



UTTALELSE OM BAYER CROPSCIENCE GENMODIFISERTE RISLINJEN LIBERTYLINK (LLRICE62) (EFSA/GMO/UK/2004/04)

Vurdert og godkjent av Faggruppe for genmodifiserte organismer

DATO: 07.04.05

SAMMENDRAG

Denne uttalelsen er utført av Faggruppen for genmodifiserte organismer under Vitenskapskomiteen for mattrygghet. Faggruppen baserer sin vurdering av Bayers genmodifiserte herbicidtolerante rislinjen LibertyLink (LLRICE62) på den dokumentasjonen som er gjort tilgjengelig på EFSA's nettside GMO EFSA-net, dokumentasjon under direktiv 2001/18/EC, European Food Safety Authority (EFSA) retningslinjer og Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) konsensusdokument for ris.

Rishybriden LLRICE62 er fremkommet ved innsetting av et genkonstrukt som inneholder genet *bar* som koder for enzymet PAT (Phosphinothricin-Acetyl-Transferase) som acetylerer og inaktiverer glufosinat. Hensikten med genmodifiseringen er å gi LLRICE62 toleranse mot sprøytemidlene Basta, Finale, Ignite, Liberty, RadicaleX og Rely.

En del av de analysene som er foretatt, viser forskjeller som er større enn ± 20 %, men variasjonene finnes også i umodifisert ris. Det synes derfor ikke å være holdepunkter for at det forskjeller mellom modifisert og umodifisert ris.

Den genmodifiserte risen synes ikke å være forskjellig fra umodifisert ris med hensyn på næringsmiddel- og fôr kvalitet.

Faggruppen vil påpeke at flere komponenter ikke er analysert, men anser imidlertid ikke at disse analysene er avgjørende for å vurdere mattrygghet for den aktuelle genmodifiserte risen.

Faggruppen finner også at dokumentasjonen av risen er tilfredsstillende.

Faggruppen mener at LLRICE62 ikke medfører endret helserisiko som mat og fôr i forhold til annen ris.

NØKKELOD

Genmodifisert ris, LLRICE62, herbicidtoleranse, PAT, helsemessig trygghet, helse.

BAKGRUNN

Faggruppe for genmodifiserte organismer under Vitenskapskomiteen for mattrygghet er blitt bedt av Mattilsynet om en vitenskapelig risikovurdering av Bayer CropSciences genmodifiserte rislinje LLRICE62 til bruk i næringsmidler og fôrvarer. Faggruppen har tidligere vurdert LLRICE62 under direktiv 2001/18/EC. Vurdering av den genmodifiserte risen er basert på den dokumentasjonen som er gjort tilgjengelig på EFSA's nettside GMO EFSA-net og under direktiv 2001/18/EC. LLRICE62 er vurdert i henhold til tiltenkt bruk og de prinsipper som er lagt til grunn i EFSA's dokument "Guidance document for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed" (EFSA 99, 2004). Ved vurdering av vesentlig likhet har Faggruppen lagt vekt på de anbefalinger over hvilke parametre som bør undersøkes i OECDs konsensusdokument for ris (OECD 2004).

I henhold til Vitenskapskomiteen for mattrygghets uttalelse på møtet i april 2004 har Faggruppen vedtatt at i de sakene hvor EFSA har kommet med sine uttalelser før Faggruppen får sakene til behandling, skal søknadene behandles på samme måte som i EU-landene, dvs. ved en noe forenklet risikovurdering. Det vil imidlertid bli tatt hensyn til særnorske forhold der slike kan påvises.

OPPDRAK FRA MATTILSYNET

Mattilsynet ber Vitenskapskomiteen for mattrygghet om å vurdere den genmodifiserte risen fra Bayer CropScience. I forbindelse med norsk prosess med gjennomføring av EUs regelverk 1829/2003/EF vedr. genmodifiserte næringsmidler og fôrvarer og ny mat forordningen 258/97/EF, har Helse- og omsorgsdepartementet bedt Mattilsynet om å vurdere genmodifiserte produkter som faller inn under disse.

Mattilsynet ber om at VKM beskriver hvilke kriterier som legges til grunn for risikovurderingene, begrunne eventuelle avvikende syn fra EUs vurderinger og at vurderingene gis på norsk og engelsk. Mattilsynet går ut fra at VKM har tilgang til aktuell dokumentasjon i sakene.

Produktet som ønskes vurdert er:

Genmodifisert ris, type Bayers ris LLRICE62, unik kode nr. ACS-OSØØ2-5, til bruk i næringsmidler og fôrvarer.

Status i EU: Godkjent under ny mat forordningens fullstendige prosedyre under artikkel 7 den 19.05.04.

Ønsket svarfrist til Mattilsynet: 07.04.05.

RISIKOVURDERING

Innledning

Den genmodifiserte rishybriden LLRICE62 ble vurdert ut fra Mattilsynets oppdrag. I henhold til Bayer CropScience er søknaden kun for import og bruk som næringsmidler, fôrvarer og industrielle produkter i henhold til artikkel 5 og 17 i forordning 1829/2003. Primærbruken av ris i Norge i dag er til næringsmidler og dyrefôr.

Faggruppe for genmodifiserte organismer har på faggruppemøtet 02.02.05 vedtatt å bruke EFSAs retningslinjer som gruppens retningslinjer for vurdering av genmodifiserte planter. Prinsippene som er lagt til grunn for vurderingen, er derfor hentet fra EFSAs dokument "Guidance document for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed" (EFSA 99, 2004).

Faggruppe for genmodifiserte organismer vurderer søknaden om markedsføring av genmodifisert ris (EFSA/GMO/UK/2004/04) til bruk i næringsmidler og fôrvarer under forordning 1829/2003.

Bakgrunnsinformasjon

Beskrivelse av de innsatte genene og integreringsområdet:

Rislinjen LibertyLink fra Bayer CropScience har ved hjelp av en partikkelaksellerator fått innsatt et rekombinant DNA-fragment (ekspresjonskasset) med genet *bar* fra den gram-positive jordbakterien *Streptomyces hygrosopicus*. Ekspresjonskassetten inneholder følgende DNA-elementer: CaMV *p35s* promoter, *bar ORF* åpen leseramme som koder for proteinet PAT, og CaMV *t35s 3'* termineringsekvens for terminering og polyadenylering. Det rekombinante DNA-fragmentet er på 1497 basepar. Det inneholder ikke markørgener for antibiotikaresistens. Celler som hadde tatt opp fragmentet ble selektert på medium med fosphinotricin (glufosinat) og utviklet videre til kallus (udifferensierte celler). Deretter regenererte man skudd og røtter og fikk grønne planter. Tidligere forskningsrapporter viser at CaMV35S-promoteren innsatt i ris særlig styrer genuttrykk i vaskulært vev, blant annet i blad, rot og blomsterorganer. Analyser av genomisk DNA fra LibertyLink med Southern- og Northern blot, ELISA og PCR viser at DNA-fragmentet i LLRICE62 er stabilt inkorporert i kromosom 6 og at *bar*-genet er aktivt i blad, stengel, rot og riskorn. Genomet til LibertyLink risen inneholder én kopi av det innsatte rekombinante DNA-fragmentet. Det rekombinante fragmentet sitter inne i kodingsområdet og inaktiverer dermed et gen som normalt er aktivt. Funksjonen til dette genet er ikke kjent, men det tilhører en multigenfamilie som har kopier på flere kromosomer. Inaktivering av genet synes derfor ikke å ha noen praktisk betydning for planten.

Et område som innbefattet flankerende områder på 149 bp oppstrøms og 670 bp nedstrøms av insersjonsstedet, ble undersøkt. En delesjon på 18 basepar er identifisert i det transgene lokus. Northern blot analyser kunne ikke påvise transkripsjon av de flankerende områdene verken av +tråd eller -tråd. Det betyr at det trolig ikke foregår transkripsjon fra promotere inne i det rekombinante segmentet som fortsetter ut i de flankerende områdene, og at det heller ikke foregår transkripsjon fra promotere i flankerende områder som fortsetter inn i det rekombinante segmentet. Det er også undersøkt for åpne leserammer, og ingen av disse rammene ble funnet å være translasjonsstart. Mulige promotermotiver og regulatoriske signalsekvenser som ble identifisert, ble ansett for ikke å være biologiske aktive.

Vel 400 bp nedstrøms for insersjonsstedet ble det påvist en kopi av tRNA-Leu-genet. Northern blot analyse viser imidlertid at tRNA-Leu-genet er aktivt i blad, stengel, rot og frø i både villtypen og LLRICE62, noe som tyder på at dette genet ikke er påvirket av insersjonen.

Genenes funksjon:

Sprøytemidler basert på glufosinat-ammonium gir en irreversibel hemming av planters eget enzym glutamin syntetase. Glutamin syntetase lager aminosyren glutamin fra glutamat og

ammoniakk. Enzymet hindrer dermed opphopning av den giftige ammoniakken som dannes ved fotorespirasjon. Sprøyting fører til at planten dør på grunn av akkumulering av ammoniakk. *Bar*-genet koder for enzymet PAT (Phosphinothricin-Acetyl-Transferase) som acetylerer og inaktiverer glufosinat, den aktive komponenten i sprøytemidler som Liberty, Basta og Finale. Den genmodifiserte rislinjen overlever sprøyting med glufosinat-ammonium siden virkestoffet acetyleres og plantens eget glutamat syntetase-enzym ikke inhiberes, men fortsatt kan utføre sin syntese av glutamat og detoksifisering av ammoniakk. Bayer CropScience anbefaler bruk av sprøytemiddel med glufosinat-ammonium på LibertyLink ris under utviklingsstadiet hvor risplantene har 2-4 blader.

Mengden av syntetisert PAT-protein i prosent av proteinmengden i ferskt vev fra de transgene plantene er i blad 0,13 %, stengel 0,19 %, røtter 0,23 % og riskorn 0,017 %, mens PAT-protein ikke kunne påvises i pollen. Som forventet lot det seg ikke gjøre å påvise PAT-protein i ikke-genmodifiserte kontrollplanter.

PAT-proteinet medfører toleranse overfor glufosinat. Mengde PAT-protein, målt med ELISA, uttrykt i korn, stilk og blad ble målt til henholdsvis $12,1 \pm 0,9 \mu\text{g/g}$, $30,9 \pm 5,13 \mu\text{g/g}$ og $99,8 \pm 11,8 \mu\text{g/g}$ ferskvekt. Mengde PAT-protein ble målt både før og etter sprøyting. LLRICE62 tåler mer enn fire ganger den mengde sprøytemiddel som benyttes ved sprøyting av ugras. Restmengde av sprøytemiddelet i herbicidtolerant LLRICE62 er i henholdt til Bayer mindre enn 1 ppm.

Dokumentasjon av "vesentlig likhet"

Hovedkomponenter i riskorn og andre plantedeler er analysert for ernæringsmessige viktige komponenter. Sammenligningene er gjort mellom LLRICE62 og foreldrelinjen, samt kommersielt tilgjengelige rissorter. Faggruppen har merket seg at flere komponenter som er listet opp i OECDs konsensusdokument for ris ikke er analysert for i korn og fôrvarer. I dokumentasjonen refereres det til flere feltforsøk som Faggruppen ikke kan finne i referanselisten. Det hevdes i dokumentet at statistisk evaluering av analysedataene er basert på krav om 95 % konfidensinterval og et 20 % bioekvivalensområde.

I Nordisk ministerråds rapport "Safety Assessment of Novel Food Plants: Chemical Analytical Approaches to the Determination of Substantial Equivalence", 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 ± 20 %. Antall prøver og analyser av hver parameter synes å være tilstrekkelige. Totalt 105 prøver ble tatt ut over to år. Totalt ble 51 parametre undersøkt.

Hovedkomponenter:

Innholdet av hovedkomponenter i LLRICE62 er blitt sammenlignet med tilsvarende komponenter i kontrollris. Protein, fett, aske, vann, karbohydrater (beregnet), ADF-fiber, NDF-, TDF- og råfiber er målt. Det er funnet statistiske forskjeller, men disse er ikke konsistente over alle forsøksfeltene. Vitaminene E, B₁, B₂, niacin, og pantotensyre er målt. Til dels store statistiske forskjeller er funnet for Vit. E og pantotensyre. Analysene viser store forskjeller i mengde Vit. E, men Bayer forklarer forskjellene med analysemetoden som ble brukt, fordi de store forskjellene også er i kontrollgruppene. For de andre parametrene var det ingen statistiske forskjeller. Mineralene K, Ca, Fe og fosfat er målt. Dokumentasjon viste

statistiske forskjeller i Fe-innholdet. Imidlertid er det også forskjeller mellom sprøytet og usprøytet genmodifisert ris, hvor opptaket av jern er lavere hos sprøytet ris.

Fettsyresammensetning i ris:

Det ble analysert for 15 fettsyrer. Fettsyresammensetningen for LLRICE62 er målt i henhold til OECDs konsensusdokument for ris. Det er funnet statistiske forskjeller, også verdier som er større enn det anbefalte bioekvivalensområdet. Disse forskjellene er ikke konsistente mellom forsøksfeltene da det er enkeltverdier innenfor prøveteiger som varierer. Forskjellene er mindre enn 20 % mellom forsøksfeltene, og verdiene ligger innenfor typiske verdier for andre rissorter som er rapportert i litteraturen.

Aminosyrer i ris:

Både essensielle og ikke-essensielle aminosyrer ble analysert. Det er funnet statistiske forskjeller i to av atten aminosyrer som er målt. For tryptofan er det funnet gjennomsnittlige forskjeller på -29,8 % til +47,0 % av kontrollgjennomsnittet over de forskjellige forsøksfeltene. Forskjellene er ikke konsistente over alle undersøkte forsøksfelt. Faggruppen mener at disse forskjellene representerer normale fluktasjoner mellom de forskjellige forsøksfeltene, og ikke er resultat av genmodifiseringen.

Anti-næringsstoffer:

I riskornprøvene ble det ikke påvist aktiviteter av trypsinhemmer og hemagglutinin. For fytinsyre ble ikke funnet statistiske forskjeller mellom forsøksfeltene.

Faggruppen vil påpeke at flere komponenter ikke er analysert (*Vitaminene A, B₆, B₁₂, folinsyre, biotin, inositol, kolin, p-aminobenzosyre, Cu, Mg, Mn, Zn, S, og silisium i genmodifisert og umodifisert foreldreplante (OECD 2002)*), men anser imidlertid ikke at slike analyser er avgjørende for å vurdere mattrygghet for den aktuelle genmodifiserte risplanten.

Dokumentasjon av toksisitet og allergenisitet

Allergener:

Allergener er analysert i henhold til EFSA's retningslinjer og FAO/WHO's anbefalte prosedyrer (FAO/WHO 2001). Sammenligning av et proteins aminosyresekvens med aminosyresekvensen til et kjent allergent protein regnes som en nyttig indikator på allergent potensiale. Aminosyresekvensen til de fleste viktige allergener, deriblant matallergener, er kjent. De viktige IgE-bindingsepitopene, dvs. aminosyresekvenser på 5-7 aminosyrer der IgE binder seg, er kartlagt for mange allergener.

PAT-proteinet

Generelt er proteiner som er matallergener varme- og syrestabile, selv om det er en del unntak. De er stabile både overfor mage- og tarmsafer, samt at de ofte er hovedproteinkomponenter i matvaren. Typiske mengder er fra 1 til 80 % av proteininnholdet.

Mengden av PAT-proteinet i riskornet er ca. 0,02 % av totalt protein. Det er testet i simulert mage- og tarmsaft, og proteinet brytes ned i løpet av kort tid, ca. 15 sekunder. Det antas derfor at proteinet også brytes raskt ned i menneskets mage- og tarmkanal.

Det er utført søk for aminosyresekvenshomologi for PAT-proteinet til aminosyresekvenser i databaser som inneholder aminosyresekvenser til kjente allergener og toksiner. Det er ikke funnet homologi til slike proteiner.

Basert på de testene som er omtalt, dvs. at det i proteinet ikke er påvist aminosyresekvenser som er lik allergene proteiners epitoper, at proteinet brytes raskt ned av mage-tarmsafter, og at mengde av totalt proteininnhold er ca. 0,02 %, anser vi det som lite trolig at PAT-proteinet medfører et signifikant større potensiale for utvikling av større matallergi hos mennesker enn hva som er tilfelle for umodifisert ris.

Risallergener:

Størrelsen på risallergener som tilhører albumin-globulinfraksjon er mellom 14 og 15 kD, og det allergene protein som hører til a-amylase- og trypsinhemmer-genfamilene, er på 16kD. Sera fra personer som reagerer allergisk mot 16 kD-proteinet ble benyttet i radioallergensorbent (RAST)- og RAST inhiberingstest. Det ble ikke funnet forskjeller i uttrykket av dette proteinet mellom LLRICE62 og kontroll ris. Uttrykket av proteinene i 14-15 kD området ble målt med ELISA. Det ble ikke påvist signifikante forskjeller mellom LLRICE62 og kontroll. Målinger av proteinene i Osborn fraksjonen (albumin, globulin, prolamin og glutelin) er utført. Det ble ikke funnet statistiske forskjeller i mengden av proteinene i prolamin-fraksjonen mellom LLRICE62 og kontroll. Prolaminfraksjonen inneholder proteiner som medfører cøliaki.

Toksisitet:

Kritiske toksiner:

Det er ikke funnet store forskjeller mellom modifisert og umodifisert plante i mengde oryzanol. Oryzanol finnes i oljefraksjonen i planten.

Føringsstudier:

To føringsstudier er utført. En studie på 42 dager på hanekyllinger og en på 96 dager på gris.

Kylling:

Føring av 120 kyllinger i 42 dager, dvs. fra 50 gram til slaktevekt 2 kg. Kyllingene ble delt i to grupper som ble føret med henholdsvis 30 % LLRICE62 og kontrollris. Hver gruppe ble oppdelt i tre undergrupper à 20 dyr. Det ble ikke påvist kliniske eller makroskopiske abnormaliteter. Det ble ikke funnet statistiske forskjeller i førinntak, føromdannelse-effektivitet, vektøkning og slaktekvalitet.

Gris:

Gris, startvekt på 20 kg, ble delt i 4 grupper à 24 griser (12 hann, 12 hunn). To grupper kontrollris (foreldrerisen + kommersiell rissort) og to grupper modifisert ris (sprøytet og usprøytet) ble føret til gris i mengder på 75-82 % av totalt førinntak. Forsøket varte i 14 uker. Det ble ikke funnet forskjeller, med unntak av noe (ca. 10 %) økning i varm kroppsvekt for dyr føret med sprøytet ris, i vektøkning, førinntak, føromdanningseffektivitet og skrottevekt.

Dyrene ble etter avlaving undersøkt av veterinær for makroskopiske patologiske endringer. Det ble ikke funnet noen signifikante forskjeller mellom kontrollgruppene og prøvegruppene.

Toksisitetsstudier:

Gnagere:

Det er utført en akutt toksisitetsstudie på mus med PAT protein fremstilt fra genmodifisert *E. coli*. Renheten av proteinet er >95 %. Akuttoksisisk forsøk ved intravenøs injeksjon med henholdsvis 1 og 10 mg aprotinin/kg (negativ kontroll), melittin (positiv kontroll) og PAT vist etter 15 dager ingen tegn på toksisk påvirkning, ved grov patologisk undersøkelse, av aprotinin og PAT. Den positive kontrollen ga 100 % mortalitet ved 10 mg/kg og null mortalitet ved 1 mg/kg. De kliniske og makroskopiske undersøkelsene viste ingen synlige tegn på akutt toksisitet hos musene som fikk PAT og aprotinin. Faggruppen finner denne studien tilfredsstillende. Faggruppen har også vurdert en rekke andre studier utført på gnagere med PAT-protein fra andre søknader. Generelt, med unntak for allergene proteiner, er proteiner ikke akuttoksiske.

KONKLUSJON:

På bakgrunn av ovenstående gjennomgang av medfølgende og tidligere innsendt dokumentasjon finner vi det lite sannsynlig at eksponering for PAT proteinet i seg selv og i de mengder som tilføres via genmodifisert ris, er helsemessig betenkelig. Hoveddelen av dokumentasjonen er i henhold til Retningslinjene. Lengden på fôringsforsøket på gris er som anbefalt av FAO/WHO for å detektere helsemessige forskjeller som eventuelt modifisert organisme vil kunne gi. Fôringsforsøkene på broilere og gris viser at henholdsvis 42 og 90 dagers fôring gir ingen store forskjeller mellom kontroll- og modifisert ris.

En del av de analysene som er foretatt viser forskjeller som er større enn ± 20 %, men variasjonen finnes også i umodifisert ris. Det synes derfor ikke å være holdepunkter for at det er forskjeller mellom modifisert og umodifisert ris. Den genmodifiserte risen synes ikke å være forskjellig fra umodifisert ris med hensyn på fôringskvalitet.

Faggruppen vil påpeke at flere komponenter ikke er analysert, men anser imidlertid ikke at disse analysene er avgjørende for å vurdere mattrygghet for den aktuelle genmodifiserte risplanten. Faggruppen mener at LLRICE62 ikke medfører endret helserisiko som mat og fôrvare i forhold til annen ris.

VURDERT AV

Faggruppe for genmodifiserte organismer:

Ingolf Nes, Knut Berdal, Grethe Foss, Casper Linnestad, Martinus Løvik, Audun Nerland.

Koordinator fra sekretariatet: Arne Mikalsen

REFERANSER

EFSA (2004). "Guidance document for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed". The EFSA Journal 99, pp.1-94.

FAO/WHO (2001). Evaluation of allergenicity of genetically modified foods.

OECD (2004), "Consensus Document on Compositional Considerations for New Varieties of Rice (*Oryza sativa*): Key Food and Feed Nutrients and Anti-nutrients. Series on the Safety of Novel Foods and Feeds, No.10.