



UTTALELSE VEDRØRENDE KWS SAAT AG OG MONSANTOS GENMODIFISERTE SUKKERROE H7-1 RR (EFSA/GMO/UK/2004/08)

Vurdert og godkjent av Faggruppe for genmodifiserte organismer

Dato:24.08.05

SAMMENDRAG

Denne uttalelsen er utarbeidet av Faggruppen for genmodifiserte organismer under Vitenskapskomiteen for mattrygghet. Faggruppen baserer sin uttalelse av genmodifiserte herbicidtolerante H7-1 RR (EFSA/GMO/UK/2004/08) sukkerroe på KWS SAAT AG/Monsantos dokumentasjon og EFSA's retningslinjer. Mattilsynet ber Vitenskapskomiteen for mattrygghet om å vurdere den genmodifiserte herbicidtolerante H7-1 RR sukkerroe til bruk i næringsmidler og fôrvarer.

Hovedformålet med dyrking av sukkerroe er produksjon av sukker. Produksjon av sukker medfører en rekke biprodukter som er verdifulle fôrvarer.

Faggruppen finner dokumentasjon vedrørende genmodifisering, molekylærbiologisk karakterisering og analyser av genproduktet fra det rekombinante DNA-fragmentet tilfredsstillende. For dokumentasjon av vesentlig likhet, toksisitet og allergenisitet finner faggruppen at dokumentasjon er tilfredsstillende.

Faggruppen konkluderer med at det er blitt utført tilstrekkelige analyser av viktige komponenter til å fastslå at den genmodifiserte sukkerroeen er vesentlig lik foreldrelinjen. Faggruppen mener at H7-1 RR sukkerroe ikke medfører endret helserisiko til bruk som fôrvarer i forhold til annen sukkerroe. Faggruppen konkluderer med at sukker som er produsert fra H7-1 RR er vesentlig lik sukker produsert fra foreldrelinjen.

NØKKEWORD

Genmodifisert sukkerroe, H7-1 RR sukkerroe, herbicidtoleranse, CP4-EPSPS, helsemessig trygghet, helse.

BAKGRUNN

Faggruppen for genmodifiserte organismer under Vitenskapskomiteen for mattrygghet er blitt bedt av Mattilsynet om en vitenskapelig risikovurdering av KWS SAAT AG/Monsanto

genmodifisert sukkerroe H7-1 RR (EFSA/GMO/UK/2004/08) til bruk i næringsmidler. Vurderingen av den genmodifiserte sukkerroeen er basert på den dokumentasjonen som er gjort tilgjengelig av KWS SAAT AG/Monsanto.

I henhold til Vitenskapskomiteen for mattrygghets uttalelse på møtet 23. april 2004 har Faggruppen for GMO vedtatt at i de sakene hvor EFSA har kommet med sine uttalelser før Faggruppen for GMO 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 sukkerroeen H7-1 RR fra KWS SAAT AG/Monsanto. I forbindelse med norsk prosess med gjennomføring av EUs regelverk 1829/2003/EF vdr. 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.

VKM bes om å beskrive 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 sukkerroe, EFSA/GMO/UK/2004/08 (KWS SAAT AG/Monsantos H7-1 RR sukkerroe), unik kode nr. KM-ØØØ71-4.

Status i EU: Søknad under 1829/2003/EF. EFSA's frist for innspill er 20.8.05.

RISIKOVURDERING

Innledning

Denne uttalelsen er utført av Faggruppen for genmodifiserte organismer under Vitenskapskomiteen for mattrygghet.

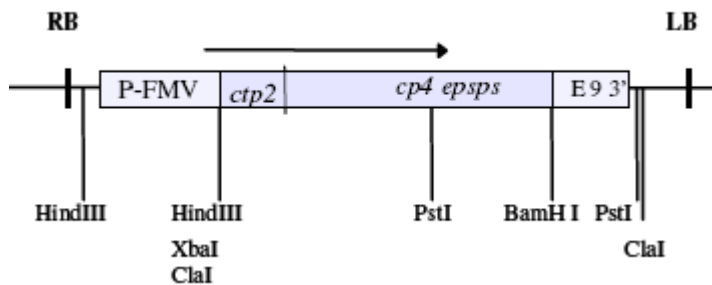
I henhold til dokumentasjonen er formålet med KWS SAAT AG/Monsantos genmodifiserte herbicidtolerante sukkerroelinje H7-1 RR å bruke sukker fra sukkerroen i næringsmidler, og biprodukter fra sukkerproduksjon som fôrvarer. Biprodukter fra sukkerproduksjonen som benyttes til fôr er pressmasse (pulp) og melasse. I enkelte europeiske land lages det sirup av sukkerroesaft for humant konsum.

Uttalelsen omfatter transformeringsprosessen, bruk av vektor, det rekombinante DNA-fragmentet, komparativ analyse av ernæringsmessig kvalitet, mineraler, kritiske toksiner, antinæringsstoffer, allergener, og det nye proteinet.

Genmodifisering

Den genmodifiserte sukkerroelinjen H7-1 RR uttrykker glyfosattoleranse pga. et bakterie 5-enolpyruvylshikimat-3-fosfat syntetase enzym som uttrykkes av *cp4-epsps*-genet. Enzymet omdanner fosfoenolpyruvat og shikimat-3-fosfat til 5-enolpyruvylshikimat-3-fosfat, som er en viktig metabolitt i syntesen av aromatiske aminosyrer. Alle planter og mikroorganismer inneholder dette enzymet, noe som dyr ikke gjør. De må dermed få aromatiske aminosyrer fra føden. *Cp4-epsps*-genet fra bakterien *Agrobacterium* stamme CP4 ble klonet inn i plasmidet PV-BVGT08. Et rekombinant DNA-fragment på 3705 basepar fra PV-BVGT08 plasmidet er satt inn i plantens genom. Fragmentet inneholder en ekspresjonskassett. Kassetten inneholder en 35S-promoter (P-FMV), et optimalisert kloroplast overføringspeptid (CTP2), E9 3'-*rbcS* fra sukkererter og en polyadenylsekvens i 3'-enden. DNA-fragmentet ble overført til embryosukkerroeceller fra linjen 3S0057 ved *Agrobacterium*-mediert overføring ved den binære vektoren PV-BVGT08. DNA-fragmentet inneholder ikke antibiotikaresistensgen. Transformanter ble selektert ved at de overlevde og vokste i nærvær av glyfosat. Southern blot og PCR har blitt brukt for å karakterisere det rekombinante DNA-fragmentet i planten. Molekylærbiologisk karakterisering viser at det er satt inn ett rekombinant DNA-fragment i H7-1 RR sukkerroe. Dette fragmentet inneholder:

- en CP4-EPSPS kassett
- CP4-EPSPS kassetten består av *cp4 epsps* gen med en mismatch som medfører endring i en base. Denne endringen fører ikke til endring i aminosyresekvensen. Tre mismatch i ikke-kodende sekvenser er påvist.
- 290 baser ekstra er satt inn inne i 5'-enden av fragmentet, samt 40 baser inne i 3' enden. Disse ekstra basene stammer fra sukkerroens genom og sitter mellom kloningsvektorens sekvenser og ekspresjonskassetten for *cp4 epsps*.



Figur: Genelementer som ble satt inn i sukkerroens genom.

Molekylærbiologiske analyser viser at det rekombinante fragmentet i planten inneholder de samme gener og genelementer som er på det tilsvarende fragmentet i bakterien. Genene på det rekombinante DNA-fragmentet i H7-1 RR sukkerroe uttrykker EPSPS-protein som er identisk med proteinet som uttrykkes i bakterien. Det er ikke påvist post-translatert glykosylering av CP4 EPSPS protein. Proteinene er isolert fra sukeroeblad.

Flankerende sekvenser til det rekombinante DNA-fragmentet i planten er analysert, ca. 300 bp oppstrøms og ca. 250 bp nedstrøms. Det er funnet henholdsvis seks åpne leserammer oppstrøms og tre nedstrøms. Teoretiske analyser av mulige polypeptider fra hver leseramme v.h.a. allergen-, toksin- og peptid databaser viser ingen biologisk relevante strukturelle likheter til allergener, toksiner og farmakologiske aktive proteiner. Resultatene fra disse teoretiske analysene viser at det er lite sannsynlig at det (dersom noen av disse leserammene skulle bli transkribert) vil resultere i polypeptider som medfører potensielle toksiske, allergene eller har

uheldige helsemessige konsekvenser. Immunoblot-, MALDI-TOF- og SDS-PAGE-undersøkelse av planteproduert CP4 EPSPS protein støtter disse teoretiske antakelsene da det ikke er påvist fusjonsproteiner samt at det planteproduerte CP4 EPSPS proteinet er lik *E. coli*-produert protein.

Faggruppen mener at karakteriseringen av det rekombinante innskuddet og analysene av planteproduert CP4 EPSPS protein fra H7-1 RR er tilfredsstillende.

Analyse av enzymatisk aktivitet viser ingen forskjell mellom plante- og bakterieproduert protein. Fordøyelighetstest viste også at proteinet fordøyes raskt i simulert mage- og tarmsaft.

Faggruppen har vurdert de fysiske, kjemiske og funksjonelle karakteriseringene av proteinet til å være tilstrekkelige.

Sukkerroen er testet over totalt 11 feltforsøk i tre europeiske land i 1998 og 9 feltforsøk i seks europeiske land i 1999. Det er ikke påvist noen agronomiske forskjeller mellom H7-1 RR, foreldrelinjen og åtte forskjellige kommersielle sorter.

Krysning over fire generasjoner i syv europeiske land viser at det rekombinante EPSPS-fragmentet er stabilt inkorporert i sukkerroegenomet.

Toleranse for glyfosat (Roundup)

CP4-EPSPS proteinet er tolerant overfor glyfosat. Mengde CP4-EPSPS-protein i blad og sukkerroe, målt med ELISA, er henholdsvis 161 (range: 102-307) og 181 (range: 116-233) µg/g ferskvekt.

Dokumentasjon av ”vesentlig likhet”

Hovedkomponenter i sukkerroe og blad er analysert for ernæringsmessig viktige komponenter. Sammenligningene er gjort mellom H7-1 RR, både usprøytet og sprøytet, og foreldrelinjen, samt åtte kommersielt tilgjengelige sukkerroesorter. Det er analysert for 25 forskjellige forbindelser. Med unntak av fosfat er analysene av komponenter i henhold til OECDs konsensusdokument for sukkerroe (OECD 2002). Det er også analysert for flere aminosyrer og sekundære metabolitter, dvs. saponiner, ferulsyre, p-coumarinsyre, oksalsyre og malinsyre, enn det som er anbefalt i OECD-dokumentet.

Hovedkomponenter:

Dokumentasjonen til notifikasjonen inneholder omfattende analyser av sukkerroe og blad.

Det er foretatt en rekke analyser av kontroll- og genmodifisert sukkerroe av komponentene aminosyrer, fiber, karbohydrater, tørrstoff, aske, total fett, protein, sukker, invertsukker, kalium, natrium, α -amin nitrogen, saponiner, ferulsyre, p-coumarinsyre, oksalsyre og malonsyre. Analysene er presentert som gjennomsnittsverdier i flere tabeller. Det er sammenligninger mellom H7-1 RR, foreldrelinjen og kommersielle sorter innenfor hver lokalitet, og mellom lokalitetene. For komponentene fiber, tørrstoff, protein, aske, fett, sukker, invertsukker, kalium, natrium og α -amin nitrogen er det funnet statistiske forskjeller for tørrstoff i blad for vekstsesongen 1999, invertsukker og α -amin nitrogen for vekstsesongen 1998. Forskjellene ligger imidlertid innenfor de respektive variasjonsområdene for sesongen 1998 og 1999. For de statistiske forskjellene som er funnet, ligger også verdiene innenfor det

naturlige variasjonsområdet på 20 % som foreslått i rapporten til TemaNord i 1998 (TemaNord 1998).

Aminosyrer i sukkerroe og blad:

Både essensielle og ikke-essensielle aminosyrer ble analysert. Det er funnet statistiske forskjeller i blad for sesongene 1998 og 1999 for fire av atten aminosyrer. I sukkerroe er det funnet statistiske forskjeller i fire aminosyrer for vekstsesongen 1998 og to aminosyrer for vekstsesongen 1999. Forskjellene som er påvist er ca. 4-14 %. Forskjellene ligger innenfor de respektive variasjonsområdene og var heller ikke konsistente over alle undersøkte lokaliteter. Faggruppen mener at disse forskjellene representerer normale fluktuasjoner mellom de forskjellige lokalitetene.

Sekundære metabolitter og anti-næringsstoffer:

Det er dokumentasjon for de sekundære plantemetabolittene ferulsyre, p-coumarinsyre, oksalsyre og malonsyre, samt anti-næringsstoffene saponiner. Mengdene av p-coumarinsyre og malonsyre var mindre enn påvisningsgrensene for metodene. Det er ikke funnet statistiske forskjeller for ferulsyre, men for oksalsyrer er det funnet forskjell mellom modifiserte og umodifiserte sukkerroer i ett av fem forsøksfelt. Det er ikke funnet statistiske forskjeller for saponiner.

Dokumentasjon av toksisitet og allergenisitet

Toksisitet

Fôringstudier

Fôring av 42 værer (2-7 år gamle) i 21 dager med seks forskjellige sukkerroesorter (7 dyr i hver gruppe) der iblant H7-1 RR- og fem umodifisert kontrollsukkerroe er utført. Værene ble fôret med henholdsvis 650 g sukkerroe og 350 g standard høy per dag, samt urea og natriumsulfat. Ett dyr ble fjernet fra forsøket fordi det sluttet å spise. Et annet led av kobberforgiftning og ble avlivet. Fôringforsøket viste ingen forskjeller i fordøyelighet mellom genmodifisert og umodifisert sukkerroe.

KWS SAAT AG/Monsanto henviser til studie på mus med CP4-EPSPS protein fremstilt fra genmodifisert *E. coli* (Naylor, 1993). Renheten av proteinet er >90 %. Fôring med 363 mg BSA/kg (kontroll) og 40, 100 og 400 mg CP4-EPSPS-protein/kg kroppsvekt på mus (totalt 50 hann og 50 hunn) viste ingen tegn på toksisk påvirkning, ved grov patologisk undersøkelse, etter 8-9 dager. Fôringforsøket er utført i henhold til EPAs retningslinjer (40 CFR Part 160). Vev som er tatt ut til undersøkelse er: aorta, binyrer, eggstokker, hjerne, kolon, galleblære, hjerte, nyrer, lunge, lever, livmor, lymfeknuter, mage, milt, muskler, pankreas, prostata, rektum, ryggmarg, spyttkjertel, sædblære, spiserør, testikler, tymus, urinblære og øye. Hule organer ble åpnet og undersøkt. Faggruppen finner denne studien tilfredsstillende. Faggruppen har også vurdert en rekke tilsvarende studier utført med CP4-EPSPS-protein fra andre søknader. Generelt, med unntak for allergene proteiner, er proteiner ikke akuttoksiske.

Det ble utført et 13 ukers fôringsforsøk med hann- og hunnrotter, 7 grupper à 20 rotter/kjønn. Fôringsforsøket er utført i henhold til OECD retningslinje nr 408, Repeated dose 90-day oral toxicity study in rodents. Fôret bestod henholdsvis av 2 % og 5 % sukkerroepulp fra H7-1 RR-planter og 5 % pulp fra foreldrelinje, samt 5 % pulp fra fire forskjellige referanse-sukkerroesorter. Det er utført analyser av en rekke organer, bl.a. mikroskopiske undersøkelser av vev fra organene. Det ble ikke påvist noen testrelaterte endringer i de fleste undersøkte parametrene. For testgruppene 2 og 3, hannrotter som ble fôret med henholdsvis 2 % og 5 % genmodifisert sukkeeroepulp, er det funnet signifikante forskjeller i hematologiske parametre samt vekt av milt i forhold til testgruppe 1, hannrotter som ble fôret med 5 % pulp fra foreldrelinjen. Det er imidlertid ikke funnet statistiske forskjeller i forhold til de fire forskjellige referanse-sukkerroesortene. Faggruppen konkluderer med at det ingen grunn til å anta at fôr kvaliteten til genmodifiserte sukkerropulp er forskjellig fra umodifisert sukkerroepulp.

Allergenitet

Sammenligning av et proteins aminosyresekvens med aminosyresekvensen til et kjent allergent protein er en nyttig indikator på allergent potensiale. Aminosyresekvensen til mange viktige allergener, deriblant matallergener, er kjent. De viktige IgE-bindingsepitopene, dvs. aminosyresekvensene der IgE binder seg, er kartlagt for mange allergener. Konservering av epitopesequenser er påvist mellom homologe allergener i forskjellige arter. Sekvenser på CP4-EPSPS-proteinet ble sammenlignet med 567 aminosyresekvenser som er assosiert med allergi og cøliaki. Ingen biologisk signifikant homologi eller sekvenslikheter ble påvist for CP4-EPSPS.

Allergene proteiner er ofte varme- og syrestabile. De er stabile både overfor mage- og tarmsafter, samt at de ofte er hovedprotein komponenter i matvaren. Typiske mengder er fra 1-80 % av proteininnholdet. Mengden av CP4-EPSPS proteinet i kornet er ca. 0,01 % av totalt protein. Det er testet i simulert mage- og tarmsaft, og proteinet brytes ned i løpet av ca. 15 sekunder. Det antas derfor at proteinet også brytes raskt ned i menneskets mage og tarmkanal. Det er heller ikke blitt påvist at EPSPS-proteiner i forskjellige matplanter og -mikroorganismer som er nevnt ovenfor, er allergener.

Basert på de testene som er omtalt, dvs. at proteinet ikke har aminosyresekvenser som er lik allergene proteiners epitoper, proteinet brytes raskt ned av mage-tarmsafter, mengde av totalt proteininnhold er ca. 0,01 %, og at EPSPS proteinet sannsynligvis bestandig har vært en del av menneskets kost, anser vi det som lite trolig at CP4-EPSPS utgjør et signifikant potensiale for utvikling av større matallergi hos mennesker enn for umodifisert sukkerroe.

Aminosyresekvensene til CP4 EPSPS og CP4 EPSPS L214P er sammenlignet med 4677 proteinsekvenser til toksiske proteiner. Aminosyresekvensene til CP4 EPSPS er også sammenlignet med aminosyresekvenser til proteiner, inklusivt farmakologiske aktive proteiner, som finnes i alle tilgjengelige databaser. Det ble bare funnet likheter med homologe EPSPS proteiner. Da CP4-EPSPS proteinet ikke har aminosyresekvenser som kjennetegner et toksisk potensiale i toksiske proteiner, tyder dette på at CP4-EPSPS-proteinet heller ikke har et slikt toksisk potensiale. Dette tyder også på at CP4-EPSPS-proteinet ikke utgjør noen helserisiko. Faggruppen konkluderer med at CP4-EPSPS- og CP4 EPSPS L214P-proteinene sannsynligvis ikke er mer allergene eller toksiske enn villtype EPSPS proteiner, fordi plante-, bakegjær- og bakterie-EPSPS proteiner har vært en del av menneskets kost i lang tid og som sådan er proteinet ikke ansett for å utgjøre en helserisiko.

KONKLUSJON

Faggruppen konkluderer med at det er blitt utført tilstrekkelige analyser av ernæringsrelaterte komponenter for fastsetting av "substantial equivalence".

På bakgrunn av ovenstående gjennomgang av medfølgende dokumentasjon finner vi det lite sannsynlig at eksponering for CP4-EPSPS proteinet i seg selv og i de mengder som tilføres i fôr via biprodukter fra genmodifisert sukkerroe er helsemessig betenkelig for dyr.

Faggruppen mener at sukker fra H7-1 RR sukkerroe ikke er vesentlig endret i forhold til sukker fra umodifiserte sukkerroer og derfor medfører ikke endret helserisiko som tilsetningsstoff til mat. Faggruppen mener at biprodukter fra sukkerproduksjonen brukt som fôr eller i fôrvarer ikke medfører endret helserisiko i forhold til annen sukkerroe.

VURDERT AV

Faggruppe for genmodifiserte organismer:

Ingolf Nes, Knut Berdal, Grethe Foss, Sonja Klemsdal, 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.

Naylor, M. W. (1993) Acute oral toxicity study of CP4 EPSPS protein in albino mice. Monsanto Rapport no. MSL-13077.

OECD (2002), "Consensus Document on Compositional Considerations for New Varieties of Sugar Beet: Key Food and Feed Nutrients and Anti-nutrients. Series on the Safety of Novel Foods and Feeds, No. 3.

TemaNord 1998. Safety Assessment of Novel Food Plants. Chemical Analytical Approaches to the Establishment of Substantial Equivalence. TemaNord 1998: 591. København. Nordisk ministerråd.