



Vitenskapskomiteen for mattrygghet,
Postboks 4404 Nydalen,
0403 Oslo

04/302-4

Nasjonalt folkehelseinstitutt	
AVD.SEK.: VISE	S.BEH.: TOFO
31 MARS 2004	
S.NR.: 04/361-2	
ARKIVKODE: 537	AVSKREVET:

Deres ref: 04/439/vkm/tofo

Vår ref: MINT/ARMI/537/

04/361-

Dato: 30. mars 2004

VKM Report 2004: 03

Vurdering av genmodifisert herbicidtolerant raps (C/BE/96/01) i EU/EØS-området under Direktiv 2001/18/EF.

Vi viser til brev fra Vitenskapskomiteen for mattrygghet datert 24/3-04 og brev fra Direktoratet for naturforvaltning datert 03.03.2004, ref. 04/2301 ARTS-AM-KW, vedrørende vurdering av genmodifisert raps til bruk som fôrvare.

Siden det ikke finnes norske retningslinjer for vurdering av genmodifiserte organismer til bruk som fôrvare, vil den genmodifiserte risen bli vurdert ut fra Retningslinjer for helse- risikovurdering av ny mat, revisjon 2002 (dokumentet er ikke ferdigstilt)

Den genmodifiserte rapslinjene Ms8 og Rf3 samt hybridene Ms8xRf3 fra Bayer CropScience Ltd ble vurdert av Folkehelseinstituttet i mars 1997, se kopi. Den tilsendte dokumentasjonen i 2004 inneholder ingen ny informasjon vedrørende fôr- og mattrygghet. Folkehelseinstituttets trygghetsvurdering og konklusjon fra 1997 vil derfor kunne opprettholdes.

Ny dokumentasjon.

Den nye dokumentasjonen som vi har vurdert omhandler PAT-proteinet og karakterisering av geninnsettingen.

Karakterisering av geninnsettingen.

Ms8 transgen plante inneholder ett T-DNA kopi i ett lokus. Sekvensering av flankerende sekvenser, 5' 864 bp og 3' 357 bp, viser at disse er av planteopprinnelse og finnes i alle rapsplantene. Storparten av disse flankerende sekvensene finnes ikke i offentlige databaser og er derfor ikke karakterisert. Det er ikke funnet andre plasmidsekvenser enn de som skal settes inn fra plasmiden. Rf3 transgen plante inneholder ett T-DNA kopi arrangert i en invertert struktur i lag med et annet ufullstendig T-DNA kopi. Sekvensering av flankerende sekvenser, 5' 807 bp og 3' 459 bp, viser at disse er av planteopprinnelse og finnes i alle rapsplantene. Denne transgene strukturen sitter som ett lokus. Storparten av disse flankerende sekvensene finnes ikke i offentlige databaser og er derfor ikke karakterisert. Det er ikke funnet andre plasmidsekvenser enn de som skal settes inn fra plasmiden. Det er ikke karakterisert på hvilke kromosom T-DNAet sitter på i de enkelte plantene. Det er også undersøkt for åpne leserammer, og ingen av disse rammene ble funnet å være translasjonsstart. Ekspresjonen av *barstar*-, *barnase*- og *bar*-genene ble målt ved Northern blot. Northern blot analysene viser at ikke er ekspresjonen av *barstar*- og *barnase* genet i henholdsvis Rf3 og Ms8 frø, samt at ekspresjon av *bar*-genet ikke kunne påvises i

pollen fra Rf3. Ekspresjonen av *bar*-genet ble også målt med PAT-spesifikk ELISA analyse. PAT-proteinet ble påvist i frø hos Ms8, Rf3 og hybridene Ms8xRf3 i mengder mindre enn 0,001% av totalt ekstraherbart protein.

Konklusjon

På bakgrunn av ovenstående gjennomgang av medfølgende og tidligere innsendt dokumentasjon finner vi det lite sannsynlig at eksponering for barstar, barnase og PAT proteinet i seg selv og i de mengder som tilføres via genmodifisert raps er helsemessig betenkelig.

Dokumentasjonen fra 1997 av fôrkake og mel fra fôrkake er mangelfull for vurdering av modifisert raps brukt som fôr. Analyse av rapsoljen fra genmodifisert plante viser at det ikke er vesentlige forskjeller mellom olje fra modifisert og umodifisert plante.

Vi finner dokumentasjonen mangelfull med hensyn på bruk som fôr.

Vennlig hilsen

Jan Alexander
Avdelingsdirektør

Jan Alexander

Arne Mikalsen
Arne Mikalsen
Seniorforsker



FOLKEHELSE

Statens institutt for folkehelse

National Institute of Public Health

Statens næringsmiddeltilsyn

Ullevålsveien 76,
Adamstua,
Oslo

KOPI

Direktøren

Director General

Deres ref. / Your ref.: 97/289 HGN/jpb

Vår ref. / Our ref.:

97/00491-3

JAL/AMI/607.1

Saksbeh. / Inquiries to: Arne Mikalsen

Dato / Date:

12. mars 1997

NOTIFISERING FRA EU UNDER DIREKTIV 90/220/EØF PART C (COVER NOTE C97-01) VEDRØRENDE MARKEDSFØRING AV GENMODIFISERT OLJERAPS (C/BE/96/01)

Vi viser til Deres brev vedrørende notifikasjon fra EU under direktiv 90/220/EØF part C (cover note C97-01) vedrørende markedsføring av genmodifisert oljeraps (*Brassica napus* L. oleifera Metzg. MS8/RF3) fra firmaet Plant Genetic Systems N.V. (PGS).

Folkehelse har tidligere vurdert to notifikasjoner fra PGS C/F/95/05-01/A&B. Disse to søknadene inneholdt materiale til dokumentasjon av henholdsvis hannsterilitet (MS1) (C/F/95/05-01/A) og restaurering av fertilitet (RF2) (C/F/95/05-01/B). Begge plantene, MS1 og RF2, uttrykker glufosinat- og kanamycinresistens.

Søknaden C/BE/96/01 skiller seg fra de to foregående ved at plantene kun er gjort tolerant mot herbicidet glufosinat, og ikke har innsatte gener for kanamycinresistens. Søknaden C/BE/96/01 inneholder materiale til dokumentasjon av næringsmiddels (olje) og dyreførs sikkerhet som føde.

Det er i SNTs henvendelse bedt om en vurdering av den helsemessige sikkerhet ved produktene. Folkehelse har ikke kompetanse til å vurdere mulig risiko for natur og økologisk miljø, bl.a. mulighet for overføring av resistens til andre planter og spredning av resistent plante i naturen. Søknaden vedrørende notifikasjon C/BE/96/01 vil derfor bli vurdert i henhold til disse punktene relatert til helse.

1. Risiko for allergi
2. Innhold av toksiner
3. Mulige helseskadelige effekter
4. Miljømessige forhold av helsemessig betydning.

Bakgrunn

Hensikten med genmodifiseringen

Formål med genspleising er:

- 1) å fremstille rapsfrø ved hjelp av glufosinat resistens fra hannsteril plante (MS8),

Postadresse / Postal Address :
Postboks 4404 Torshov
N-0403 Oslo, Norway

Besøksadresse / Office Address :
Geitmyrsveien 75
Oslo

Telefon / Telephone : + 47 22 04 22 00
Telefaks / Telefax : + 47 22 35 36 05

fertilitetsrestaurere plante (RF3) og hybridlinjen MS8xRF3. Kryssing av de genmodifiserte plantene MS8 og RF3 forventes å gi et høyere utbytte av rapsfrø ved dyrking enn ved vanlige rapsfrøproduksjon.

- 2) å gi plantene resistens mot glufosinat slik at når glufosinat blir godkjent for bruk på oljeraps kan det brukes til ugrasbekjempelse i åkeren uten å skade den transgene planten.

For å danne hybridfrø må dette skje ved kryssing mellom en hannsteril (MS8) plante (som ikke danner pollen, og dermed ikke kan selvbestøves, dvs. den er en "hunnplante") og med pollen fra en annen plante (RF3, som er en "hannplante"). For å kunne produsere frø er det nødvendig at hannsteriliteten er opphevet i hybridplanten slik at frøene utvikler seg normalt. Derfor bygger systemet, som anført i søknaden, på at det dannes hybridfrø fra to forskjellige genspleisede rapsplanter, en som er hannsterilitet og en som produserer pollen og som gjensker ved å overføre et gen (barstar) hannfertiliteten i hybridfrø fra den hannsterile planten. Hybride planter viser "hybrid kraft", dvs. økt størrelse, veksthastighet og frøutbytte. Det selekterbare genet, dvs. det nye genet som er satt inn i plantene som gir herbicidresistens, er til stede både i den hannsterile og hunnfertile plantelinjene, og alle tre genene er til stede i planter som vokser fra hybridfrø (se nedenfor om de enkelte genene).

Det er altså tale om to forskjellige konstruksjoner eller genkombinasjoner, som er anvendt til transformasjon (genspleising) av rapssorten Drakkar. Ved å velge mellom alle de transformerte plantene som nødvendigvis har måttet oppstå ved innsetting av disse genene, har en funnet to genmodifiserte rapsplanter med hver sin konstruksjon som er betegnet MS8 (DBN230-0028) (hannsterilitet) og RF3 (DBN212-0005) (gjenoppretter fertilitet), og som er funnet egnet til videre foredling. Avkom fra disse plantene, enten de er oppstått ved selvbestøving eller kryssing med andre planter, og som inneholder de innsatte genene, betegnes som en bestemt positype. Søknaden og vurderingen dekker disse to posityper og deres respektive avkom, samt hybridene (MS8xRF3)..

Hybride rapsfrø er tenkt brukt til pressing (olje og presskake), dyrefôr, industriell bruk og som såkorn.

Beskrivelse av de ulike genproduktene som er innsatt.

Transformasjonssystem/konstruksjon

Til transformasjon er brukt et såkalt "disarmed" Ti-plasmid fra *Agrobacterium*. Plasmid DNA tas opp i protoplasten og etter opptak inkorporeres plasmid DNAet i plantecellens kromosom. Det inkorporerte DNAet oppfører seg som plantens eget DNA, og arves etter Mendels arvelover. Plasmidet pTHW107 ble benyttet til å lage hannsterilitet og plasmidet pTHW118 ble benyttet til å restaurere fertilitet.

Vektorkonstruksjoner

Plasmid pTHW107 inneholder følgende genelementer som inkorporeres i plantens kromosomer:

høyre grense	Ti-DNA
bar	herbicidtoleranse, fra <i>Streptomyces hygroscopius</i>
PSsuAra	promoter fra <i>Arabidopsis thaliana</i>

<i>barnase</i>	hannsterilitets gen fra <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
PTA29	promoter fra <i>Nicotiana tabacum</i>
3'g7	terminator fra <i>A. tumefaciens</i>
3'nos	terminator fra <i>A. tumefaciens</i>
tp	transitpeptidgen for overføring til kloroplasten, fra <i>Arabidopsis thaliana</i>
venstre grense	Ti-DNA

I plasmidet pTHW118 er genene de samme som i pTHW107, med unntak av at *barstar* genet fra *Bacillus amyloliquefaciens* som gjenoppretter fertiliteten er inkorporert i stedet for *barnase* genet.

De to kimære genene mellom de to Ti-grensene består henholdsvis av PSsuAra-*bar*-3'g7-PTA29-*barnase*-3'nos og PSsuAra-*bar*-3'g7-PTA29-*barstar*-3'nos.

En rekke undersøkelser er foretatt på de genspleisede plantene og de etterfølgende generasjonene samt krysninger, og disse viser at:

- kun en enkel kopi av genene er satt inn.
- det er ikke satt inn mer DNA enn forventet eller ønsket.
- stabiliteten av genene er høy, konstatert ved undersøkelser over 4 generasjoner.
- innsettelsen har resultert i mindre delesjoner.
- innsettelsen ved den såkalte "right border" er som forventet fra andre undersøkelser meget presis, mens innsettelsen i den andre enden (left border), ikke som for right border, skjer innenfor et begrenset område, hvilket også er forventet.
- begge konstruksjonene ligger på kromosomsett AA, hvilket kan ha betydning for resultater av krysning med andre planter.

Vedlagte undersøkelser som er foretatt på de genspleisede plantene og de etterfølgende krysninger viser at:

- for linjene RM3-3 og RM3-4 er overført plasmid DNA stabilt i 3 generasjoner og i forskjellige genetiske bakgrunner, dvs. forskjellige vekststeder
- for RM3-6 ble to kopier av plasmid DNA overført, men bare ett plasmid DNA var stabilt ved avl
- et funksjonelt kopi av *bar* genet er satt inn
- et funksjonelt kopi av *barnase* genet er satt inn

I notifikasjonen er der ingen opplysninger om hvor i planten genet(ene) uttrykkes.

Beskrivelse av de innsatte genene

Bar (glufosinatresistens)

Bar genets produkt, enzymet fosfotricin acetyltransferase (PAT, phosphinothricin acetyl transferase) har høy spesifisitet overfor fosfotricin, som er den aktive komponenten i herbicider av glufosinat-typen. Herbicidet hemmer glutamin syntetase, som gir akkumulasjon av ammoniak, og som derved fører til celledød i planten. PAT inaktiverer fosfotricin ved acetylering og beskytter derved glutamin syntetase i et fosfotricinmiljø. *Bar* genet er en syntetisk versjon av *bar* genet som er hentet fra mikroorganismen *Streptomyces viridochromogenes*, strain Tü 494 (en jordbakterie) som produserer fosfotricin selv, og hvor PAT dannes som mikroorganismens eget forsvar mot

fosfinotricin. Genet er modifisert slik at det passer inn i planter, men uten å forandre på aminosyresekvensen til proteinet.

Bar genet kan anvendes både til å selekttere for celler som har fått satt inn den ønskede konstruksjon (seleksjonsmarkør på samme måte som NPTII) og for å gi planten toleranse overfor herbicider av glufosinat-typen (f.eks. Basta, Finale). Det er foretatt enkelte undersøkelser av PAT's affinitet til andre lignende stoffer, og det er blitt konkludert med at PAT har et meget spesifikt substrat behov.

Bar genet er også i 1995 vurdert av Arbeidsgruppe for næringsmiddel toksikologi og risikovurdering under Nordisk Ministerråds Embetsmannskomite for livsmedel. Konklusjonen fra denne rapporten er at evaluering av pleiotrofiske effekter fra proteiner og allergentester foreløpig mangler.

Barnase

Barnase genets produkt er en ribonuklease. Både *barnase* og *barstar* genene er hentet fra bakterien *Bacillus amyloliquefaciens* og er faktisk på samme måte som fosfinotricin/PAT systemet to elementer av samme mekanisme. *Barnase* er en ekstracellulær ribonuklease som kan gi bakterie en ernæringsmessig fordel ved "ekstracellulær fordøyelse", (muligens også en beskyttende funksjon) overfor omgivelsene. Genet styres av en celledespesifikk promoter, som uttrykkes kun i tapetumceller, dvs. det celledag som danner innsiden av støvsekken. Tapetumcellene har en sterkt spesialisert funksjon under dannelsen av pollen, idet produkter fra tapetum inngår i pollenkornets overflate. Tapetumcellelaget er derfor et lite og spesialisert vev, som opptrer i en kort periode i plantens støvdrager/pollen utvikling. *Barnase* ribonukleasen er et enzym som hydrolyserer det RNA som opptrer i de cellene som genet uttrykkes i. Cellene går dermed til grunne. Da *barnase* kun uttrykkes i tapetumcellelaget blir det kun dette vevet som ødelegges. Fordi tapetumcellenes produkter er essensielle for pollenutviklingen skjer der ingen dannelse av modent pollen og planten blir hannsteril. I den forbindelse er det en god kontroll av promoterspesifisiteten idet alle celler hvor *barnase* genet uttrykkes i vil gå til grunne.

Barnase aktivitet utenfor cellen er ikke i helsemessig forstand forskjellig fra annen ribonuklease som finnes overalt i naturen. Ribonukleaseaktivitet som sådan er kjent fra celler i alle organismer, og det er kun ved dannelse inne i levende celler at relativ høy ribonukleaseaktivitet kan gi opphav til celledød.

Barstar

Barstar genets produkt er en hemmer av *barnase* aktiviteten, og er til innvortes bruk i bakterien, og danner således en motgift overfor *barnase*. I de transgene rapsplanter anvendes systemet til plantelinjen RF3 som ved krysning med hannsterile rapsplanter gjenoppretter hannfertile rapsplanter. *Barstar* genets produkt, et lite protein, har ingen effekt på den transgene planten som sådan, men det vil ved krysning til planter med *barnase* genet uttrykt oppheve *barnase* virkningen ved at det dannes et non-kovalent kompleks med *barnase* i tapetumcellene. Dannelse av *barstar* er styrt av den samme promoter som *barnase* og ekspresjonen er derfor i samme vev, og på de samme tidspunkter i plantens utvikling. Dette protein er ikke forventet å kunne gi helsemessige betenkeligheter.

Vurdering av produktens sikkerhetsmessige aspekter vedrørende helse

Vurderingen av produktets sikkerhetsmessige aspekter vedrørende helse henvises til de tidligere søknadene C/F/95/05-01/A&B.

1) *Risiko for allergi*

Pollenallergi

En kan ikke forvente at pollen fra genmodifisert plante skal kunne gi andre allergiske reaksjoner enn de pollen fra umodifisert plante eventuelt kunne gi.

Matallergi

Aktuell bruk i næringsmidler er raffinert olje. Siden ingen av de innsatte genenes proteiner er påvist å være til stede i den raffinerte oljen skulle det være svært liten risiko for potensielle allergiske reaksjoner som skyldes disse genproduktene i oljen. PAT enzymet er et "novel" protein i næringsmidler. Basert på dagens kunnskap er det imidlertid lite sannsynlig at nye uheldige helseeffekter vil påvises og der er ikke grunn til å anta at et markørgen protein skulle medføre en spesiell allergisk risiko så lenge kilden for genet ikke er et kjent allergen.

2) *Risiko ved håndtering av planten*

Det er ikke registrert spesielle helseproblemer i forbindelse med håndtering av plantene.

3) *Innhold av kritiske toksiner*

Olje

Oljen fra denne hybride rapsplanten har svært lavt erukasyre innhold, gjennomsnittet var 0,0%. Olje fra den genmodifiserte planten er hovedsakelig lik olje fra den umodifiserte planten, og det er dessuten ingen forskjeller i de kvalitative parametrene mellom de hybride og de umodifiserte plantene, erukasyre og andre fettsyrer, ved dyrking under forskjellige klimatiske forhold og gjennom flere generasjoner. Innholdet av glukosinolater og omdanningsprodukter fra glukosinolater er ikke målt i den deodoriserte oljen. Folkehelse ser ikke dette som et problem da en antar at disse stoffene fjernes fra oljen ved deodorisering.

Fôrkake

Fôrkake eller mel fra fôrkake benyttes kun som dyrefôr. Det antas at glukosinolater i oljerapsmel kan overføres til kumelk og egg.

Vi finner imidlertid dokumentasjonen mangelfull for en vurdering av presskakene brukt som fôr.

Risiko for rester av ugrasmiddelet glufosinat og nedbrytningsprodukter

Det er ikke utført målinger over hvor store restmengder glufosinat eller glufosinatmetabolitt som finnes i frø, olje eller fôrkake. Det er ikke utført analyser som eventuelt kan belyse om andre produkter dannes i plante, f.eks. nye acetyleringsprodukter. Glufosinat benyttes ikke på raps i dag. Den hybride planten vil nødvendigvis danne større mengder av metabolitten(e) enn normalt. Men ut fra de foreliggende opplysninger i notifiseringen finner vi ingen opplysninger om

omdannelsesproduktet(ene) som gir oss mulighet til å uttale oss fra en helsemessig side. Restmengder av glufosinat og omdannelseprodukter må i så fall undersøkes.

4) Risiko for uønskede pleiotrofiske effekter

Virkning på toksiner og erukasyre er godt dokumentert. Undersøkelser av proteinmønster er svært mangelfullt dokumentert.

5) Miljømessige forhold av helsemessig betydning

Søknaden omfatter ikke bruk av glufosinat som ugrasmiddel i rapsåker ved. Glufosinat er i dag i Norge ikke tillatt brukt på raps, men kan i andre land brukes mot ugras på umodifisert raps før spiring og til nedsviing av stengel og blad før høsting av frøet. En innføring av den genmodifiserte plante vil kunne medføre en økt bruk av plantevernmidler. Dette er imidlertid noe som må vurderes av Rådgivende utvalg for plantevernmidler og Landbrukstilsynet.

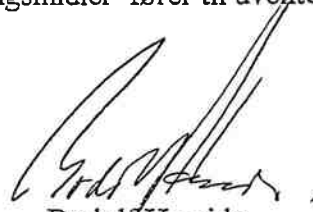
Konklusjon


På bakgrunn av ovenstående gjennomgang av medfølgende dokumentasjon finner vi det lite sannsynlig at eksponering for BAR-, barstar og barnase proteinene i seg selv og i de mengder som tilføres via genmodifisert raps er helsemessig betenkelig. Dokumentasjonen viser at plantens DNA vil i stor grad bli ødelagt av magesaft. Det er derfor lite sannsynlig at *bar*, *barnase* og *barstar* genene vil bli overført til bakterier i tarmen. Den transformerte planten inneholder ikke gener for antibiotikaresistens.

Restproblematikken i forbindelse med bruk av glufosinat på denne rapsen er ikke dokumentert. Vi vet ikke om rester kan gjenfinnes i oljen.

På basis av tilsendte opplysninger og tidligere vurderinger av samme plante, men med litt forskjell i de innsatte genene finner vi det lite sannsynlig at eksponeringen av de innsatte genene og deres proteiner er helsemessig betenkelig når det gjelder bruk av rapsplanten til produksjon av matolje. Mulig restproblematikk ser ikke ut til å være undersøkt.

Vår vurdering omfatter ikke mulig risiko for natur og økologisk miljø. Vurderingen kan endres dersom bruk av markørgener i næringsmidler fører til uventede helse effekter.


Bodolf Hareide
direktør


Jan Alexander
overlege

Saksbehandler: Arne Mikalsen