004) Assessing the survival of transgenic plant DNA in the human gastrointestinal tract. *Nature Biotechnology* 22: 204-209.
- Nielsen KM, van Elsas JD, Smalla K (2000) Transformation of *Acinetobacter* sp. BD413 (pFG4deltanptII) with transgenic plant DNA in soil microcosms and effects of kanamycin on selection of transformants. *Applied Environmental Microbiology*, 66: 1237-42.
- Nielsen K. (2003) An assessment of factors affecting the likelihood of horizontal transfer of recombinant plant DNA to bacterial recipients in the soil and rhizosphere. *Collection of Biosafety Reviews (Italy)*, 1: 96-149.
- Nielsen KM, Townsend JP. (2004) Monitoring and modeling horizontal gene transfer. *Nature Biotechnol* 22(9): 1110-1114.
- NRC (1994) *Nutrient Requirements of Poultry* (9th Revised Edition), Sell J.L., Kratzer F.H., Latshaw J.D., Leeson S.L., Morant E.T., Parson C.M., Waldroup P.W., eds. Nat. Academy Press, Washington D.C., U.S.A.
- NRC (1998) *Nutrient Requirements of Swine* (10th revised Edition), Cromwell G.L., Baker D.H., Ewan R.C., Kornegay E.T., Lewis A.J., Pettigrew J.E., Steele N.C., Thacker P.A., eds. Nat. Academy Press, Washington D.C., U.S.A.

- NRC (2000) Nutrient Requirements of Beef Cattle (Update of the 7th Revised Edition-1996), Buchanan-Smith J.G., Berber L.L., Ferrell C.L., Fox D.G.G, Galyean M.L., Hutcheson D.P., Klopfenstein T.J., Spears J.W., eds. Nat. Academy Press, Washington D.C., U.S.A.
- NRC (2001) Nutrient Requirements of Dairy Cattle (7th Revised Edition), Clark J.H., Beede D.K., Erdman R.A., Goff J.P., Grummer R.R., Linn J.G., Pell A.N., Schwab C.G., Tomkins T., Varga G.A., Weiss W.P., eds. Nat. Academy Press, Washington D.C., U.S.A.
- OECD (1997) OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice AND Compliance Monitoring, Number 1. OECD Principles on Good Laboratory Practice (revised 1997) ENV/MC/CHEM (98)17.
- OECD (2000) Consensus Document on the Biology of *Glycine max* (L.) Merr. (Soybean). Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology, Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No.15 document, ENV/JM/MONO (2000) 9. [http://www.olis.oecd.org/olis/2000doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono\(2000\)9](http://www.olis.oecd.org/olis/2000doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2000)9)
- OECD (2001) Consensus Document on Compositional Considerations for New Varieties of Soybean: Key Food and Feed Nutrients and Anti-nutrients. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris. [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2001\)15&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2001)15&docLanguage=En)
- OECD (2009) Consensus Document on Compositional Consideration for New Varieties of Soybean: Key Food and Feed Nutrients and Anti-nutrients. Revised document. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris. [http://www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono\(2001\)15](http://www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2001)15)
- Plantevernguiden (2011) <http://www.plantevernguiden.no/>
- Ramazzoti M, Mulinacci N, Pazzagli L, Moriondo M, Manao G, Vincieri FF, Degl'Innocenti D. (2008) Analytic Investigations on Protein Content in Refined Seed Oils: Implications in Food Allergy. Food Chem Toxicol, 46 (11): 3383-3388.
- Rizzi AN, Raddadi C, Sorlini L, Nordgård L, Nielsen KM, Daffonchio D ( 2012) The stability and degradation of dietary DNA in the gastrointestinal tract of mammals - implications for horizontal gene transfer and the biosafety of GMOs. Crit. Rev. Food Science Nutr. 52:142-161.
- Schubbert GW, 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.
- USDA-ARS (Agriculture Research Service) (2009) USDA Nutrient Database for Standard Reference, Release 22, Nutrient Data Laboratory Home Page, USDA, Washington D.C., website <http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=8964>
- WHO (2011) GEMS Cluster diets, <http://www.who.int/foodsafety/chem/gems/en/index1.html>, last accessed January 3, 2011.
- VKM (2005) Report from an Ad Hoc Group appointed by the Norwegian Scientific Panel on Genetically Modified Organisms and Panel on Biological Hazards – An assessment on

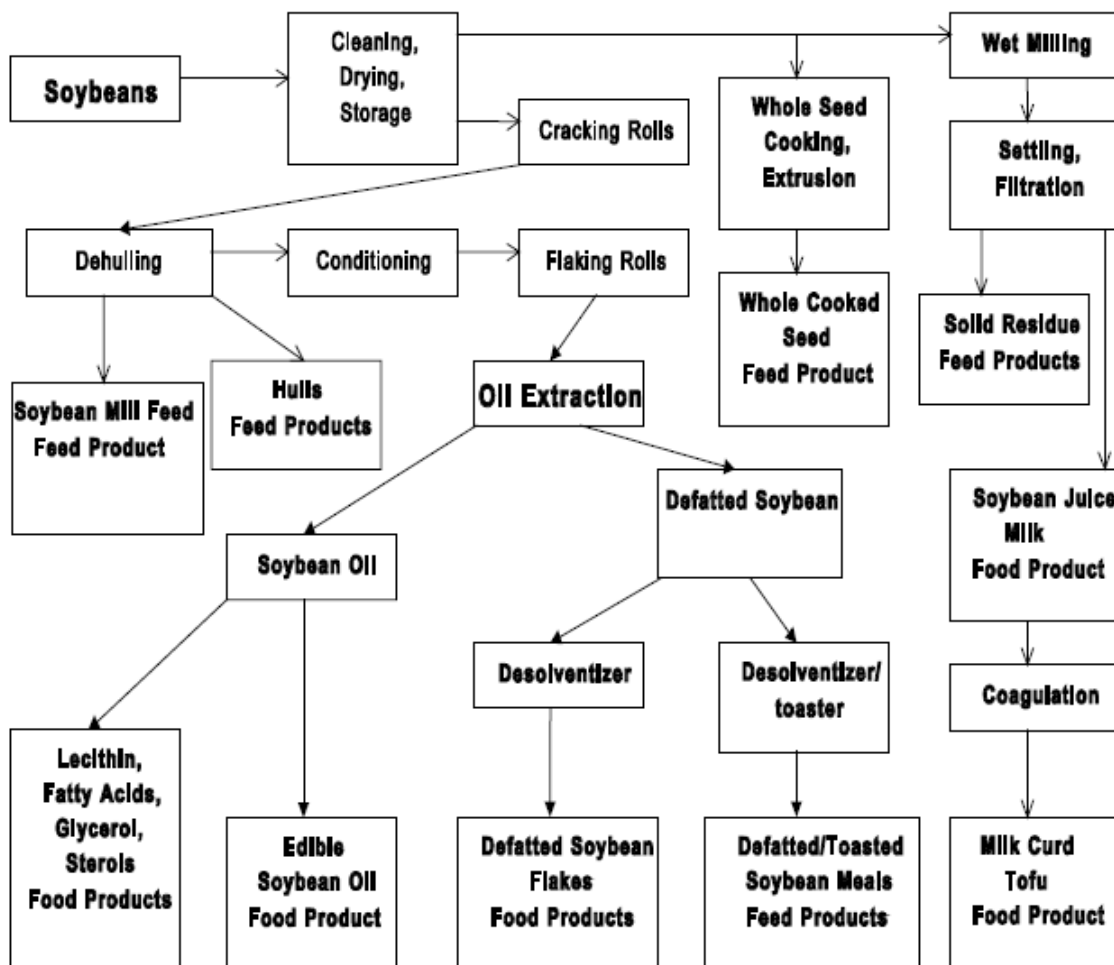
potentially long-term health effects caused by antibiotic resistance marker genes in genetically modified organisms based on antibiotic usage and resistance patterns in Norway. Opinion 05/302-1-final. Norwegian Scientific Committee for Food Safety, Oslo, Norway 62 p.

## Vedlegg 1

### Prosessering av soyabønne.

Ved prosessering av soyabønne dannes det en rekke produkter, som olje, proteinisolat, proteinkonsentrat, avfette rostet mel, avfettet mel, fôrprodukter m.m., se oversikt hentet fra OECDs soyadokument. Søker har lagt ved oversikter over produksjon av de forskjellige fraksjonene som ble produsert hos ITAL, se oversikt merket henholdsvis figur A, B og C.

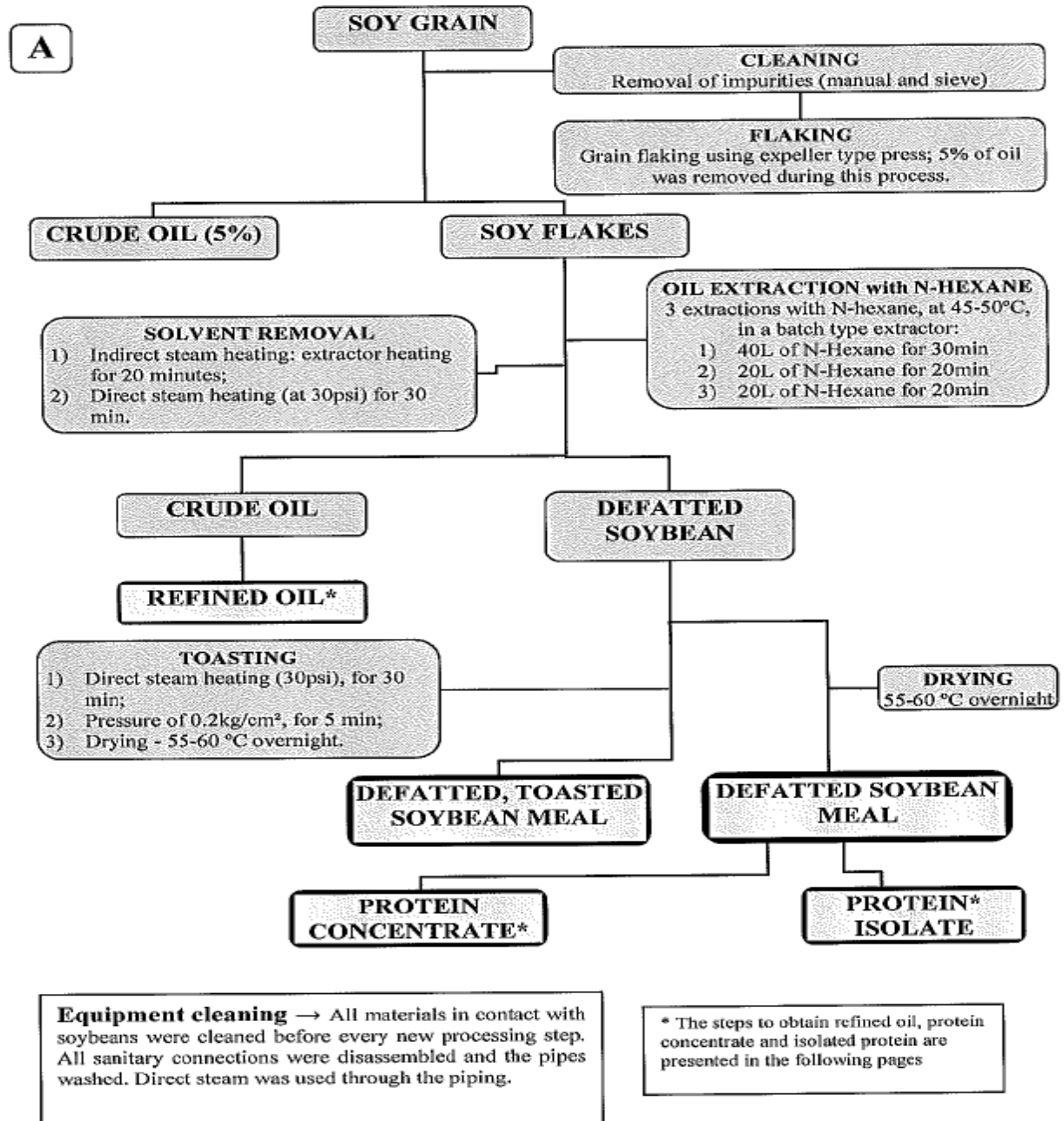
#### WHOLE SOYBEAN PROCESSING





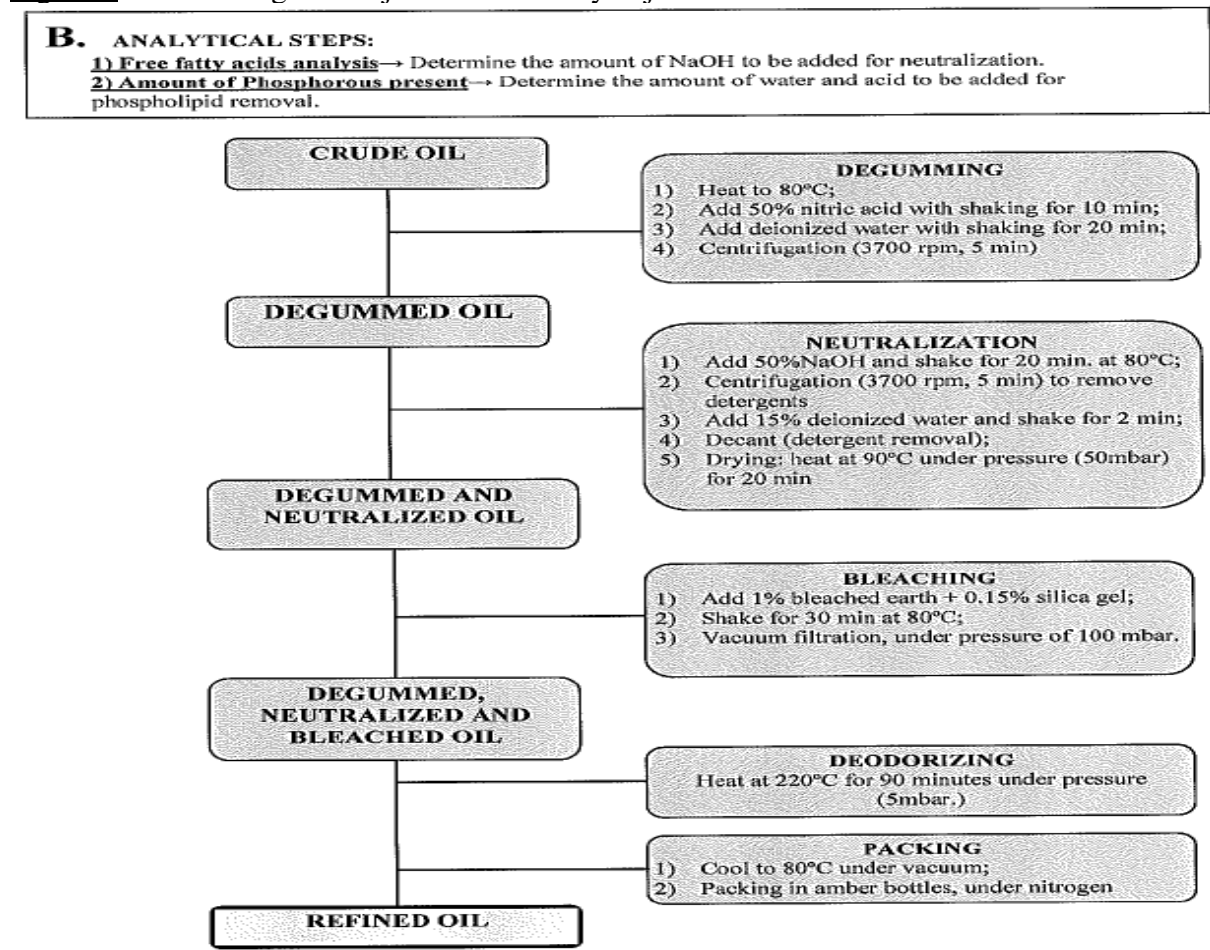
Søkers skjematisk fremstilling av prosessering av soyabønne (figur A), soyaolje (figur B) og proteinisolat og proteinkonsentrat (figur C).

Figur A. Prosessering av soyabønne

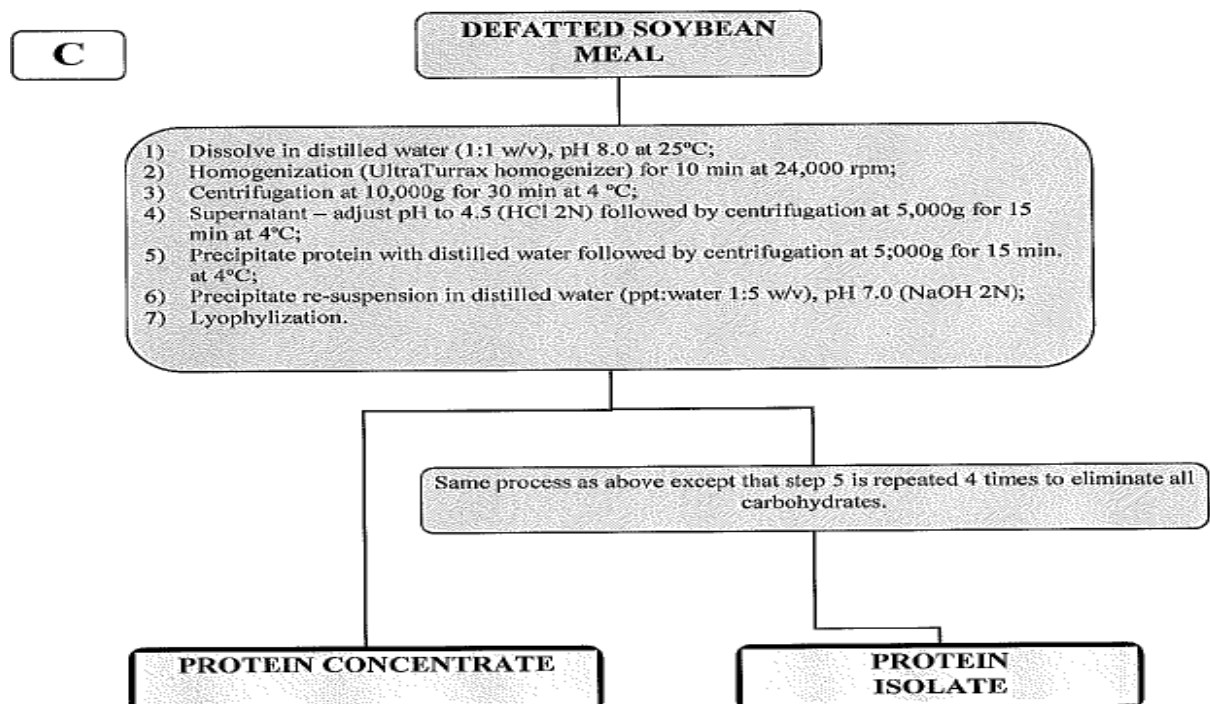




Figur B: Prosessering av råolje til raffinert soyaolje



Figur C: Prosessering av avfettet soyamel til proteinisolat og proteinkonsentrat.



## Vedlegg II

**Tabell 1. Oversikt over registreringer av morfologiske, agronomiske og sjukdomskarakterer i forsøksruter med umodifisert kontroll (cv. Maverick), referansesorter og testlinjen DAS-68416-4, usprøytet og behandlet med henholdsvis glufosinat ammonium (GA), 2,4D og GA+2,4D.**

1. **Early Population** = Evaluation Timing (VC-V2) - Number of plants emerged in rows of each plot; scale -Stand count divided by number of seeds planted (0-100%.
2. **Seedling Vigor** = Evaluation Timing (VC-V2) - Visual estimate of average vigor of emerged plants per plot; scale - 1-10 Scale based on growth of the non-transformed soybeans.
3. **Plant Vigor/Injury** = Evaluation Timing (After applications) - Injury from herbicide applications; scale -1-10 Scale based on growth of the non-transformed soybeans.
4. **Plant Height** = Evaluation Timing (Approximately R6) - Height from the soil surface to the tip of the highest leaf when extended by hand; scale - Height in centimeters (cm) Measure 10 plants per plot.
5. **Lodging** = Evaluation Timing (Approximately R8) - Visual estimate of lodging severityScale (0-100%; scale based on the number of plants lodged; with 0% being no lodging present.
6. **Final Population** = Evaluation Timing (Approximately R8) - The number of plants remaining in rows of each plotScale (Actual count per plot, including plants removed during previous sampling
7. **Disease Incidence** = Evaluation Timing (Approximately R6) - Visual estimate of foliar disease incidence; scale (Rate % disease incidence using 0-100%; with 0% being no disease. Record type of disease.
8. **Insect Damage** = Evaluation Timing (Approximately R6) - Visual estimate of insect damage; scale - Rate % insect damage using 0-100%; with 0% being no damage. Record type of insect.
9. **Days to 50% Floweringa** = Evaluation Timing (Approximately R1/R2) - The number of accumulated heat units from the time of planting until approximately 50% of the plants are flowering; scale -Record the date when approximately 50% of the plants in the plot are flowering.
10. **Days to Maturitya** = Evaluation Timing (Approximately R8) - The number of accumulated heat units from the time of planting until approximately 50% of the plants have reached physiological maturity; scale - Record the date when approximately 50% of the plants in the plot have reached physiological maturity.
11. **Plant Morphology** = Evaluation Timing (Approximately R8 (prior to harvest)) - Number of pods and seeds from 5 plants collected from each plot; scale - Record the number of pods and seeds present on 5 plants collected from each plot.
12. **Yield** = Evaluation Timing (Approximately R8) - Record the weight of grain harvested from each plot; scale - Record the weight of grain harvested from each plot.