



Vitenskapskomiteen for mattrygghet
Norwegian Scientific Committee for Food Safety

Foreløpig helse- og miljørisikovurdering av genmodifisert soyalinje MON 87769 fra Monsanto Company (EFSA/GMO/UK/2009/76)

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

Innspill til EFSA's GMO Extranet

Dato: 18.02.2011

Dok. nr.: 10-307-endelig

ISBN: 978-82-8082-407-3

VKM Report 2011: 06



Bidragstere

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

Vurdert av

Faggruppe for genmodifiserte organismer:

Audun Nerland (leder), Åshild Andreassen, Per Brandtzæg, Askild Holck, Olavi Juntilla, Heidi Sjursen Konestabo, Richard Meadow, Kaare M. Nielsen, Hilde-Gunn Opsahl Sorteberg, Rose Vikse.

Koordinatorer fra sekretariatet

Arne Mikalsen og Merethe Aasmo Finne

Sammendrag

Helse- og miljørisikovurderingen av den genmodifiserte soyalinjen MON 87769 (EFSA/GMO/UK/2009/76) fra Monsanto er utført av Faggruppe for genmodifiserte organismer i Vitenskapskomiteen for mattrygghet. Mattilsynet og Direktoratet for naturforvaltning (DN) ber Vitenskapskomiteen for mattrygghet om å vurdere den genmodifiserte soyalinjen MON 87769 til bruk i næringsmidler og fôrvarer, men ikke til dyrking.

Risikovurderingen av den genmodifiserte soyaen er basert på uavhengige vitenskapelige publikasjoner og dokumentasjon som er gjort tilgjengelig på EFSA's nettside GMO EFSA Extranet. MON 87769 er risikovurdert i henhold til tiltenkt bruk i EU/EØS-området, og faggruppen har derfor ikke vurdert helse- og miljøeffekter knyttet til dyrking av soyalinjen.

Vurderingen er gjort i overensstemmelse med miljø- og helsekravene i genteknologiloven med forskrifter, først og fremst forskrift om konsekvensutredning etter genteknologiloven, samt kravene i EU-forordning 1829/2003/EF og utsetningsdirektiv 2001/18/EF med annekser. Videre er prinsippene i EFSA's retningslinjer for risikovurdering av genmodifiserte planter (EFSA 2006) og Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) konsensusdokument for soya (OECD 2009) lagt til grunn for vurderingen.

Den vitenskapelige vurderingen omfatter transformeringsprosess, bruk av vektor, transgene konstrukt, komparativ analyse av ernæringsmessig kvalitet, mineraler, kritiske toksiner, metabolitter, antinæringsstoffer, allergener og nye proteiner. Videre er agronomiske egenskaper, potensiale for ikke tilsiktede 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 MON 87769 er fremkommet ved *Agrobacterium*-mediert transformasjon av meristematiske celler fra den umodifiserte, kommersielle soyalinjen A3525. Den innsatte genkonstruksjonen i MON 87769 inneholder to desaturasegener, *Primula julia* $\Delta 6$ desaturase (*Pj.D6D*) og *Neurosora crassa* $\Delta 15$ desaturase (*Nc.Fad3*), som koder for enzymene Pj $\Delta 6D$ - og Nc $\Delta 15D$ -desaturase. Desaturase-enzymet fjerner to hydrogenatomer i fettsyrer, og det dannes en dobbeltbinding. Dette medfører at Nc $\Delta 15D$ -desaturase omdanner linolsyre (18:2 fettsyre, omega-6 = n-6 fettsyre) til alfa-linolensyre (ALA) (18:3 fettsyre, omega-3 = n-3 fettsyre). Pj $\Delta 6D$ -desaturase omdanner så alfa-linolensyren til stearidonsyre (SDA) (18:4 fettsyre, n-3 fettsyre). Hos pattedyr er SDA et viktig mellomledd i dannelsen av n-3 fettsyrene eikosapentaen (EPA)- og dokosaheksaen (DHA)-syre. EPA og DHA er 20:5 og 22:6 fettsyrer, og siden SDA (18:4) har færre dobbeltbindinger enn EPA og DHA, er den mer stabil overfor oksidering enn omega-3 fettsyrene i eksempelvis fisk.

Olje fra soyalinjen MON 87769 er primært tiltenkt brukt i matvareindustrien. I tillegg benyttes soyamel, proteinisolat, lecitin og rostet soyabønne som næringsmiddel og dyrefôr. Soyabønner inneholder antinæringsstoffer som trypsinhekkere og lektiner, og uprosessert, rå bønne benyttes derfor ikke som næringsmiddel. I følge OECD blir omlag 93 % av soyaoljen som produseres brukt som mat, mens ca. 97 % av soyamelet anvendes som fôr i husdyr- og oppdrettsnæringen (OECD 2009).

Soyalinjen inneholder ikke antibiotikaresistensgener.

Molekylær karakterisering

Faggruppen vurderer karakteriseringen av det rekombinante innskuddet i MON 87769, og de fysiske, kjemiske og funksjonelle karakteriseringene 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

Analysene av ernæringsmessige viktige komponenter ble vurdert. Valg av analyseparametere utført i henhold til OECDs konsensusdokument for soya (OECD 2009). Det er funnet statistisk signifikante forskjeller i enkeltparametere, men disse forskjellene er ikke konsistente over forsøksfelt. Verdiene for de analyserte komponentene ligger innenfor typiske verdier for andre soyasorter som er rapportert i litteraturen, og innenfor variasjonsområdene til kommersielle referansesorter som inngår i søkers dokumentasjon. Faggruppen anser at analysene av sentrale ernæringskomponenter er tilstrekkelige for en vurdering av soyalinjen til bruk som mat og fôr, og konkluderer med at forskjellene som er påviste ikke har ernæringsmessig betydning.

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

Feltforsøk over to vekstsesonger i USA viser ingen signifikante forskjeller mellom MON 87769 og umodifisert kontroll med hensyn på andre fenotypiske og agronomiske karakterer.

Toksisitet og allergenitet

Pj Δ 6D- og Nc Δ 15D -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, dvs. at det i proteinene ikke er påvist aminosyresekvenser som er lik allergene proteiners epitoper, at proteinene brytes raskt ned av mage-tarmsaft, samt at konsentrasjonene av Pj Δ 6D- og Nc Δ 15D-protein er svært lave (mindre enn 0,002 % av total mengde protein), anser faggruppen det som lite trolig at disse proteinene medfører et signifikant større potensiale for utvikling av matallergi hos mennesker sammenlignet med umodifisert soya.

Det er utført akutt-oral toksisitetsstudie(sondefôring) på mus med reinfremstilt Pj Δ 6D- og Nc Δ 15D-protein, 42 dagers fôringsforsøk med broilere og 90 dagers fôringsforsøk på rotter. Det ble ikke påvist helseskader verken på mus, broilere eller rotter. På bakgrunn fra dyreforsøk med MON 87769, som er dokumentert i denne søknaden, vurderer faggruppen det lite sannsynlig at mel som inneholder MON 87769 og som tilsettes fôr til dyr, er helsemessig betenkelige for dyr.

Faggruppen vurderer at olje produsert fra MON 87769, i norsk sammenheng, kan ha størst aktualitet som fettkilde i fôr til oppdrettsfisk. Det etterlyses derfor egne fôringsstudier med den transgene soyalinjen på fisk.

Miljørisiko

Søknaden gjelder godkjenning av soyalinjen MON 87769 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. Det er 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.

Nøkkelord

Soya, *Glycine max* (L.) Merr., genmodifisert soyalinje, MON 87769, EFSA/GMO/UK/2009/76, $\Delta 6$ -desaturase, Pj $\Delta 6D$, $\Delta 15$ -desaturase, Nc $\Delta 15D$, omega-3 fettsyre, stearidonsyre (18:4), helsemessig trygghet, helse, miljørisiko, forordning 1829/2003/EF, direktiv 2001/18/EF

Forkortelser og ordforklaringer

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.
Allel	Et bestemt gen kan foreligge i ulike varianter (alleler). Allelene kan være dominante (bestemmende for fenotypen) eller recessive (vikende).
AMPA	Aminomethylphosphonic acid, nedbrytningsprodukt fra glyfosat.
ARMG	Antibiotikaresistensmarkør
Backcross (BC)	Tilbakekryssing. Kryssing mellom en linjelinje (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 ₁ , BC ₂ 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
CP4 EPSP	Glyfosattolerant EPSPS
<i>cp4 epsps</i>	DNA-sekvens fra <i>Agrobacterium</i> sp. stamme CP4, koder for CP4 EPSPS-protein.
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-fosfatsyntase
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	Et individs relative evne til å føre sine gener/alleler videre til kommende generasjoner.
GLP	Good Laboratory Practices, retningslinjer for godt laboratoriearbeid.
Glyfosat	Bredspektret herbicid
GMO	Genmodifisert organisme
GMP	Genmodifisert plante
Hemizygot gen	Et gen som kun finnes som en enkelt kopi i en diploid organisme
Herbicid	Ugrasmiddel
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.
MT	Mattilsynet
NDF	Neutral detergent fiber, dvs. fiberfraksjon som inneholder hemicellulose og ADF.
Northern blot	Teknikk for overføring av RNA til en membran for videre studier av overførte RNA-sekvenser.
Nær-isogen linje	Linjer eller sorter som er genetisk identiske, med unntak av ett locus eller kromosomsegment.
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development

ORF	Open Reading Frame (åpen leseramme)
OSWP	Overseason whole plant
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 plantecelleenes 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

Bidragstyttere	2
Sammendrag	3
Nøkkelord	5
Forkortelser og ordforklaringer	6
Innholdsfortegnelse	8
Bakgrunn	9
Oppdrag fra Mattilsynet og Direktoratet for naturforvaltning	9
Risikovurdering	10
1 Innledning	10
1.1 Beskrivelse av egenskaper og virkningsmekanismer	10
2 Molekylær karakterisering	11
2.1 Transformasjonssystem og vektorkonstruksjon	11
2.2 Karakterisering av geninnsetting og genkonstruksjon	11
2.3 Informasjon vedrørende uttrykk av innsatte gener og åpne leserammer (ORF)	13
2.4 Nedarving og stabilitet av innsatt DNA	15
2.5 Vurdering basert på foreløpig datagrunnlag.....	15
3 Komparative analyser	16
3.1 Valg av komparator og forsøksdesign.....	16
3.2 Analyser av ernæringsmessige komponenter	16
3.3 Analyser av prosesserte produkter	24
3.4 Agonomiske egenskaper	25
3.5 Vurdering basert på foreløpig datagrunnlag.....	28
4 Dokumentasjon av toksisitet, allergisitet og næringsverdi	29
4.1 Toksisitet.....	29
4.2 Allergisitet.....	32
4.3 Ernæringsmessig vurdering av den genmodifiserte soyalinjen MON 87769 til bruk som mat og fôr	34
4.4 Vurdering basert på foreløpig datagrunnlag.....	36
5 Miljøriskovurdering	37
5.1 Potensiale for ikke-tilsiktede effekter på fitness relatert til genmodifiseringen	37
5.2 Potensiale for genoverføring	37
5.2.1 Horisontal genoverføring	38
5.2.2 Vertikal genoverføring	38
5.3 Miljøovervåkningsplan	38
5.4 Vurdering basert på tilgjengelig dokumentasjon	39
6 Vurdering av søkers dokumentasjon, kunnskapshull	40
7 Innspill til EFSA GMO ExtraNet	41
Vurdering basert på tilgjengelig datagrunnlag	42
Referanser	43
1 VEDLEGG 1	47
2 VEDLEGG 2	50

Bakgrunn

Faggruppe for genmodifiserte organismer i Vitenskapskomiteen for mattrygghet er bedt av Mattilsynet og Direktoratet for naturforvaltning om å foreta en vurdering av helse- og miljørisiko ved en eventuell godkjenning av den genmodifiserte soyalinjen MON 87769 fra Monsanto (EFSA/GMO/UK/2009/76). MON 87769 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 ikke dyrking.

Søknaden ble fremmet og anbefalt av engelske myndigheter i oktober 2009. Søknaden ble lagt ut på EFSA-nett 15. februar 2010, med frist på 90-dager for innspill fra EU- og EØS/EFTA-landene. Norge har ikke tidligere uttalt seg om soyalinjen MON 87769.

MON 87769 er foreløpig ikke godkjent for kommersiell dyrking eller omsetning som mat og/eller fôr i noen land (CERA 2010; EFSA/GMO/UK/2009/76). I følge søker er soyalinjen primært tenkt dyrket i USA, og søknad om godkjenning for alle bruksområder er under behandling i USDA-APHIS og US FDA. I tillegg vil det bli søkt om godkjenning av MON 87769 til import og bruk som mat og fôr i Canada, Mexico, Japan, Sør-Korea, Australia/New Zealand, Filippinene, Singapore og Taiwan.

Oppdrag fra Mattilsynet og Direktoratet for naturforvaltning

Mattilsynet og Direktoratet for naturforvaltning har i brev datert 12.5.2006 (ref. 2006/17817) og 29.3.2010 (ref. 2008/4367 ART-BI-BRH) gitt Vitenskapskomiteen for mattrygghet i oppdrag å foreta løpende risikovurderinger av genmodifiserte næringsmidler og fôrvarer som faller inn under EUs forordning 1829/2003/EF. VKM er bedt om å vurdere helse- og miljøaspekter ved slike produkter, og på bakgrunn av vurderingene gi innspill til EFSA's GMO Extranet.

Søknad EFSA/GMO/UK/2009/76, genmodifisert soyalinje MON 87769, ble lagt ut på EFSA's GMO Extranet 8. desember 2009. Faggruppe for genmodifiserte organismer skal i tråd med oppdragsbrev 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 EFSA's retningslinjer for vurdering av genmodifiserte planter og avledete næringsmidler og fôrvarer ("Guidance document of the scientific panel on genetically modified organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed" (EFSA 2006)).

I henhold til oppdragsbrev fra DN skal VKM primært fokusere på miljørisiko i EØS-området, og på miljørisiko som er spesifikke for Norge.

Produktet som ønskes vurdert, er:

Genmodifisert soya, EFSA/GMO/UK/2009/76 (soya MON 87769).

Unik kode: MON-87769-7

Status i EU: Søknad under 1829/2003/EF. EFSA's frist for innspill er 15.5.10.

Svarfrist til Mattilsynet/DN: 13.5.10.

Risikovurdering

1 Innledning

Risikovurderingen av den genmodifiserte soyalinjen MON 87769 er i basert på dokumentasjon som er gjort tilgjengelig på EFSAAs nettside GMO Extranet. I tillegg er det benyttet uavhengige vitenskapelige publikasjoner med referee i vurderingen. Vurderingen er gjort i henhold til tiltenkt bruk, og i overensstemmelse med miljø- og helsekravene i genteknologiloven med forskrifter, først og fremst forskrift om konsekvensutredning etter genteknologiloven. Videre er kravene i EUs forordning 1829/2003/EF og utsettingsdirektiv 2001/18/EF med annekser lagt til grunn for vurderingen.

I tråd med VKMs mandat presiseres det at vurderinger av etikk, bærekraft og samfunnsnytte i henhold til kravene i genteknologiloven og dens konsekvensforskrift 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 EFSAAs retningslinjer for vurdering av genmodifiserte planter. Prinsippene som er lagt til grunn for vurderingen, er derfor hentet fra EFSAAs dokument "Guidance document of the scientific panel on genetically modified organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed" (EFSA 2006). Ved vurdering av vesentlig likhet har faggruppen lagt vekt på OECDs konsensusdokument for soya (OECD 2009), som gir anbefalinger over hvilke parametere som bør undersøkes.

Det er kun medlemmene i Faggruppe for genmodifiserte organismer som har vurdert den genmodifiserte soyaen.

1.1 Beskrivelse av egenskaper og virkningsmekanismer

Soyalinje MON 87769 er fremkommet ved *Agrobacterium*-mediert transformasjon av meristematiske celler fra den umodifiserte, kommersielle soyalinjen A3525. Den binære vektoren PV-GMPQ1972, som inneholder to rekombinante DNA-fragmenter (T-DNA I og II), ble benyttet til transformasjonen.

De innsatte genkonstruksjonene i MON 87769 inneholder to DNA-fragmenter, henholdsvis desaturasegenet *Primula juliae* $\Delta 6$ desaturase (*Pj.D6D*) og desaturasegenet *Neurosora crassa* $\Delta 15$ desaturase (*Nc.Fad3*). Genene koder for enzymene Pj $\Delta 6D$ - og Nc $\Delta 15D$ -desaturase. Når desaturase-enzymet fjerner to hydrogenatomer fra en fettsyre, dannes en dobbeltbinding. Nc $\Delta 15D$ -desaturase omdanner linolsyre (en 18:2 fettsyre) til alfa-linolensyre (ALA) (18:3 fettsyre). Pj $\Delta 6D$ -desaturase omdanner så alfa-linolensyren til stearidonsyre (SDA) (18:4 fettsyre).

Hos pattedyr er SDA et viktig mellomledd i dannelsen av omega-3 fettsyrene eikosapentaen (EPA)- og dokosaheksaen (DHA)-syre. EPA og DHA er 20:5 og 22:6 fettsyrer, og siden SDA (18:4) har færre dobbeltbindinger enn EPA og DHA, er den mer stabil overfor oksidering sammenlignet med omega-3 fettsyrene i eksempelvis fisk.

2 Molekylær karakterisering

2.1 Transformasjonssystem og vektorkonstruksjon

MON 87769 er fremkommet ved *Agrobacterium*-mediert transformasjon av meristematiske vev fra den umodifiserte, kommersielle soyalinjen A3525. Den binære vektoren PV-GMPQ1972, som inneholder to rekombinante DNA-fragmenter (T-DNA I og II), ble benyttet til transformasjonen. T-DNA I inneholder to ekspresjonskassetter, henholdsvis en *Pj.D6D*-ekspresjonskassett og en *Nc.Fad3*-ekspresjonskassett, mens T-DNA II inneholder en *cp4 epsps*-ekspresjonskassett. Ved transformasjonen ble T-DNA I og II satt inn som to uavhengige loki. Transformanter (Ro) ble selektert ved at de overlevde og vokste i nærvær av glyfosat. Påfølgende selvbefruktning på R1-generasjonen førte til at T-DNA I (*Pj.D6D*- og *Nc.Fad3*-kassetten) ble selektert fra T-DNA II (*cp4 epsps*-kassetten).

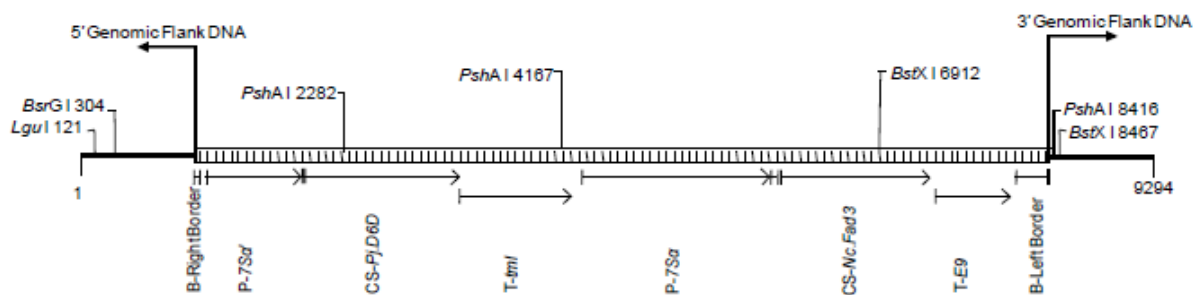
MON 87769-plantene inneholder kun ett rekombinant DNA-område med ekspresjonskassetten *Pj.D6D* og *Nc.Fad3*, mens planter inneholdende *cp4 epsps*-kassetten ble eliminert.

2.2 Karakterisering av geninnsetting og genkonstruksjon

Ekspresjonskassetten, som koder for PjΔ6D proteinet, inneholder en frøspesifikk promotor og ledersekvens P-7*Sa* fra *Sphas I*-genet hos soya, CS-*Pj.D6D*-sekvenser fra desaturasegenet til kaukasusnøkleblom (*Primula juliae*) og en 3' ikke-translatert sekvens (T-*tml*) fra *Agrobacterium*. Sekvensen avslutter transkripsjonen (se figur 1 og tabell 1 og 2).

Ekspresjonskassetten, som koder for NcΔ15D-proteinet, inneholder den samme frøspesifikke promoteren og ledersekvens P-7*Sa* fra *Sphas I*-genet til soya, CS-*Nc.Fad3*-sekvenser fra desaturasegenet til brødmugg *Neurospora crassa* og en 3' ikke-translatert sekvens (T-*E9*) fra genet *rbcS2* fra hageert (*Pisum sativum*). T-*E9*-sekvensen avslutter transkripsjonen (se figur 1 og tabell 1 og 2). DNA-fragmentene 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 kopi av DNA-fragmentet i soyaens genom. Gener og DNA-elementer i dette fragmentet er vist i figur 1 og tabellene 1 og 2.



Figur 1. Gener og regulatoriske elementer satt inn i MON 87769.

Tabell 1. Beskrivelse av innsatte gener og regulatoriske elementer i ekspresjonskassetene.

<i>Pj.D6D</i>- ekspresjonskassett	
<i>P-7Sa</i>	Promotor, ledesevens og 5' ikke-translatert område. Oversettes ikke til proteiner.
<i>CS-Pj.D6D</i>	Δ 6-desaturase-gen fra kaukasusnøkleblom (<i>Primula juliae</i>)
<i>T-tml</i>	Ikke-translatert DNA-sekvens fra <i>Agrobacterium</i> . Avslutter transkripsjonen, men oversettes ikke til proteiner.
<i>Nc.Fad3</i>- ekspresjonskassett	
<i>P-7Sa</i>	Promoter, ledesevens og 5' ikke-translatert område. Oversettes ikke til proteiner
<i>CS-Nc.Fad3</i>	Sekvenser fra desaturasegenet fra rød brødmuggsopp (<i>Neurospora crassa</i>)
<i>T-E9</i>	3' ikke-translatert sekvens (<i>T-E9</i>) fra genet <i>rbcS2</i> hos ert (<i>Pisum sativum</i>). <i>T-E9</i> -sekvensen avslutter transkripsjonen. Oversettes ikke til proteiner.

Molekylærbiologiske analyser viser at det rekombinante fragmentet i planten inneholder de samme gener som er på det tilsvarende rekombinante T-DNA I-fragmentet i plasmidet PV-GMPQ1972. Ett DNA-fragment på 7367 bp gjenfinnes som et enkelt lokus i soyaens genom.

Søker har sekvensert 933 baser oppstrøms for 5'-enden og 831 baser nedstrøms for 3'-enden av innskuddet (tabell 2). Flankesekvensene ble benyttet ved søk i "Genbank non-redundant cDNA nucleotide database" (sist oppdatert 2. mai 2009), og "Genbank public non-redundant amino acid database" (sist oppdatert 28. april 2009). Søker har benyttet BLASTn- og BLASTx-algoritmer i sekvenssøkene.

Søkene som er utførte bekrefter at flankesekvensene er soyasekvenser. Analyser viser at under innsettingen av plasmidets rekombinante T DNA I-fragment ble 9 bp genomisk DNA fjernet, mens henholdsvis 17 bp og 8 bp ble satt inn i 5'- og 3'-enden til det rekombinante DNAet. DNA-analysene er utført ved hjelp av Southern blot, DNA- sekvensanalyser, PCR med primere som er spesifikke for sekvensene ved 5'-enden og 3'-enden for det transgene innskuddet.

Monsanto har også vist at T-DNA II, "backbone" elementer og seleksjonsmarkørsekvenser fra plasmidet PV-GMPQ1972 ikke er tilstede i MON 87769-genomet. På bakgrunn av sekvensanalysene konkluderes det med at innsettingen av det rekombinante DNA-fragmentet ikke er satt inn i kjente kodende- eller regulatoriske sekvenser i soyagenomet.

Tabell 2. Størrelsesfordeling av gener og regulatoriske elementer i ekspresjonskassetten i MON 87769.

Genetic Element ¹	Location in Sequence ²	Function (Reference)
Sequence flanking 5' end of the insert	1-933	Soybean genomic DNA
B ³ -Right Border	934-976	DNA region from <i>Agrobacterium tumefaciens</i> containing the right border sequence used for transfer of the T-DNA (Depicker et al., 1982)
Intervening Sequence	977-1027	Sequence used in DNA cloning
P ⁴ -7Sa'	1028-1868	Promoter and leader from the <i>Sphas1</i> gene of <i>Glycine max</i> encoding beta-conglycinin storage protein (alpha'-bcsp) (Doyle et al., 1986)
Intervening Sequence	1869-1884	Sequence used in DNA cloning
CS ⁵ -Pj.D6D	1885-3225	Coding region for the fatty acid delta-6 desaturase from <i>Primula juliae</i> (Ursin et al., 2005)
Intervening Sequence	3226-3233	Sequence used in DNA cloning
T ⁶ -tml	3234-4183	3' non-translated region of the <i>tml</i> gene from <i>Agrobacterium tumefaciens</i> octopine-type Ti plasmid (Kemp et al., 2000)
Intervening Sequence	4184-4284	Sequence used in DNA cloning
P-7Sa	4285-5964	Promoter and leader from the <i>Sphas2</i> gene from soybean encoding the alpha subunit of beta-conglycinin (Wang et al., 2004)
Intervening Sequence	5965-5992	Sequence used in DNA cloning
CS-Nc.Fad3	5993-7282	Codon optimized coding sequence for the gene from <i>Neurospora crassa</i> encoding delta-15 desaturase (Ursin et al., 2003)
Intervening Sequence	7283-7334	Sequence used in DNA cloning
T-E9	7335-7977	3' non-translated region of the pea <i>rbcS2</i> gene which functions to direct polyadenylation of the mRNA (Coruzzi et al., 1984)
Intervening Sequence	7978-8026	Sequence used in DNA cloning
B-Left Border	8027-8300	DNA region from <i>Agrobacterium tumefaciens</i> containing the right border sequence used for transfer of the T-DNA (Depicker et al., 1982)
Sequence flanking 3' end of the insert	8301-9131	Soybean genomic DNA

¹ Although flanking sequences and intervening sequences are not functional genetic elements, they comprise a portion of the sequence reported in Figure 17.

² Numbering refers to the sequence from Figure 17 that includes the insert in MON 87769 and adjacent genomic DNA.

³B – Border; ⁴P – Promoter; ⁵CS – Coding Sequence; ⁶T – 3' non-translated transcriptional termination sequence and polyadenylation signal sequences.

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

I dokumentasjonen fra søker presenteres resultater fra to proteinekspresjonsstudier med soyalinjen MON 87769. Feltforsøkene, som ligger til grunn for studiene, ble utført i 2006 og 2007 i representative områder for soyadyrking i USA (tabell 3). Forsøkene ble lagt ut som fullstendig randomiserte blokkdesign med tre gjentak på fem lokaliteter hvert forsøksår, og inkluderte foruten testlinjen MON 87769 (generasjon R₅ og R₆) en umodifisert kontroll med tilsvarende genetisk bakgrunn (A3525). I begge forsøksseriene ble det tatt prøver av bønne (frø), fôrfraksjon, røtter, samt blad på ulike tidspunkt gjennom vekstsesongen. Ekspresjonen av PjΔ6D- og NcΔ15D-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 Pj Δ 6D- og Nc Δ 15D-proteinene kontrolleres av frøspesifikke promotorer, og nivået av disse proteinene var under deteksjonsgrensen både i blad og rotvev. I begge vekstsesongene var nivåene av både Pj Δ 6D og Nc Δ 15D høyest i umodne frø og lavest i modne frø (vekststadium R8) (tabell 3).

Tabell 3. Gjennomsnittlig konsentrasjon av Pj Δ 6D- og Nc Δ 15D-protein uttrykt i blad, hel plante, røtter og bønne fra MON 87769 på ulike utviklingsstadier. Resultater fra feltforsøk i USA i 2006 og 2007.

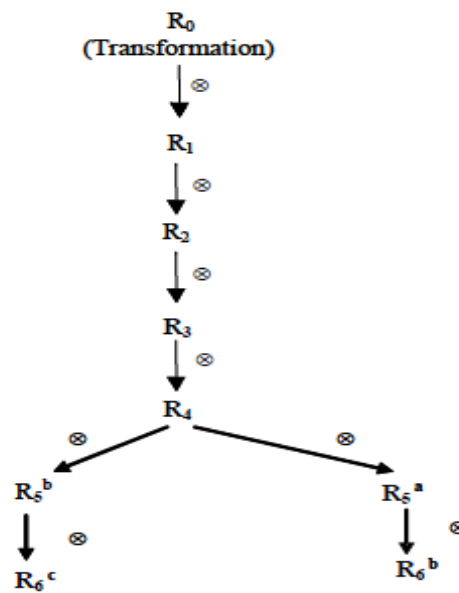
Vev	Utviklingstrinn ¹	Gjennomsnittlig proteinkonsentrasjon µg/g tørrvekt ± SD (variasjonsområde)			
		2006		2007	
		Pj Δ 6D	Nc Δ 15D	Pj Δ 6D	Nc Δ 15D
Blad	OSL-1 (V3-V4) OSL-2 (V6-V8) OSL-3 (V10-V12) OSL-4 (V14-V16)	<LOD ²	<LOD	<LOD	<LOD
Hel plante (fôr)	R6	16 ± 9,5 (3,6-28)	14 ± 6,8 (4,6-30)	10 ± 11 (1,4-31)	17 ± 14 (3,7-41)
Røtter	R6	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Frø umoden	R5-tidlig R6	100 ± 63 (19-210)	200 ± 89 (66-330)	47 ± 27 (16-120)	110 ± 41 (39-190)
moden	R8	1,8 ± 0,95 (0,5-3,2)	10 ± 6,5 (4,8-25)	3,0 ± 3,3 (0,69-9,2)	8,7 ± 3,8 (3,4-17)

1 Utviklingstrinnene er beskrevet i oversikten over ordforklaringer/forkortelser

2 LOD: 0,1 µg/g råvekt

Det er gjort studier for å påvise endogene åpne leserammer i 5'- og 3'-flankerende ende til det rekombinante DNA-fragmentet i soyaens genom. Det ble søkt etter seks potensielle åpne leserammer. I henhold til vedlagte dokumentasjon fra søker ble det ikke påvist endogene åpne leserammer i 5'- eller 3'- flankerende områder.

Når det gjelder de seks mulige oppstrøms og nedstrøms åpne leserammene av insertet ble det undersøkt for polypeptider som er lik eller større enn 8 aminosyrer. Søker har påvist 5 og 6 mulige polypeptider, som kan uttrykkes fra henholdsvis 5'- og 3' flankerende ende av insertet. Det ble videre utført teoretiske analyser av de samme mulige polypeptidene ved bruk av oppdatert versjoner av AD_2009 (allergendatabase), BLOSUM50 (identifiserer sekvenslikheter som omfatter gaps), PRT_2009 (GenBank protein database, utgave 169.0) og TOX_2009. 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 uheldige helsemessige konsekvenser.



R0 – originally transformed plant; ⊗ – self pollinated

Figure 22. MON 87769 Breeding Diagram

All generations shown were self-pollinated (⊗). The R₁ generation was used for segregation analysis and the selection of plants homozygous for the T-DNA I insert. R₃ seed material was used for commercial variety development.

Generation R₄ was used in the molecular characterisation analyses.

Generations R₃, R₄, R₅^a, R₆^b, and R₆^c were used in the molecular generation stability analyses.

Generation R₅^a was used in the 2006 phenotypic evaluation.

Generation R₅^a was used in the 2007 phenotypic evaluation.

Generation R₅^a was used in the 2006 expression/composition analyses.

Generation R₅^b was used in the 2007 expression/composition analyses.

Generation R₅^b was used in the 2007 processed fraction composition analyses.

Generation R₆^b was used in the dormancy/germination evaluation.

Generation R₆^b was used in the pollen evaluation.

Figur 2. Kryssingsskjema for MON 87769.

2.4 Nedarving og stabilitet av innsatt DNA

I henhold til dokumentasjonen fra søker er genetisk stabilitet undersøkt ved analyse av genomisk DNA fra fire ulike generasjoner (R₃ - R₆). Resultatene fra Southern blot-analysene viser at det rekombinante DNA-innskuddet er integrert i genomet og nedarves stabilt over generasjoner.

Fenotypisk stabilitet er vist ved spaltingsdata fra tre generasjoner (F₂, F₃ og F₄) (vedlegg 2). Segregasjons-analysene (chi-kvadrat-test) viser forventet spaltningstall for generasjonene F₂, F₃ og F₄, og det konkluderes med at rekombinante DNA-fragmentet følger mønsteret for mendelsk nedarving av et dominant lokus (forventet hemizygot nedarving).

2.5 Vurdering basert på foreløpig datagrunnlag

Den transgene soyalinjen MON 87769 har fått tilført et *Pj.D6D*- og et *Nc.Fad3*-gen. I henhold til søkers informasjon vedrørende integreringsplass og flankesevenser til de integrerte transgenene, samt

Southern blot-analyser er det grunn til å tro at transgenene sitter i ett lokus i genomet. Det konkluderes med at nedarvingen av *Pj.D6D*- og *Nc.Fad3*-genet i soyalinjen MON 87769 følger mønsteret for mendelsk nedarving av ett dominant lokus, og at fusjonsproteiner ikke uttrykkes i MON 87769.

3 Komparative analyser

3.1 Valg av komparator og forsøksdesign

I henhold til søkers dokumentasjon er den transgene soyalinjen MON 87769 testet i en serie feltforsøk over to vekstsesonger i sentrale dyrkingsområder for soya i USA.

Feltforsøkene for komparative analyser av ernæringsmessige karakterer ble utført på henholdsvis fem lokaliteter i 2006 og fem lokaliteter i 2007. Den konvensjonelle soyalinjen A3525, med tilsvarende genetisk bakgrunn som testlinjen men som ikke uttrykker *PjΔ6D*- og *NcΔ15D*-protein, ble benyttet som umodifisert kontroll i forsøkene. I tillegg var det inkludert henholdsvis 10 og 15 umodifiserte, kommersielle soyasorter som referansesorter i forsøkene i hver av forsøksårene (2-3 sorter på hvert forsøkssted).

Testlinje, komparator og referansesorter ble plantet i fullstendig randomiserte blokkdesign med tre gjentak på hver lokalitet. Søker viser til at dyrkingsregimet var i henhold til vanlig praksis i den enkelte region der forsøkene var lokaliserte. Det ble tatt ut prøver fra tre gjentak per lokalitet for analyser av ernæringsmessige viktige komponenter både hos test- og kontrollinjen, mens prøver fra ett gjentak ble lagt til grunn for analyser av referansesortene.

Statistiske analyser

I Nordisk ministerråds rapport "Safety Assessment of Novel Food Plants: Chemical Analytical Approaches to the Determination of Substantial Equivalence" (TemaNord 1998), anbefales det at tilstrekkelig antall prøver må analyseres for å få adekvat sensitivitet for statistisk analyse. Spredning i 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

Hovedkomponenter i soyabønne og fôr

Valg av analyseparametre er gjort i henhold til OECDs konsensusdokument for soya (OECD 2009). Det er foretatt en rekke analyser av hovedkomponenter i fôr og bønne, samt belg, olje, mel, rostet mel, proteinisolat og lecitin. Resultatene av analyser av hovedkomponenter i bønne og fôr er sammenlignet med analytiske data for soya fra databasen ILSI Crop Composition (ILSI 2008).

Det ble analysert for totalt 75 forskjellige komponenter, 68 i bønne og syv i fôr. Analyser av prøver fra feltforsøkene viste at innholdet av 26 av komponentene var lavere enn påvisningsgrensene. Dette medførte at følgende komponenter ble ekskludert fra de statistiske analysene: kaprylsyre (8:0), kaprinsyre (10:0), laurinsyre (12:0), myristinsyre (14:0), myristoleinsyre (14:1), pentadekansyre (15:0), pentadekansyre (15:1), palmitolsyre (16:1), heptadekansyre (17:0), heptadekansyre (17:1), total trans oktadekansyrer (18:1), isolinolinsyre (18:2), total trans linolsyrer (18:2), 9c,12c,15t trans ALA (18:3), gamma linolensyre (18:3), andre 18:3 trans fettsyrer, 6c,9c,12c,15t trans stearidinsyre (18:4), stearidonsyre (18:4), eikosadiensyre (20:2), ekosatriensyre (20:3), arakidonsyre (20:4), eikosapentaensyre (20:5), erukasyre (22:1), dokosapentaensyre (22:5), dokoseheksaensyre (22:6), og 24:0 lignocersyre (24:0). Generelt er det lavt innhold av disse komponentene i soya (OECD 2009).

Totalt ble det gjennomført statistiske analyser av 49 komponenter (syv i fôrprøver og 42 i soyabønne).

Fôrfraksjon

Fôrfraksjonen ble analysert med hensyn på innhold av aske, fett, protein, total fiber, vann, ADF (acid detergent fiber), NDF (neutral detergent fiber) og karbohydrater. I henhold til søker viser statistiske analyser over lokaliteter ingen signifikante forskjeller mellom MON 87769 og den nær-isogene linjen for komponentene aske, fett, total fiber, ADF (acid detergent fibre), NDF (neutral detergent fibre) og karbohydrater i forsøkene fra USA (tabell 4). Det ble imidlertid funnet signifikante forskjeller mellom testlinjen og kontroll for proteininnhold ($p < 0,05$).

Tabell 4. Resultater fra analyser av fôrfraksjon fra soyalinjen MON 87769 og den umodifiserte kontrollinjen A3525. Fra feltforsøk i USA i 2006 og 2007.

Komponenter analysert (g/100 g tørrvekt)	USA 2006 Gjennomsnittverdi \pm SD (Variasjonsområde)		USA 2007 Gjennomsnittverdi \pm SD (Variasjonsområde)	
	Nær-isogen kontroll A3525	MON 87769	Nær-isogen kontroll A3525	MON 87769
Vann	72,20 \pm 0,64 (70,10-74,70)	72,28 \pm 0,64 (69,50-75,90)	73,98 \pm 1,37 (70,30-78,80)	74,22 \pm 1,37 (69,20-79,10)
Aske	6,56 \pm 0,24 (5,38-7,75)	6,58 \pm 0,24 (5,29-7,30)	7,34 \pm 0,48 (5,28-10,42)	7,41 \pm 0,48 (5,94-9,33)
Fett	5,72 \pm 0,29 (4,02-6,72)	5,30 \pm 0,29 (3,80-6,90)	6,40 \pm 0,73 (3,92-9,53)	6,31 \pm 0,73 (3,37-8,59)
Protein	20,67 \pm 1,05 (18,09-24,98)	20,71 \pm 1,05 (17,05-24,53)	22,06 \pm 0,92 (17,22-28,84)	21,58 \pm 0,92 (19,19-24,77)
Karbohydrater	67,04 \pm 1,32 (61,18-71,51)	67,41 \pm 1,32 (69,50-75,90)	64,18 \pm 1,26 (56,43-70,46)	64,78 \pm 1,26 (60,57-68,42)
ADF	30,13 \pm 1,36 (24,39-37,06)	31,06 \pm 1,36 (24,91-36,39)	32,06 \pm 2,14 (23,35-42,45)	30,50 \pm 2,14 (24,61-39,95)
NDF	33,22 \pm 1,37 (25,48-42,62)	33,22 \pm 1,37 (28,06-42,44)	34,43 \pm 2,08 (23,35-42,74)	33,53 \pm 2,08 (24,61-39,95)

Soyabønne

Når det gjelder soyabønne er det foretatt analyser av følgende komponenter: protein, fett, aske, karbohydrater, ADF, NDF, vann, karbohydrater, aminosyrer (18), fettsyrer (C8-C24), totalmengde vitamin E, isoflavoner (daidzein, glycitein, genistein), oligosakkaridene raffinose og staktyose, sekundære metabolitter og anti-næringsstoffene (lektiner, trypsinhemmer, og fytinsyre). Analysene ble utførte under god laboratoriepraksis (GLP)

Hovedkomponenter i soyabønne

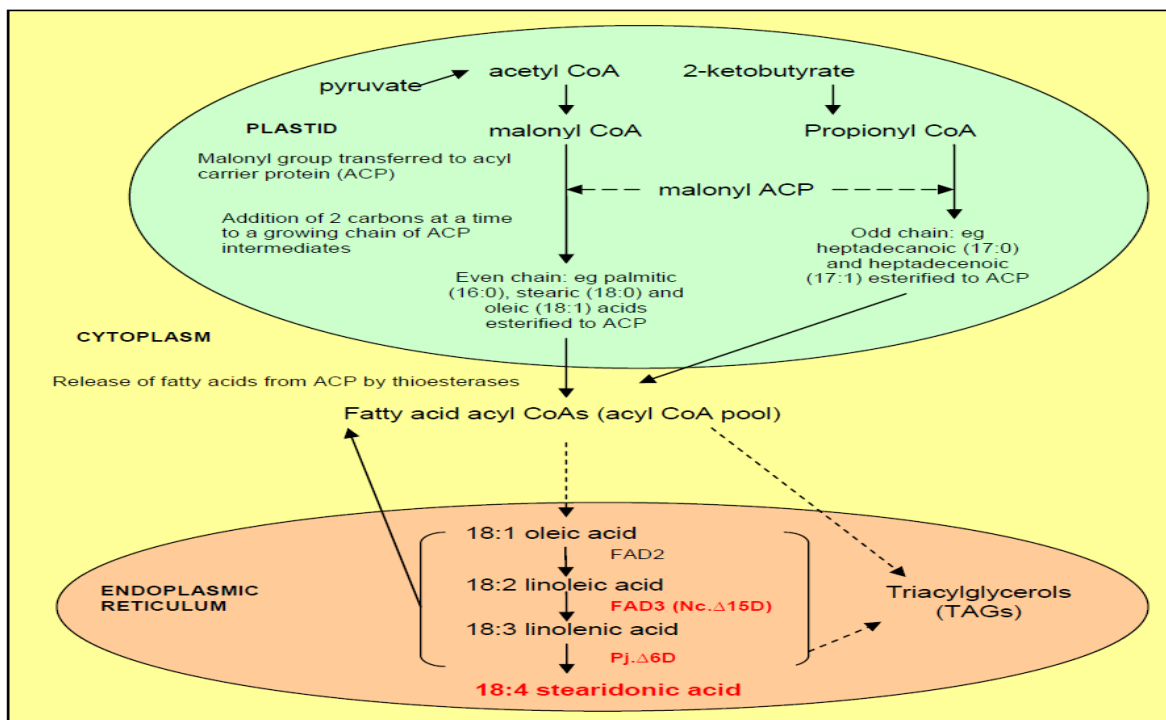
Det ble funnet signifikant forskjell mellom MON 87769 og nær-isogen kontroll for protein, aske og karbohydrater ($p < 0,05$).

Tabell 5. Resultater fra analyser av hovedkomponenter og fiber i bønner fra soyalinjen MON 87769 og kontrollinjen A3525. Fra feltforsøk i USA 2006 og 2007.

Komponenter analysert (g/100 g tørrvekt)	USA 2006 Gjennomsnittsverdi ± SD (Variasjonsområde)		USA 2007 Gjennomsnittsverdi ± SD (Variasjonsområde)	
	Nær-isogen kontroll A3525	MON 87769	Nær-isogen kontroll A3525	MON 87769
Vann	7,41 ± 0,17 (6,84-8,11)	7,47 ± 0,17 (6,71-8,21)	9,19 ± 0,31 (8,18-10,40)	9,44 ± 0,31 (8,27-11,00)
Aske	5,63 ± 0,092 (5,24-6,07)	5,72 ± 0,092 (5,23-6,17)	5,55 ± 0,10 (5,03 – 5,95)	5,66 ± 0,10 (5,34 – 6,07)
Fett	15,94 ± 1,05 (12,73-18,80)	15,91 ± 1,05 (12,95-19,03)	16,38 ± 0,35 (14,27-17,56)	17,39 ± 0,35 (15,08-18,62)
Protein	39,75 ± 0,27 (38,22-41,58)	41,92 ± 0,27 (40,92-43,36)	40,70 ± 0,40 (39,52-42,84)	42,34 ± 0,40 (41,26-43,82)
Karbohydrater	38,68 ± 0,99 (35,30-42,60)	36,45 ± 0,99 (33,23-39,93)	37,37 ± 0,56 (35,04 – 40,40)	34,61 ± 0,56 (32,89 – 37,48)
ADF	16,90 ± 0,42 (13,80-18,15)	16,77 ± 0,42 (14,38-18,31)	15,82 ± 0,42 (14,46 – 18,47)	15,74 ± 0,42 (12,82 - 19,07)
NDF	17,18 ± 0,38 (14,43-19,37)	16,84 ± 0,38 (15,06-19,15)	16,85 ± 0,39 (13,96-18,33)	16,13 ± 0,39 (13,82-18,65)

Fettsyresammensetning i soyabønne

Fettsyresammensetningen i soyabønne er målt i henhold til OECDs konsensusdokument for soya. Hensikten med genmodifiseringen er å øke mengden av stearidonsyre (SDA, en 18:4 (n-3) fettsyre) i frøene. NcΔ15D-desaturase omdanner linolsyre (en 18:2 (n-6) fettsyre) til alfa-linolensyre (ALA) (18:3 (n-3) fettsyre). PjΔ6D-desaturase omdanner så alfa-linolensyren til SDA (figur 3 og 4).



Figur 3: Forenklet skjematisk sammendrag av syntese av stearidonsyre (SDA) i MON 87769.

Syntese av SDA vil føre til endret innhold av oljesyre, linolsyre og linolensyre i MON 87769. Når det gjelder linolsyre er det forventet og funnet store statistiske forskjeller i forhold til kontroll. Innholdet av linolsyre i MON 87769 er gjennomsnittlig redusert med ca 50 % i forhold til nær-isogen kontroll, mens for olje- og linolensyre er endringene henholdsvis en reduksjon på ca. 15 % og en økning på ca. 20 % (tabell 6).

OECDs konsensusdokument for soya (OECD 2009) anbefaler følgende fettsyrer analysert: palmitinsyre (C16:0), stearinsyre (C18:0), oljesyre (C18:1), linoljesyre (C18:2), linolensyre (C18:3) og arakidonsyre (C20:0). Søker har analysert for innhold av totalt 30 fettsyrer. Av disse er det syv fettsyrer som kunne kvantifiseres (se tabell 6). Innholdet av de enkelte fettsyrene ble sammenlignet både innen og over lokaliteter. Statistiske analyser kunne bare utføres på palmitinsyre, stearinsyre, oljesyre, linoljesyre, linolensyre, arakidonsyre og behensyre (22:0). Statistiske analyser utført over lokaliteter i 2006 viser signifikante forskjeller mellom testlinje og kontroll for fettsyrene palmitin, olje, linolje, linolen, arakidon og behen, se tabell 6. Resultater fra forsøkene i 2007 viser signifikante forskjeller for alle fettsyrene (tabell 6). Med unntak for olje-, linol- og linolensyre, er imidlertid forskjellene små og innenfor toleranseintervallene som ble målt med grunnlag i referansesortene som inngikk i studien. Verdiene ligger også innenfor typiske verdier som er rapportert i litteraturen.

Tabell 6. Resultater fra analyser av de enkelte fettsyrene i prøver fra soyalinjen MON 87769 og kontrollinjen A3525. Fra feltforsøk i USA 2006 og 2007.

Komponenter analysert (% av totalt fettsyreinnehold)	USA 2006 Gjennomsnittsverdi ± SD (Variasjonsområde)		USA 2007 Gjennomsnittsverdi ± SD (Variasjonsområde)	
	Nær-isogen kontroll A3525	MON 87769	Nær-isogen kontroll A3525	MON 87769
16:0 Palmitinsyre P¹=<0,001; p²=<0,001	11,77 ± 0,13 (11,14 - 12,08)	12,06 ± 0,13 (11,53 - 12,54)	11,80 ± 0,087 (11,63 - 12,11)	12,40 ± 0,087 (12,13 - 12,77)
18:0 Stearinsyre p=0,245; p=0,005	4,15 ± 0,10 (3,85 - 4,44)	4,19 ± 0,10 (3,73 - 4,53)	4,12 ± 0,058 (3,96 - 4,33)	4,25 ± 0,058 (4,05 - 4,52)
18:1 Oljesyre p=0,001; p=<0,001	19,19 ± 0,95 (17,24 - 21,17)	15,18 ± 0,95 (12,66 - 18,80)	20,37 ± 0,43 (19,35 - 21,52)	17,98 ± 0,43 (16,89 - 19,80)
18:2 Linolsyre p=<0,001; p=<0,001	54,93 ± 1,64 (54,05 - 56,04)	22,78 ± 1,64 (16,46 - 30,81)	54,25 ± 0,62 (52,44 - 55,29)	24,50 ± 0,62 (22,15 - 27,58)
18:3 Linolensyre p=0,016; p=<0,001	9,20 ± 0,46 (7,42 - 10,66)	11,18 ± 0,46 (10,20 - 11,80)	8,68 ± 0,12 (8,07 - 9,16)	10,42 ± 0,12 (10,12 - 10,97)
20:0 Arakidonsyre p=<0,001; p=<0,001	0,31 ± 0,0090 (0,28 - 0,34)	0,34 ± 0,0090 (0,31 - 0,37)	0,31 ± 0,0043 (0,29 - 0,33)	0,35 ± 0,0043 (0,33 - 0,37)
20:1 Gadoleinsyre p=0,282; p=0,002	0,13 ± 0,023 (0,069 - 0,19)	0,14 ± 0,023 (0,075 - 0,20)	0,16 ± 0,0060 (0,079 - 0,19)	0,18 ± 0,0060 (0,17 - 0,19)
22:0 Behensyre p=0,023; p=<0,001	0,32 ± 0,0069 (0,28 - 0,37)	0,29 ± 0,0069 (0,26 - 0,31)	0,30 ± 0,0036 (0,28 - 0,32)	0,29 ± 0,0036 (0,27 - 0,30)
18:3 γ-Linolensyre (GLA)	Ikke påvist	1,09 ± 0,023 (0,93 - 1,22)	Ikke påvist	1,14 ± 0,020 (1,02 - 1,28)
18:3 9c,12c,15t (trans-ALA)	Ikke påvist	0,068 ± 0,0018 (0,055 - 0,081)	Ikke påvist	0,034 ± 0,0016 (0,022 - 0,044)
18:4 Stearidonsyre (SDA)	Ikke påvist	3,94 ± 0,15 (2,77 - 4,91)	Ikke påvist	3,67 ± 0,053 (3,31 - 3,92)
18:4 6c,9c,12c,15t (trans-SDA)	Ikke påvist	0,027 ± 0,0023 (0,011 - 0,036)	Ikke påvist	0,024 ± 0,0015 (0,011 - 0,029)

p¹= feltforsøk i 2006; p²=feltforsøk i 2007

Aminosyrer i soyabønne

I henhold til dokumentasjonen er innholdet av både essensielle og ikke-essensielle aminosyrer analysert. Analysene er gjort i henhold til OECDs konsensusdokument for soya (OECD 2009). Statistiske analyser over lokaliteter i USA viser signifikante forskjeller mellom testlinje og kontroll for leucin, prolin, treonin og valin (p<0,05), samt lysin og serin (p<0,01). Verdiene for samtlige aminosyrer ligger imidlertid innenfor typiske verdier som er rapportert i litteraturen og toleranseintervallene for referansesortene som inngikk i studien.

Tabell 7. Resultater fra statistiske analyser av de enkelte aminosyrer i prøver fra soyalinjen MON 87769 og kontrollinjen A3525. Fra feltforsøk i USA i 2006 og 2007.

Komponenter analysert (g/100 g tørrvekt)	USA 2006 Gjennomsnittsverdi ± SD (Variasjonsområde)		USA 2007 Gjennomsnittsverdi ± SD (Variasjonsområde)	
	Nær-isogen kontroll A3525	MON 87769	Nær-isogen kontroll A3525	MON 87769
Alanin $p^1=0,001$ $p^2=0,183$	1,74 ± 0,0084 (1,68 - 1,81)	1,78 ± 0,0084 (1,76 - 1,84)	1,75 ± 0,015 (1,69 - 1,81)	1,77 ± 0,015 (1,69 - 1,82)
Arginin $p^1=<0,001$ $p^2=<0,001$	2,95 ± 0,056 (2,80 - 3,15)	3,231 ± 0,056 (3,00 - 3,61)	3,39 ± 0,059 (3,18 - 3,65)	3,55 ± 0,059 (3,33 - 3,80)
Asperginsyre $p^1=0,007$ $p^2=0,016$	4,36 ± 0,035 (4,21 - 4,60)	4,54 ± 0,035 (4,41 - 4,73)	4,68 ± 0,045 (4,53 - 4,85)	4,79 ± 0,045 (4,60 - 4,95)
Cystin $p^1=<0,001$ $p^2=0,016$	0,60 ± 0,0098 (0,56 - 0,64)	0,62 ± 0,0098 (0,56 - 0,65)	0,60 ± 0,0048 (0,58 - 0,62)	0,61 ± 0,0048 (0,58 - 0,64)
Glutaminsyre $p^1=<0,001$ $p^2=0,005$	7,29 ± 0,059 (7,03 - 7,71)	7,63 ± 0,059 (7,42 - 7,90)	7,53 ± 0,087 (7,20 - 7,88)	7,74 ± 0,087 (7,41 - 8,02)
Glycinsyre $p^1=0,003$ $p^2=0,021$	1,71 ± 0,0055 (1,70 - 1,73)	1,76 ± 0,0055 (1,76 - 1,77)	1,79 ± 0,015 (1,73 - 1,85)	1,82 ± 0,015 (1,74 - 1,87)
Histidin $p^1=<0,001$ $p^2=0,055$	1,05 ± 0,0073 (1,02 - 1,10)	1,09 ± 0,0073 (1,06 - 1,14)	1,08 ± 0,0087 (1,04 - 1,11)	1,09 ± 0,0087 (1,05 - 1,12)
Isoleucin $p^1=<0,001$ $p^2=0,223$	1,78 ± 0,018 (1,70 - 1,86)	1,87 ± 0,018 (1,75 - 1,97)	1,93 ± 0,022 (1,84 - 2,01)	1,95 ± 0,022 (1,85 - 2,03)
Leucin $p^1=<0,001$ $p^2=0,080$	3,09 ± 0,017 (3,01 - 3,19)	3,19 ± 0,017 (3,13 - 3,32)	3,14 ± 0,030 (3,02 - 3,25)	3,18 ± 0,030 (3,05 - 3,28)
Lysin $p^1=<0,001$ $p^2=0,213$	2,60 ± 0,020 (2,51 - 2,73)	2,67 ± 0,020 (2,61 - 2,75)	2,63 ± 0,021 (2,54 - 2,73)	2,66 ± 0,021 (2,55 - 2,73)
Metionin $p^1=0,038$ $p^2=0,277$	0,58 ± 0,0067 (0,56 - 0,60)	0,60 ± 0,0067 (0,54 - 0,62)	0,58 ± 0,0054 (0,56 - 0,60)	0,59 ± 0,0054 (0,56 - 0,62)
Fenylalanin $p^1=0,002$ $p^2=0,027$	2,06 ± 0,011 (1,99 - 2,15)	2,14 ± 0,011 (2,08 - 2,24)	2,13 ± 0,023 (2,05 - 2,22)	2,17 ± 0,023 (2,10 - 2,26)
Prolin $p^1=<0,010$ $p^2=<0,001$	1,99 ± 0,018 (1,91 - 2,09)	2,09 ± 0,018 (2,03 - 2,24)	2,05 ± 0,022 (1,97 - 2,13)	2,12 ± 0,022 (2,03 - 2,19)
Serin $p^1=0,043$ $p^2=0,136$	2,14 ± 0,016 (2,00 - 2,29)	2,20 ± 0,016 (2,08 - 2,25)	2,03 ± 0,024 (1,84 - 2,18)	2,08 ± 0,024 (1,89 - 2,17)
Treonin $p^1=0,035$ $p^2=0,504$	1,57 ± 0,0095 (1,49 - 1,62)	1,60 ± 0,0095 (1,54 - 1,65)	1,56 ± 0,019 (1,42 - 1,66)	1,58 ± 0,019 (1,42 - 1,66)
Tryptofan $p^1=0,069$ $p^2=0,766$	0,46 ± 0,0064 (0,44 - 0,50)	0,47 ± 0,0064 (0,45 - 0,51)	0,45 ± 0,0076 (0,42 - 0,48)	0,45 ± 0,0076 (0,42 - 0,49)

Tyrosin $p^1=0,013$ $p^2=0,542$	1,34 ± 0,016 (1,26 – 1,44)	1,40 ± 0,016 (1,27 – 1,50)	1,43 ± 0,018 (1,36 – 1,49)	1,44 ± 0,018 (1,29 – 1,51)
Valin $p^1=<0,001$ $p^2=0,216$	1,88 ± 0,019 (1,78 – 1,96)	1,98 ± 0,019 (1,84 – 2,08)	2,04 ± 0,022 (1,95 – 2,14)	2,07 ± 0,022 (1,95 – 2,17)

p^1 = feltforsøk i 2006; p^2 =feltforsøk i 2007

Vitaminer

OECDs konsensusdokument har ikke satt opp vitaminer som komponenter det skal måles for i soya (OECD 2009). Konsensusdokumentet inneholder imidlertid en oversikt der vitaminene folinsyre, vitamin B1, vitamin B2, vitamin E og vitamin K inngår. I OECD dokumentet blir det fremhevet at soyabønne er en god kilde til folinsyre og vitamin K, og at soyaolje en god kilde til vitamin K. Data vedrørende disse vitaminene kommer fra de internasjonale databasene ILSI, USDA Nutrient database og Stuttgart database.

Dokumentasjonen knyttet til foreliggende søknad inneholder kun analyser av vitamin E. Det er funnet signifikante forskjeller mellom testlinje og den nær-isogene kontrollen for dette vitaminet ($p=0,014$) (tabell 8) for feltforsøket i 2007. Verdiene er imidlertid innenfor typiske verdier som er rapportert i litteraturen og toleranseintervallene for referansesortene som inngikk i studien.

Tabell 8. Resultater fra statistiske analyser av vitamin E i prøver fra soyalinjen MON 87769 og kontrollinjen A3525. Fra feltforsøk i USA i 2006 og 2007.

Komponenter analysert (mg/100g tørrvekt)	USA 2006 Gjennomsnittsverdi ± SD (Variasjonsområde)		USA 2007 Gjennomsnittsverdi ± SD (Variasjonsområde)	
	Nær-isogen kontroll A3525	MON 87769	Nær-isogen kontroll A3525	MON 87769
Vitamin E $p^1=0,271$ $p^2=0,014$	1,43 ± 0,26 (0,70 – 2,22)	1,56 ± 0,26 (0,86-2,54)	1,94± 0,085 (1,55 – 2,23)	2,09 (1,55 – 2,35)

p^1 = feltforsøk i 2006; p^2 =feltforsøk i 2007

Mineraler

OECDs konsensusdokument har ikke satt opp mineraler som komponenter det skal måles for i soya (OECD 2009). Konsensusdokumentet inneholder imidlertid en oversikt der mineralene fosfat, jern, kalium, kalsium, kobber, mangan, magnesium, natrium og sink inngår. I OECD- dokumentet blir det fremhevet at soyabønne er en god kilde til mineralene jern, kalsium, kalium og magnesium. Også de øvrige mineralene er listet opp i denne oversikten. Data vedrørende disse mineralene kommer fra de internasjonale databasene ILSI, USDA Nutrient database, NRC (US National Research Council) og Stuttgart (1991).

Søkers dokumentasjon inneholder ingen analyser av mineraler.

Isoflavoner (fytoøstrogener)

Valget av analyseparametere er gjort i henhold til OECDs konsensusdokument for soya (OECD 2009). I henhold til søkers dokumentasjon er det målt for følgende isoflavoner: daidzein, glycitein, og genistein. Kombinerte analyser over forsøkssteder viser signifikante forskjeller for genistein og daidzein ($p<0,05$). Søker har kun beregnet totalmengdene for isoflavongruppene daidzeiner, genisteiner og glyciteiner over steder (tabell 9).

Tabell 9. Resultater fra statistiske analyser av ulike isoflavoner i prøver fra soyalinjen MON 87769 og kontrollinjen A3525. Fra feltforsøk i USA 2006 og 2007.

Komponenter analysert (g/100g tørrvekt)	USA 2006 Gjennomsnittsverdi ± SD (Variasjonsområde)		USA 2007 Gjennomsnittsverdi ± SD (Variasjonsområde)	
	Nær-isogen kontroll A3525	MON 87769	Nær-isogen kontroll A3525	MON 87769
Daidzein $p^1=0,006$ $p^2=<0,001$	1807,36 ± 188,32 (1380,05-2775,08)	1187,81 ± 188,32 (957,23-1838,91)	1477,34 ± 88,68 (1171,88-1821,39)	1030,14 ± 88,68 (781,49-1472,67)
Genistein $p^1=0,007$ $p^2=<0,001$	1136,52 ± 114,81 (770,81-1706,74)	733,64 ± 114,81 (576,70-1118,40)	991,32 ± 46,39 (833,15-1125,95)	684,34 ± 46,39 (574,75-997,05)
Glycitein $p^1=0,004$ $p^2=0,092$	102,18 ± 5,66 (65,51-158,73)	82,73 ± 5,66 (65,37-106,72)	109,81 ± 6,01 (77,61-144,37)	97,17 ± 6,01 (63,23-134,18)

p^1 = feltforsøk i 2006; p^2 =feltforsøk i 2007

Oligosakkarider og antinæringsstoffer

Valget av analyseparametere er gjort i henhold til OECDs konsensusdokument for soya (OECD 2009). Resultater fra vekstsesongen 2007 viser signifikante forskjeller mellom kontroll og MON 87769 for parameteren fytinsyre ($p<0,05$) (tabell 10). Tilsvarende forskjeller ble ikke funnet i 2006. Verdiene for alle parametrene ligger innenfor typiske verdier som er rapportert i litteraturen, og innenfor referansesortene som inngikk i studien.

Tabell 10 Resultater fra statistiske analyser av oligosakkarider og antinæringsstoffer fra soyalinjen MON 87769 og kontrollinjen A3525. Fra feltforsøk i USA 2006 og 2007.

Komponenter analysert	USA 2006 Gjennomsnittsverdi ± SD (Variasjonsområde)		USA 2007 Gjennomsnittsverdi ± SD (Variasjonsområde)	
	Nær-isogen kontroll A3525	MON 87769	Nær-isogen Kontroll A3525	MON 87769
Lectin (H.U./mg t.v.) $p^1=0,836$ $p^2=0,553$	3,73 ± 0,80 (0,71 - 11,32)	3,55 ± 0,80 (0,55 - 8,07)	5,24 ± 0,80 (1,68 - 14,00)	4,63 ± 0,80 (1,81 - 8,30)
Phytic Acid (% t.v.) $p^1=0,357$ $p^2=0,016$	1,02 ± 0,059 (0,75 - 1,26)	1,05 ± 0,059 (0,81 - 1,34)	1,24 ± 0,070 (0,91 - 1,48)	1,37 ± 0,070 (1,12 - 2,00)
Raffinose (% t.v.) $p^1=0,057$ $p^2=0,565$	0,35 ± 0,019 (0,29 - 0,45)	0,37 ± 0,019 (0,32 - 0,45)	0,46 ± 0,024 (0,36 - 0,60)	0,45 ± 0,024 (0,38 - 0,55)
Stachyose (% t.v.) $p^1=0,259$ $p^2=0,723$	2,75 ± 0,11 (2,43 - 3,21)	2,83 ± 0,11 (2,28 - 3,27)	3,19 ± 0,059 (2,92 - 3,64)	3,17 ± 0,059 (2,83 - 3,51)
Trypsin Inhibitor (TIU/mg t.v.) $p^1=0,190$ $p^2=0,746$	31,10 ± 2,81 (21,34 - 41,69)	33,81 ± 2,81 (24,30 - 54,80)	23,03 ± 0,97 (19,36 - 27,68)	22,61 ± 0,97 (18,64 - 25,53)

p^1 = feltforsøk i 2006; p^2 =feltforsøk i 2007

Fosfolipider

I OECDs konsensusdokument for soya er det foreslått at fosfatider, som er en sekkebetegnelse på fosfolipider, bør måles i lecitin. Konsensusdokumentet spesifiserer imidlertid ikke hvilke fosfolipider som bør analyseres. Søker har ikke analysert for innhold av fosfolipider i soyabønner, men utført slike analyser på lecitin (se kap. 3.3).

Søker konkluderer med at MON 87769 er lik umodifisert soya mht næringsstoffer, anti-næringsstoffer, kritiske toksiner og allergener, med unntak for de fettsyrene som blir introdusert av de to desaturase enzymene, dvs. gamma linolensyre (18:3 GLA), 6c,9c12c,15t trans alfa linolensyre (18:3 trans-ALA), stearidonsyre (18:4 SDA) og 6c, 9c, 12c, 15t trans stearidonsyre (18:4 trans-SDA).

3.3 Analyser av 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 full-fettet mel blir benyttet som næringsmiddel. De ulike proteinfraksjonene fra avfettet soyamel blir brukt i forskjellige matvarer for mennesker, mens soyaolje hovedsakelig benyttes som matolje.

I dokumentasjonen fra Monsanto er det presentert data fra prosesserte produkter. Soyabønnene som ble benyttet i analysene kommer fra forsøksfelter i USA vekstsesongen 2006. Den nær-isogene kontrollinjen (A3525) og åtte konvensjonelle referansesorter ble benyttet som umodifisert kontroll i forsøkene. Hvert av forsøksfeltene bestod av et fullstendig randomisert blokkdesign med tre gjentak. Soyabønnene ble prosessert hos GLP Technologies (Navasota, Texas), og rostet, avfettet mel, raffinert olje, proteinisolat og lecitin ble analysert av Covance Laboratories Inc. (Madison, Wisconsin).

Analyser av soyabønne

Det er foretatt analyser av vann, protein, fett, aske, karbohydrater, ADF, NDF, aminosyrer, fettsyrer (C8-C24), vitamin E, lektin, isoflavoner (daidzein, genistein, glycitein), raffinose, staktyose, fytinsyre og trypsinhemmer i soyabønne. Det ble funnet signifikante forskjeller mellom testlinje og kontroll for komponenter som alanin, arginin, tryptofan, NDF, karbohydrat, fett, palmitinsyre, stearinsyre, daidzein og genistein ($p < 0,05$). Verdiene ligger imidlertid innenfor typiske verdier som er rapportert i litteraturen og toleranseintervallene som er målt med grunnlag i referansesortene som inngikk i studien.

Analyser av rostet, avfettet soyamel

Dokumentasjonen fra søker inkluderer analyser av vann, protein, fett, aske, karbohydrater, ADF, NDF, aminosyrer, fettsyrer (C8-C24), fytinsyre og trypsinhemmer av rostet, avfettet mel. For enkelte komponenter som asperginsyre, glutaminsyre, histidin, tryptofan, ADF, karbohydrat, palmitinsyre, oljesyre, linolsyre og linolensyre ble det funnet signifikante forskjeller mellom linjene ($p < 0,05$). Verdiene ligger imidlertid innenfor typiske verdier som er rapportert i litteraturen og toleranseintervallene som er målt med grunnlag i referansesortene som inngikk i studien.

Analyser av proteinisolat og proteinkonsentrat

Når det gjelder proteinisolat og proteinkonsentrat er innholdet av vann, fettsyrer (C8-C24) og aminosyrer målt. Det ble funnet statistisk signifikante forskjeller for noen av komponentene. Verdiene er imidlertid innenfor typiske verdier som er rapportert i litteraturen og referansesortene som inngikk i studien.

Analyser av lecitin

Når det gjelder lecitin er innholdet av fosfatider og fettsyrer (C8-C24) målt. Følgende fosfatider er målt: α -fosfatidsyre, α -fosfatidyl-kolin, α -fosfatidyl-etanolamin, og α -fosfatidylinositol. Det er funnet statistisk signifikante forskjeller for noen av komponentene. Verdiene er imidlertid innenfor typiske verdier som er rapportert i litteraturen og referansesortene som inngikk i studien.

Analyser av soyaolje

I henhold til søkers dokumentasjon er fettsyreinholdet i soyaolje målt i henhold til OECDs konsensusdokument for soya (OECD 2009). I henhold til konsensusdokumentet er soyaolje en god kilde til vitamin K.

OECD anbefaler følgende fettsyrer analysert: palmitinsyre (C16:0), stearinsyre (C18:0), oljesyre (C18:1), linoljesyre (C18:2), linolensyre (C18:3) og arakidonsyre (C20:0). Det ble analysert for innhold av fettsyrer fra C8 t.o.m. C24, og for vitamin E. Mengde av myristinsyre(C14:0) var lavere enn påvisningsgrensen i alle undersøkte prøver. Resultater fra forsøkene viser signifikante forskjeller for enkelte fettsyrer. Med unntak for olje-, linol- og linolensyre, er imidlertid forskjellene små og innenfor toleranseintervallene som ble målt med grunnlag i referansesortene som inngikk i studien. Verdiene ligger også innenfor typiske verdier som er rapportert i litteraturen. Det er også målt for innhold av γ -linolen-, trans stearidon- og trans α -linolensyre (tabell 11). Med unntak for trans α -linolensyre, er de øvrige fettsyrene ikke påvist i olje fra kontrollinjen A3525 (tabell 11).

Tabell 11. Resultater fra analyser av enkelte fettsyrer i prøver av soyaolje.

Fettsyre (% av totalt fettsyreinhold)	MON 87769 Gjennomsnitt (SD)	MON 87769 Variasjonsområde	Kontroll A3525	p-verdi
18:4 stearidon- syre (SDA)	22,62 (3,08)	16,88-28,35	ikke påvist	
18:3 γ -linolensyre (GLA)	6,68 (0,26)	6,19-7,19	ikke påvist	
18:4 6c,9c,12c,15t (Trans SDA)	0,26 (0,052)	0,17-0,39	ikke påvist	
18:3 9c, 12c, 15t (trans-ALA)	0,51 (0,020)	0,47-0,54	0,14 (0,10-0,16)	0,035

3.4 Agronomiske egenskaper

I dokumentasjonen fra søker er det presentert data fra registreringer av fenotypiske og agronomiske karakterer, samt samspill med en rekke miljøfaktorer. Registreringene er foretatt over to vekstsesonger på til sammen 21 lokaliteter i USA (17 lokaliteter i 2006 og 4 lokaliteter i 2007). Den konvensjonelle soyalinjen A3525, med tilsvarende genetisk bakgrunn som testlinjen men som ikke uttrykker Pj Δ 6D- og Nc Δ 15D-protein, ble benyttet som umodifisert kontroll i forsøkene. I tillegg var det inkludert henholdsvis 18 og 12 umodifiserte, kommersielle soyasorter som referansesorter i forsøkene i hver av forsøksårene. Testlinje, komparator og referansesorter ble plantet i fullstendig randomiserte blokkdesign med tre gjentak på hver lokalitet. Søker viser til at dyrkingsregimet var i henhold til vanlig praksis i den enkelte region der forsøkene var lokaliserte.

I henhold til søkers dokumentasjon ble totalt 14 fenotypiske karakterer vurdert (tabell 12 og 13). Dette inkluderte parametre som frøkvile, vitalitet hos frøplanten, plantetetthet (vår & høst), plantehøyde, legde, tidlighet (målt som antall dager til 50 % blomstring), frøstørrelse og frøavling. I tillegg ble det gjort observasjoner av pollenvitalitet og –morfologi, og karakterer knyttet til resistens mot ulike biotiske (sjukdommer, skadedyr) og abiotiske stressfaktorer.

Det er det foretatt statistiske analyser over lokaliteter for hver av de fenotypiske karakterene. Det er også kjørt statistiske analyser innen hvert av forsøksstedene. 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.

Resultatene fra variansanalysen over forsøksfelt viser ingen signifikante forskjeller mellom MON 87769 og nær-isogen kontroll for noen av de for observerte variablene vekstsesongen 2006 eller 2007 (tabell 12 og 13). Analyser innen lokaliteter viste signifikante forskjeller for 22 av 165 sammenligninger i 2006, og en av 39 sammenligninger i 2007. Det konkluderes derfor med at de introduserte genene ikke har effekter andre fenotypiske og agronomiske karakterer hos den transgene linjen.

I henhold til søker ble det gjort kvalitative vurderinger av en rekke karakterer knyttet til abiotisk stress, samt resistens mot sjukdoms og skadedyr (artropoder) fire ganger i løpet av vekstsesongen (skala 0-9). I tillegg ble forekomst av artropoder på forsøksfeltene registrert (både skade- og nyttedyr). Valg av skadegjørere og øvrige parametere ble valgt ut fra relevans i den enkelte region i den aktuelle dyrkingsperioden. Med unntak av en variabel på en lokalitet, ble det ikke påvist signifikante forskjeller mellom testlinje og kontroll med hensyn på toleranse for ulike abiotiske stressfaktorer som kulde, frost, tørke, vind, næringsmangel etc. (totalt 162 sammenligninger). Undersøkelser av insekts- og sjukdomsresistens viste, med unntak av en observasjon av "frog-eye leaf spot" på en lokalitet, ingen signifikante forskjeller mellom linjene for noen av karakterene som ble observerte.

Tabell 12. Resultater fra variansanalyse over steder for fenotypiske og agronomiske karakterer for testlinjen MON 87769, nær-isogen kontroll, samt kommersielle referansesorter. Fra feltforsøk i USA vekstsesongen 2006.

Fenotypiske karakterer	MON 87769		Kontroll		Test-kontroll	Referansesorter		
	Gj. snitt	SE	Gj. snitt	SE	p-verdi	Gj. min.	Gj. snitt	Gj. maks.
Plantetetthet-vår (V2-V4) (#/rute)	217	8,1	219,7	9,1	0,5794	150,5	230,0	298,6
Frøplantevitalitet (V2-V4) (1-9)	3,2	0,2	3,1	0,2	0,4596	2,3	3,1	5
Tidlighet (R1-R2) (antall dager til 50 % blomstring)	195,4	1,1	195,6	1,1	0,4658	184,7	196,8	206,5
Plantehøyde (R8) (cm)	91,9	91,9	91,7	91,7	0,9486	77,2	91,2	111,5
Legde (R8) (0-9)	1,1	0,2	1,3	0,2	0,4015	0	1,4	4,3
Tap av knopper (R8) (0-9)	0,3	0,1	0,3	0,1	0,4981	0	0,2	1,5
Plantetetthet – høst (R8) (#/rute)	199,6	8	203,4	8,2	0,2446	154,3	214,3	271,3
Vanninnhold frø (%)	12,2	0,3	12,2	0,3	0,7148	11	12,5	16
100-frøvekt (g)	15,1	0,2	15,4	0,2	0,9528	14	16,1	18
Testvekt (kg/l)	0,73	0,01	0,72	0,01	0,1280	0,64	0,72	0,74
Avling (kg/ha)	3 308	107	3 496	119	0,1332	1 808	3 302	4 199

[†]*: p<0,05

Tabell 13. Resultater fra variansanalyse over steder for fenotypiske og agronomiske karakterer for testlinjen MON 87769, nær-isogen kontroll, samt kommersielle referansesorter. Fra feltforsøk i USA vekstsesongen 2007.

Fenotypiske karakterer	MON 87769		Kontroll		Test-kontroll p-verdi	Referansesorter		
	Gj. snitt	SE	Gj. snitt	SE		Gj, min.	Gj. snitt	Gj. maks.
Plantetetthet-vår (V2-V4) (#/rute)	357,8	28,1	354,2	31,6	0,8645	180,0	346,1	492,7
Frøplantevitalitet (V2-V4) (1-9)	2,8	0,4	2,5	0,3	0,3824	1,0	2,8	6,0
Tidlighet (R1-R2) (antall dager til 50 % blomstring)	205,4	1,5	205,3	1,5	0,8378	201,5	206,2	211,7
Plantehøyde (R8) (cm)	97,0	6,0	99,8	4,0	0,5798	77,7	98,2	125,4
Legde (R8) (0-9)	1,7	0,6	1,8	0,6	0,5535	0,0	1,1	3,7
Tap av knopper (R8) (0-9)	0,2	0,1	0,0	0,0	0,2945	0,0	0,1	0,3
Plantetetthet – høst (R8) (#/rute)	331,6	21,8	339,6	21,3	0,7876	158,7	322,8	455,7
Vanninnhold frø (%)	11,8	0,3	11,7	0,3	0,3175	10,6	11,5	12,2
100-frøvekt (g)	17,3	0,9	17,0	0,8	0,6153	13,9	16,8	20,0
Testvekt (kg/l)	0,70	0,01	0,70	0,01	0,7459	0,66	0,70	0,73
Avling (kg/ha)	2 913	100	3 164	126	0,2989	2 454	2 856	3 358

[†] p<0,05

3.5 Vurdering basert på foreløpig datagrunnlag

Analysene av ernæringsmessige komponenter viser signifikante forskjeller mellom soyalinjen MON 87769 og umodifisert kontroll i enkeltparametre. Forskjellene er imidlertid ikke konsistente over forsøkssteder. Verdiene for de analyserte komponentene ligger også innenfor typiske verdier for andre soyasorter som er rapportert i litteraturen, og innenfor variasjonsområdene for kommersielle referansesorter som inngår i søkers dokumentasjon. Faggruppen anser at analysene av sentrale ernæringskomponenter er tilstrekkelige for en vurdering av soyalinjen til bruk som mat og fôr, og konkluderer med at forskjellene som er påvist ikke har ernæringsmessig betydning.

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

Feltforsøk over to vekstsesonger i USA viser ingen signifikante forskjeller mellom MON 87769 og umodifisert kontroll med hensyn på andre fenotypiske og agronomiske karakterer.

4 Dokumentasjon av toksisitet, allergenisitet og næringsverdi

4.1 Toksisitet

Akuttoral toksisitetsstudie på mus ved eksponering av renfremstilt PjΔ6D- og NcΔ15D - protein

Monsanto har utført akutt-toksisk studie på mus med oral eksponering av PjΔ6D- og NcΔ15D-protein, produsert fra soya MON 87769. Proteinene ble isolert fra umodne soyabønner, som har høyere konsentrasjon av disse proteinene sammenlignet med modne bønner. Etter opprensing var konsentrasjonene av PjΔ6D- og NcΔ15D-protein henholdsvis 0,52 mg/ml (renhet 49 %) og 0,62 mg/ml (renhet 74 %). Proteinløsningene ble oppbevart ved minus 80 °C. Forsøkene er utført i henhold til god laboratoriepraksis (GLP) (EPA 40 CFR Part 160, OECD ENV/MC/CHEM(98)17, JMAFF 11 Nousan No. 6283).

Musene, stamme Crl:CD-1, ble akklimatisert i 8 dager før de ble benyttet i toksstudiene. Ved starten av forsøket var hannmusene ca. 8 uker og veide fra 28,5 til 33,8 gram, mens hunnmusene var om lag 10 uker og veide fra 23,1 til 29,5 gram. Tre grupper á 10 hunner og 10 hanner, ble eksponert for henholdsvis PjΔ6D-, NcΔ15D og bovint serumalbumin (BSA). Proteinene var løst i buffer, og musene ble føret ved sondeføring. Proteindosen var 44 mg BSA-, 4,7 mg PjΔ6D- og 37,3 mg NcΔ15D per kg kroppsvekt. I henhold til søker representerer PjΔ6D- og NcΔ15D-proteindosene ca. 100 ganger større mengde enn det mennesker vil bli eksponert for i en normal ernæringsmessig situasjon. Innholdet i bufferen er dokumentert i dokumentet MSL21314, 2008. MSL21314 er et konfidensielt dokument, og komponentene som bufferen består av kan derfor ikke gjengis her, men er vurdert av FG3.

Forsøksdyrene ble fastet 2- 3 timer før de ble eksponert for proteinene. Alle dyrene ble observert for kliniske tegn på forgiftning over en periode på 15 dager. Observasjoner mht. generell helse og mortalitet ble foretatt to ganger daglig, mens kliniske observasjoner ble utført to ganger første dag, og en gang deretter. Veiing av dyrene ble utført rett før dosering (dag 0), dag 7 og 14. Dyrene ble avlivet med karbondioksidgass.

Følgende parametre ble vurdert: unormal adferd ved handling, pels, skinn, holdning (posture), spyttavsondring, respirasjon, aktivitet/våkeperiode (arousal level), kramper, skjelving, unormale bevegelser, unormalt ganglag (gait abnormalities), tåreflyt, palpebral closure, exophthalmus, vurdering av avføring og urin, pupillestørrelse. Ved avslutning av forsøket ble alle dyrene avlivet, og bukhole, toraks, samt en rekke organer og vev ble undersøkt makroskopisk. Det ble ikke påvist økt mortalitet eller toksiske effekter på dyrene som ble eksponert for PjΔ6D- og NcΔ15D-protein. NOAEL ble satt til 4,7 mg PjΔ6D- og 37 mg og NcΔ15D protein/kg kroppsvekt for CD-1 hann- og hunnmus.

Kommentarer fra faggruppen:

Når det gjelder dosering har søker bare benyttet en enkelt dose av hvert protein. Dette er ikke i samsvar med OECD Guideline 401/423, som enten krever 3 doser eller en enkeltdose på 2000 mg/kg kroppsvekt ved bruk av "limited test". Den beregnede NOAEL for disse to proteinene, PjΔ6D og NcΔ15D, er satt til henholdsvis 4,7 og 37,3 mg/kg kroppsvekt. For å kunne sette en NOAEL må det

minst være en dose man kan se effekt på. Det er ikke praksis å sette et NOAEL- nivå etter en akutt test så fremt man har andre tester som kan gi en slik verdi. Dette er en test for å finne LD50.

Føringsforsøk på rotter - 14 dager

Det er ikke utført 14 dagers føringsforsøk på gnagere med PjΔ6D- og NcΔ15D-protein.

Føringsforsøk på broiler

Søknaden inneholder dokumentasjon fra et 42-dagers føringsforsøk på Ross x Ross 308 broilere. Det ble benyttet totalt 800 dyr. Forsøkene er utført i henhold til god laboratoriepraksis (GLP) (EPA 21 CFR Part 58 og 40 CFR Part 160). Testen ble utført av Colorado Quality Research Inc, Wellington, USA.

Soyabønner som ble benyttet i dette forsøket kommer fra feltforsøket i Warren og Clinton Counties, Illinois, vekstsesongen 2007. Broilerne ble føret med avfettet og prosessert mel fra MON 87769, kontrollinjen A3525, samt 6 umodifiserte kommersielle sorter. Broilerne ble fordelt på 8 grupper med 100 broilere per gruppe, halvparten av hvert kjønn. Broilerne ble fordelt etter et fullstendig randomiserte blokkdesign med fem blokker á 8 bur med hunner og fem blokker á 8 bur med hanner. Fôrene ble anonymisert ved at de ble tildelt forskjellige nummer for hvert bur i henhold til et fullstendig randomiserte blokkdesign. Broilerne var syv dager ved starten av føringsforsøket. Soyamelet ble undersøkt for mykotoksiner og pesticider. I henhold til dokumentasjonen ble det ikke påvist mykotoksiner, organofosfater, organonitrogener, organoklorider eller metylkarbamater. Fôrene ble også undersøkt for innhold av mineraler, protein, fett, fettsyrer, aminosyrer, antinæringsstoffer m.m.

I tidlig vekstfase (0-21 dager) var andelen soyamel i fôret ca. 35 %, i mellomvekstfasen og avslutningsfasen (21-42 dager) ca. 31 %. Følgende parametre ble undersøkt: mortalitet, vektøkning og føreffektivitet. Skrott, bryst, lår, leggmuskel, vinger, og abdominalt fett ble målt både som gjennomsnittlig vekt og som % av kroppsvekt til avkjølte, avlivede broilere. Ved føring med MON 87769 ble det påvist signifikante forskjeller mellom testlinjen og A3525 med hensyn på variablene "vekt av fettpute mht. vekt per broiler" (kg/broiler) ($p=0,0357$). Det ble også påvist signifikante forskjeller mellom testlinjen og A3525 med hensyn på variablene "vekt av fettpute mht. vekt per broiler" utregnet i % per levende vekt ($p=0,0602$). Tilsvarende forskjeller ble funnet mellom testlinjen og de seks umodifiserte kontrollene. Det ble videre påvist forskjeller mellom gruppene mht vekt av vinge som % avkjølt skrottvekt, 10,9 % for MON 87769 versus 10,6 % for A3525 og de seks umodifiserte kontrollene. Det ble ellers ikke funnet andre signifikante endringer ved føring med soyamel fra MON 87769 sammenlignet med A3525 og de umodifiserte kontrollene. Søker hevder at forskjellene som ble påvist er små og ikke biologisk relevante.

Kommentarer fra faggruppen:

Det hevdes i studien at det er påvist signifikante forskjeller mellom testlinjen og A3525 med hensyn på variablene "vekt av fettputer mht vekt pr broiler" utregnet i % levende vekt med en p-verdi er 0,0602. Dette er en borderline signifikans og angitt med alt for høy spesifisitet.

Føringsforsøk på rotter

Monsanto har utført 13 ukers toksisitetstest på gnagere med fôr som inneholder mel fra MON 87769. Føringsforsøket ble utført med hann- og hunnrotter (stamme CrI:CD(SD)), 3 grupper á 20 rotter/kjønn. Tosisitetstesten ble utført i henhold til prinsippene til OECD guideline reference 408 (1998): Repeated dose 90 day oral toxicity study in rodents, samt OECDs Good Laboratory Practices og U.S. EPA FIFRA (40 CFR part 160) Good Laboratory Practice Standards (GLP).

Rottene ble akklimatiserte i 14 dager før føringsforsøket, og var 6 uker gamle ved starten av forsøket. Vekt ble oppgitt til henholdsvis 181 til 230 g for hanner og 139 til 176 g for hunner. Dyrene ble individuelt merket med nummer på halen. Fôret bestod av 5 % og 15 % vekt/vekt soyamel fra MON 87769 og 15 % nær-isogen soya A3525. Fôret, som bestod av 5 % MON 87769, ble supplert med 10 % mel fra A3525. Fôret ble undersøkt for en rekke komponenter, eksempelvis tungmetaller,

aflatoksiner, pesticider, ernæringsstoffer og antinæringsstoffer. Analysene er utført av Monsanto og Covance Laboratories.

Observasjoner mht. generell helse og mortalitet ble foretatt to ganger daglig, kliniske observasjoner ble utført en gang per dag, og detaljerte fysikalsk undersøkelse ble utført ukentlig. Kroppsvekt og fôrinntak ble målt på alle dyrene en gang per uke. Gjennomsnittlig daglig inntak ved innblanding med 15 % mel fra MON 87769 var 10,9 mg/kg kroppsvekt og 12,6 mg/kg kroppsvekt for henholdsvis hann- og hunndyr.

Det ble utført detaljerte kliniske undersøkelser, målinger av fôrinntak, makroskopiske og mikroskopiske undersøkelser av organene, samt klinisk patologisk undersøkelser av urin og blod fra 10 dyr i hver gruppe. De statistiske analysene ble utført ved bruk av to-veis variansanalyse for majoriteten av de undersøkte variablene (minimum signifikansnivå på 5 % og 1 %). En-veis variansanalyse (ANOVA) ble utført på parametrene kroppsvekt, kumulativ kroppsvektendringer, fôrkonsum, klinisk patologi og organvekter.

Det ble ikke påvist signifikante endringer i de undersøkte parametrene. En hunnrotte som ble fôret med 5 % mel fra MON 87769 ble imidlertid funnet død på forsøksdag 60. Etter kliniske og mikroskopisk undersøkelser av utvalgte vev ble det konstatert at dødsfallet ikke skyldes fôret. Sammenlignet med kontrollgruppen ble det påvist signifikant økt inntak av fôr for hanner i fôrgruppen 15 % mel fra MON 87769. Økningen ble påvist i uke 3 til 4, 4 til 5, 9 til 10 og 10 til 11. Økningene var sporadiske, økt fôrinntak av mel som inneholder MON87769 ble ikke påvist hos hunnrotter. I henhold til søker er økningen av vekt ikke relatert til fôr som inneholder MON 87769. Økt mengde urobilinogen ble påvist hos hunnrotter i fôrgruppen som fikk 5 % mel fra MON87769, men det ble ikke påvist signifikante forskjeller mellom kontroll og 15 %-fôrgruppen. For de øvrige parametre som ble undersøkt ble det ikke påvist signifikante forskjeller. Søker betrakter de påviste forskjellene som ikke toksikologisk relevante. Dette fordi forskjellene kun ble påvist i enkelte fôrgrupper (forskjellig fôrgruppe for hann- og hunndyr), samt at de signifikante forskjellene som ble påvist ligger innenfor WIL Research Laboratories historiske data, som omfatter fra 560 til 685 rotter.

Kommentarer fra faggruppen:

Testen er utført ifølge OECD guideline 408 sin beskrivelse av 90 dagers oral toksisitetstest på rotter. I følge OECD guideline 408 skal testen utføres med 3 dosenivåer. Søker har valgt å benytte 2 doser fôr med henholdsvis 5 og 15 % MON 87769 og en dose 15 % nær isogen soya A3525. Det ble ikke angitt en NOAEL ut fra dette forsøket, som er hensikten med slike forsøk.

Toksikologiske tester utført med stearidonsyre (SDA).

Monsanto har utført en 28 dagers sondefôringsstudie på rotter, 90 dagers fôringsforsøk på rotter og en en-generasjons reproduksjonsstudie på rotter med soyaolje som inneholder stearidonsyre (SDA). Mengde SDA-soyaolje som ble dosert til rottene i disse forsøkene var 0,3 g, 1 g og 3 g per kg kroppsvekt per dag for 28-dagers sondefôringsstudien, og 1,5 g og 4 g per kg kroppsvekt per dag for 90-dagers studien. Kontrollene ble fôret med olje fra umodifisert soya både i 28-dagers og 90-dagers forsøk. I 90- dagers fôringsforsøk ble også 4 g menhadenolje per kg kroppsvekt per dag benyttet som kontroll. Den høyeste dosen som ble benyttet i studiene var 4 g SDA-soyaolje/kg kroppsvekt/dag, dvs. ca. 1 g SDA/kg kroppsvekt/dag. Det benyttet 10 rotter per kjønn i 28-dagers fôringsforsøk. I 90 dagers – og reproduksjonsstudien er det benyttet 25 hannrotter og 45 hunnrotter. Etter 70 dager av fôringsstudien ble 25 hunnrotter paret. Hunnrotter som ikke ble paret og rotter som ikke var drektige ble avlivet etter 25 dager. Drektige rotter og ungene ble avlivet 21 dager etter at ungene ble født.

Studiene er publiserte i tidsskriftet *Regulatory Toxicology and Pharmacology* i 2008 (Hammond *et al* (2008) Safety assessment of SDA soybean oil: Results of a 28-day gavage study and a 90-day/one generation reproduction feeding study in rats. Vol. 52, p. 311-323.) Hammond *et al.* konkluderer med at det ikke påvist testrelaterte helseskade hos rotter fôret med stearidonsyre. Det ble heller ikke påvist helseskader på avkom.

Kommentarer fra faggruppen:

I 28 dagers forsøket har søker benyttet 3 testgrupper, mens det ble benyttet kun 2 doser (1,5 g /kg kroppsvekt/dag og 4 g/kg kroppsvekt/dag) i 90 dagers studien. Kontrollgruppen ble gitt olje fra umodifisert soya, samt menhadenolje.

Med bakgrunn i 28 dagers studien ble det satt en NOAEL > 3 g/kg kroppsvekt/dag for soyaolje og en NOAEL for SDA på >600 mg/kg kroppsvekt/dag. Resultater fra 90 dagers studien viste en NOAEL for soyaolje på 4 g/kg kroppsvekt/dag og NOAEL > 1000 mg/kg kroppsvekt/dag for SDA.

Faggruppen konkluderer med at det ikke er påvist testsubstansrelaterte effekter verken for 28 dagers eller 90 dagers studien.

4.2 Allergenitet

PjΔ6D- og NcΔ15D- protein

Med enkelte unntak, er proteiner som er matallergener generelt varme- og syrestabile. Proteinene er stabile både overfor mage- og tarmsafer, og er ofte hovedprotein-komponenter i matvarer. Typiske mengder er fra 1 til 80 % av proteininnholdet. PjΔ6D- og NcΔ15D-proteinet som er benyttet i undersøkelsene for allergenitet er produsert fra MON 87769. I henhold til søker inneholder *Primula juliae* hvor PjΔ6D proteinet stammer fra og *Neurospora crossa* hvor NcΔ15D-proteinet kommer fra, ikke proteiner som fører til allergiske reaksjoner hos mennesker.

PjΔ6D og NcΔ15D proteinene er testet i simulert mage (SGF)- og tarmsaft (SIF). SGF- og SIF-testene er dokumentert i MON 87769-dossieret. Mengde av proteinene ble målt med SDS-PAGE-analyse og fargestoffet Brilliant Blue, samt med Westernblot.

Påvisningsgrensen for PjΔ6D-proteinet med fargestoffet Brilliant Blue G på SDS-PAGE gel er 0,005 µg (= 5 ng). Påvisningsgrensen med antistoff mot PjΔ6D-proteinet og Westernblot er 0,5 ng. Mengde PjΔ6D-protein i SGF- og SIF-analysene var henholdsvis 309 µg og 156 µg ved starten av forsøkene. Nedbrytning av planteproduert PjΔ6D-protein i SGF(pH 2) er hurtig, og 96 % av PjΔ6D-protein ble degradert i løpet av 30 sekunder. Et fragment på ca. 10 kDa ble påvist ved 30 sekund-tidspunktet. Dette fragmentet ble fullstendig degradert etter 2 min i SIF(pH 7,5). PjΔ6D-proteinet ble også undersøkt i SIF uten behandling med SGF først. PjΔ6D-proteinet ble fragmentert innen 5 minutter i SIF.

Påvisningsgrensen for NcΔ15D-proteinet med fargestoffet Brilliant Blue G på SDS-PAGE gel er 0,02 µg (= 20 ng). Påvisningsgrensen med antistoff mot NcΔ15D-proteinet og Westernblot er 0,5 ng. Mengde NcΔ15D-protein i SGF- og SIF-analysene var henholdsvis 310 µg og 186 µg ved starten av forsøkene. I SGF(pH 2) degraderes planteproduert NcΔ15D-protein, hurtig, og mer enn 97 % av NcΔ15D-protein ble degradert i løpet av 30 sekunder. Flere fragmenter som ble observert, var i varierende grad stabile fra 30 s til 60 min. Fragmenter på ca. 17 – og 12 kDa ble påvist etter henholdsvis 5 min og 10 min, og to andre fragmenter på 5 kDa og 4 kDa som ble observert var stabile i henholdsvis 60 min og 20 min. Undersøkelser ved bruk av Westernblot og antistoff mot NcΔ15D, viste at mer enn 96 % av NcΔ15D-proteinet ble brutt ned i løpet av 30 sekund. De to fragmentene på ca. 17 kDa og 12 kDa som ble påvist på Brilliant Blue G, er proteolytiske nedbrytningsprodukter av NcΔ15D-proteinet. Fragmentene på 5 kDa og 4 kDa ble ikke påvist med Westernblot og antistoff mot NcΔ15D-proteinet. Dette indikerer at enten så har det spesifikke antistoffet mot NcΔ15D-proteinet ikke påvist disse fragmentene, eller så er disse fragmentene ikke deler av NcΔ15D-proteinet. Undersøkelse av NcΔ15D-proteinet med SGF etterfulgt av undersøkelser med SIF, viser at fragmentene på 17 kDa og 12 kDa er degradert i løpet av 30 sekund. Fire kDa og 5 kDa ble fullstendig degradert etter henholdsvis 2 min og 5 min i SIF. Søker har foretatt N-terminal aminosyresekvensering av 4 kDa og 5 kDa fragmentene, og sekvenseringen viser at sekvensene i 4 kDa fragmentet er en del

av Nc Δ 15D-proteinet, mens 5 kDa fragmentet ikke har aminosyresekvenser som ligner Nc Δ 15D-proteinet.

Søker hevder med grunnlag i disse testene at siden proteinene og proteinfragmentene brytes raskt ned i menneskets mage- og tarmkanal, er de sannsynligvis ikke skadelige for mennesker.

På bakgrunn av at det ikke ble funnet sekvenshomologi til allergene proteiner, at det ikke er påvist glykosyleringssteder på planteproduert Pj Δ 6D- og Nc Δ 15D-protein, samt at mengden av Pj Δ 6D- og Nc Δ 15D-protein i bønner fra MON 87769 er målt til henholdsvis ca. 0,00056 % og 0,00221 % av totalt proteininnhold, konkluderer søker med at det er lite sannsynlig at Pj Δ 6D- og Nc Δ 15D-proteinene vil utgjøre et allergent potensiale for mennesker.

Analyser av allergener fra soya.

Soyabønner inneholder ca. 16 proteiner som binder IgE (L'Hocine & Boye 2007), og disse betraktes som potensielle allergener. OECDs konsensusdokument gir ingen anbefalinger med hensyn på analyser av mulige allergene proteiner i soya.

Spesifikk serumscreening:

For å evaluere om MON87769 har fått endret innhold allergener i forhold til kontrollsoya, har søker foretatt spesifikk *in vitro* serumscreening med sera fra 16 personer med soyaproteinallergi, og sera fra 6 personer uten soyaproteinallergi (kontroll). Vannekstrakter fra soyalinjene ble analysert ved hjelp av enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Det ble undersøkt på ekstrakter fra MON 87769, A3525 og 26 kommersielle soyalinjer. Sera fra soyaallergikere og kontroll viste ingen forskjeller i reaktivitet mot ekstrakter fra soyaplantene.

For om mulig å påvise endret sammensetning av allergene proteiner i MON87769 ble det også foretatt gelelektroforetiske undersøkelser av soyaekstrakter fra MON 87769, A3525 og en umodifisert kommersiell soya. Det ble utført både en-(1D) og todimensjonal (2D) SDS-gelelektroforese av ekstraktene, etterfulgt av Western-blot av gelene. Sera fra fem soyaallergikere med størst immunreaksjon mot vannekstrakt fra MON 87769, ble slått sammen. Det samme ble gjort med sera fra ikke-allergikere. Sera som er slått sammen fra flere personer ble benyttet på Westernblot fra 1D-elektroforese, mens serum fra en person ble benyttet på Westernblot fra 2D-elektroforese. Det ble ikke påvist forskjeller mellom blottene fra MON 87769, A3525 og umodifiserte, kommersielle soyalinjer. I henhold til søker viser disse undersøkelsene at induksjon av Pj Δ 6D- og Nc Δ 15D-proteinene i soya fører ikke til kvalitative og kvantitative endringer av endogene allergene proteiner i MON 87769.

Kommentarer fra faggruppen:

Søker har benyttet sekvenshomologi i henhold til retningslinjer fra Codex for å sjekke om det er kjente allergene sekvenser i proteinene. Søker har også mottatt serumprøver som bare er testet på Westernblot, men ingen Patch (sensibiliserings)-tester er benyttet. Det er heller ikke benyttet OECD guideline 406 tester på marsvin eller mus.

Ut fra de opplysninger som foreligger konkluderer faggruppen med at det er høyst usannsynlig at matvarer fra den transgene soyalinjen MON 87769 vil føre til økt allergisitet hos mennesker sammenlignet med umodifisert soya.

4.3 Ernæringsmessig vurdering av den genmodifiserte soyalinjen MON 87769 til bruk som mat og fôr

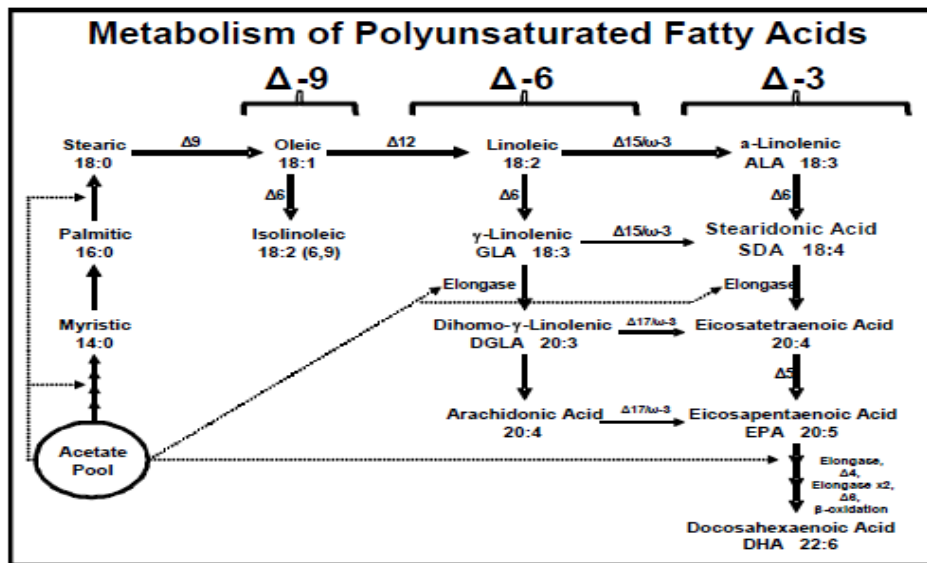
Helserisikovurdering av næringsmidler og næringsmiddelingsredienser

Det første trinnet i en helserisikovurdering av næringsmidler og næringsmiddelingsredienser som består av eller inneholder genmodifiserte organismer er å fastslå om næringsmiddelet/næringsmiddelingsrediensen skiller seg fra en sammenlignbar tradisjonell vare i vesentlig grad ("substantial equivalent"). Selve sammenligningen av den nye maten med det tradisjonelle er ingen helsemessig vurdering av maten eller matvaren, men et innledende trinn for å avgjøre om videre helsemessig vurdering er nødvendig (NOU 2000). Utredningen inneholder også norske retningslinjer for helserisiko av ny mat fra genmodifiserte organismer.

Soya MON 87769 og soyaolje fra MON 87769 er i utgangspunktet ikke vesentlig lik isogen linje eller soyaolje fra isogen linje. Mens relative enkle endringer i en plante har blitt utført, vil endringer i for eksempel fettsyreprofilen muligens kreve nye testmetoder. En arbeidsgruppe under International Life Science Institute (ILSI) kom med en serie av anbefalinger om hvordan vurdering av disse typer produkter med ernæringsmessige endringer bør utføres. Anbefalingene er bl.a. komparative undersøkelser av ernæringsmessige relatert komponenter, fenotypiske og agronomiske egenskaper, vurdering av mattrygghet og potensielle næringsmessige innvirkninger/endringer av det nye næringsmiddelet på det generelle næringsinntaket i befolkningen m.m. (Chassy et al 2005, ILSI 2008).

Vurdering vedrørende endring av fettsyreprofil

Essensielle fettsyrer er fettsyrer som må tilføres kosten fordi kroppen ikke kan danne dem. Linolsyre og alfa-linolensyre (α -linolensyre, ALA) er de eneste essensielle fettsyrer for menneske. Linolsyre er en C18:2-fettsyre, dvs. den inneholder 18 karbonatomer og har 2 dobbeltbindinger, den første etter 6:e karbonatomet. Linolsyre forkortes ofte til LA, C18:2 (n-6). n-6 er det samme som betegnelsen omega-6. Alfa-linolensyre er også en C18-fettsyre, men med 3 dobbeltbindinger, den første etter 3:e karbonatomet. Alfa-linolensyre forkortes ofte til ALA, C18:3 (n-3), dvs. omega-3. Linolsyre er morsubstansen til n-6 (omega-6)-familiens fettsyrer, og ALA er morsubstansen til n-3 (omega-3)-fettsyrer, se figur 4. N-6 og n-3 seriens fettsyrer danner en rekke komponenter i kroppen som spiller en nøkkelrolle i reguleringen av kardiovaskulære-, immunologiske-, metabolske - og reproduktive funksjoner. I henhold til norske kostråd mangler standardkosten ofte optimal mengde flerumettet fettsyrer i n-3 serien. Når det gjelder hjerte-karsykdommer er det vist gunstig effekt ved inntak av lange flerumettede fettsyrer som eikosapentaensyre (EPA, 20:5, n-3) og dokosaheksaensyre (DHA, 22:6, n-3). Den viktige fettsyren EPA kommer først som nummer 3 i omdannelsen av ALA, og ytterligere to skritt lenger ned kommer DHA (figur 4).



Figur 4: Generelt om metabolisme av fettsyrer.

Hensikten med genmodifiseringen av soya MON 87769 er å øke mengden av stearidonsyre (SDA 18:4 (n-3)) i soyaolje. Stearidonsyre er et intermediat i fettsyremetabolismen (figur 3 og 4). Ved hjelp av enzymet delta-6-desaturase (d-6-d) omdannes både LA og ALA til henholdsvis gamma-linolensyre (γ -LA, eller GLA) og stearidonsyre (SDA). Siden d-6-d-enzymet kreves til begge reaksjonene konkurrerer fettsyrene om enzymet. Omdannelsen av ALA til SDA er en hastighetsbegrensende prosess i dannelsen av EPA og DPA (dokosapentaensyre 20:5, n-3) (James *et al.* 2003). Den relative effektiviteten av fettsyrene ALA og SDA til å øke innholdet av EPA i vev er: SDA:EPA= 3 : 1, ALA:EPA=1,0 : 0,07 (James *et al.* 2003).

En rekke studier på mennesker viser at mengden ALA som omdannes til EPA utgjør ca. 0,2 %, mens mengde EPA som omdannes til DPA er 65 %, og mengde DPA som omdannes til DHA er 37 % (Burdge & Calder 2006). Basert på ALA-blodplasma-konsentrasjon blir den effektive omdannelsen av ALA til DHA på ca. 0,05 %. Utregningen er basert på følgende forhold: 0,2 % av ALA omdannes til EPA, og omdannelsen videre fra EPA til DHA blir følgelig ca. 0,05 %. Studier på mennesker med SDA-soyaolje, SDA-etylster, olje fra planten ormehode m.m viser at SDA omdannes hurtig til EPA hos mennesker (16-30 %), og SDA er derfor mer effektiv enn ALA i å øke mengden av EPA i blod og røde blodlegemer (James *et al.* 2003, Harris *et al.* 2008, Forshee *et al.* 2009, Whelan 2009, Lemke *et al.* 2010). Tilførsel av SDA vil føre til økt omdannelse av både EPA og DPA. Økning i mengde DPA kan også føre til økt mengde DHA (Pawlosky *et al.* 2003). Noen studier viser at tilførsel av EPA i kosten ikke fører til signifikant økning av DHA i blodet (Brenna *et al.* 2009). Andre studier viser imidlertid at det dannes EPA, DPA og DHA fra radioisotopmerket ALA (Brenna *et al.* 2009). Mengde DHA som ble dannet var svært liten. Tilførsel av ALA til mennesker som har noe ALA i blodet samt et høyt nivå av LA i blodet, synes å bidra svært lite til dannelse av DHA (Brenna *et al.* 2009). Disse studiene var relativt kortvarige, fra 3 – 26 uker. En noe lengre studie over 42 uker, viser at et inntak av olje med høyt innhold av ALA og lavt innhold av LA, dvs. n-6 : n-3 ratio i mat ble endret fra 4 : 1 til 1 : 1, førte til 21 % økning av DHA i blod hos eldre mennesker (67-91 år) (Ezaki *et al.* 1999). Vegetarianere og veganere har en tendens til å ha redusert mengde EPA og DHA i blodet i forhold til ikke-vegetarianere. For å få tilstrekkelig mengde EPA og DHA i blodet, anbefaler American Dietetic Association at vegetarianere øker inntaket av planteoljer med høyt innhold av n-3 fettsyrer og lavt innhold av n-6 fettsyrer (eksempelvis linfrøolje og rapsolje) (American Dietetic Association 2009).

Det finnes mange ulike kilder for stearidonsyre (SDA). Fiskeoljer inneholder eksempelvis fra ca. 0,95 til 3 % (tran ca. 2,5 %), rauåteolje ca. 16 %, hampfrø (ca. 0,5-2 %), olje fra hageormehode (*Echium plantaginum*) (ca. 8 – 16 %) og olje fra solbær (*Ribes nigrum*) (ca. 2-4 %) (Johansson *et al.* 1997; Pedersen 2007, Monsanto 2009, m.fl.). SDA-soyaolje er ment brukt som tilsetning til flere matvarer som bakervarer, melkeprodukter m.m.

Fôringsforsøk ved bruk av fôr tilsatt olje som inneholder SDA

Toksikologiske studier (se kapittel 3.1) viser at 4g SDA/kg kroppsvekt/dag ikke er toksisk for rotter.

Fôringsforsøk på oppdrettsfisk.

Begrenset tilgang på marine råvarer og en økende akvakulturproduksjon, gjør at vegetabiliske råvarer i økende grad tas i bruk i oppdrettsnæringen. Alternativer til marine fiskeoljer er derfor nødvendig og allerede i dag erstattes deler av fiskeoljen i laksefôret av planteoljer. Faggruppen vurderer derfor at olje produsert fra MON 87769, i norsk sammenheng, kan ha størst aktualitet som fettkilde i fôr til oppdrettsfisk. Det går imidlertid ikke spesifikt fram av dokumentasjonen fra Monsanto om soyalinjen er tiltenkt brukt som råvare til fiskefôr. Hvis dette er et tiltenkt bruksområde etterlyser faggruppen fôringsstudier på fisk.

Det er utført en rekke studier på fisk med tilsetning av forskjellige oljer til fôret. Det er også utført flere fôringsforsøk på fisk der fôret er tilsatt rensed SDA-olje, olje fra hageormehode og SDA-soya. Fôringsforsøkene er utført på barramundi (Alhazza *et al.* 2011), laks (Miller *et al.* 2007, 2008), torsk (Bell *et al.* 2006), stripet havabbor (Bharadwaj *et al.* 2010), sjøbrasme (Díaz-López *et al.* 2010) og arktisk røye (Tocher *et al.* 2006). Fôringsforsøkene viser at bruk av SDA- rike vegetabiliske oljer som inneholder fra 17 % til 100 % SDA i fôr, fører til endret fettsyresammensetning i fiskefilet og indre organer. Det er ikke påvist negative effekter på fiskens helse ved disse forsøkene.

Faggruppen vurderer det imidlertid nødvendig å utarbeide et underlagsdokument som viser kunnskapsstatus når det gjelder bruk av transgene planter med endret fettsyresammensetning som fôrråstoff til oppdrettsfisk. Faggruppen avventer derfor ferdigstillingen av denne litteraturgjennomgangen, og presiserer at vurderingene knyttet til bruk av olje fra soyalinjen MON 87769 som fôr er foreløpige.

4.4 Vurdering basert på foreløpig datagrunnlag

Pj Δ 6D- og Nc Δ 15D -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, dvs. at det i proteinene ikke er påvist aminosyresekvenser som er lik allergene proteiners epitoper, at proteinene brytes raskt ned av mage-tarmsaft, samt at konsentrasjonene av Pj Δ 6D- og Nc Δ 15D-protein er svært lave (mindre enn 0,002 % av total mengde protein), anser faggruppen det som lite trolig at disse proteinene medfører et signifikant større potensiale for utvikling av matallergi hos mennesker sammenlignet med umodifisert soya.

Det er utført akutt-oral toksisitetstudie(sondefôring) på mus med reinfremstilt Pj Δ 6D- og Nc Δ 15D-protein, 42 dagers fôringsforsøk med broilere og 90 dagers fôringsforsøk på rotter. Det ble ikke påvist helseskader verken på mus, broilere eller rotter. På bakgrunn fra dyreforsøk med MON 87769, som er dokumentert i denne søknaden, vurderer faggruppen det lite sannsynlig at mel som inneholder MON 87769 og som tilsettes fôr til dyr, er helsemessig betenkelige for dyr.

Faggruppen vurderer at olje produsert fra MON 87769, i norsk sammenheng, kan ha størst aktualitet som fettkilde i fôr til oppdrettsfisk. Det etterlyses derfor egne fôringsstudier på fisk.

5 Miljørisikovurdering

Monsanto sin søknad om godkjenning av den transgene soyalinjen MON 87769 under forordning 1829/2003/EF omfatter bruksområdene næringsmidler, fôrvarer, import og prosessering. Søknaden gjelder ikke dyrking. Miljørisikovurderingen av MON 87769 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.

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

Soya (*Glycine max* (L.) Merr.) er stedegen 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 selvbefruktning (~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 reprodusere.

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 MON 87769 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 MON 8776 skal kunne overføres til andre enn naturens kryssingspartnere ved detekterbare frekvenser i laboratoriestudier. Det er gjort forsøk som ser på stabilitet og opptak av DNA fra tarmkanalen hvor mus er oralt tilført M13 DNA. Det tilførte DNAet var sporbart i avføring opp til syv timer etter fôring. Svært små mengder av M13 DNA (<0.1 %) kunne spores i blodbanene i en periode på maksimum 24 timer, mens M13 DNA ble funnet i opptil 24 timer i lever og milt (Schubbert *et al.* 1994). Ved oralt inntak av genmodifisert soya er det vist at DNA er mer stabilt i tarmen hos personer med utlagt tarm sammenlignet med kontrollgruppen (Netherwood *et al.* 2004). I kontrollgruppen ble det ikke påvist GM DNA i feces. Nielsen *et al.* (2000) og De Vries & Wackernagel (2002) har undersøkt persistens av DNA og opptak av GM DNA i jord. I disse laboratorieforsøkene ble det påvist svært små mengder DNA som var overført fra planter til bakterier.

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 og/eller miljøet, er sannsynligheten for at horisontal genoverføring vil gi selektive fordeler eller økt fitness på mikroorganismer svært liten (Nielsen 2003). Det er derfor usannsynlig at gener fra MON 8776 vil etableres stabilt i genomet til mikroorganismer i miljøet eller i fordøyelseskanalen hos mennesker eller dyr. Det påpekes imidlertid at det er begrensinger 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. Utisiktet frøspredning i forbindelse med transport, handtering 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 MON 87769 og konvensjonelt foredlete soyasorter i dyrkingsområder for soya i Europa vil avhenge av utisiktet frøspredning i forbindelse med transport, handtering 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. Endret fettsyresammensetning vil ikke representere noen selektiv fordel for spredning av soya i Europa.

5.3 Miljøovervåkningsplan

I følge direktiv 2001/18/EF, annekse VII, er formålet med overvåkningsplanen å bekrefte at alle antagelser i miljørisikovurderingen som gjelder forekomst og omfang av potensielle skadevirkninger av den genmodifiserte organismen, eller bruken av den er korrekt. Videre skal den identifisere

forekomsten av skadevirkninger på menneskers helse eller miljøet som skyldes den genmodifiserte organismen eller bruken av den, og som ikke ble forutsett i miljørisikovurderingen.

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

Søknaden EFSA/GMO/UK/2009/76 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 føret 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. Monsanto har derfor ikke utarbeidet spesifikke strategier for risikohåndtering eller en særskilt plan for overvåking av denne eventen.

Tatt i betraktning tiltenkt bruksområde for MON 87769 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 MON 87769 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 føret med genmodifisert soya.

Det er 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

Toksisitet

Søkers dokumentasjon er i henhold til gjeldende EFSA-retningslinjer.

Allergenitet

I henhold til søker blir de transgene proteinene fullstendig nedbrutt etter behandling med pancreatin ved nøytral pH. I dossieren er det imidlertid ikke angitt nøyaktig hvilken pH som er benyttet ved behandlingen med pepsin (side 234). Dette er et viktig punkt, særlig hvis proteinene skal gis til små barn, som har forhøyet pH i magesaft opp til 2 år, eller til ulcuspasienter som går på syre-nøytraliserende midler (Untersmayr & Jensen-Jarolim, 2008).

I dossieret vektlegges det at det ikke er holdepunkter for IgE-epitoper og derfor liten mulighet for at de transgene proteinene skal kunne indusere allergi. Faggruppen etterlyser imidlertid *in vivo*-studier av om proteinene er immunogene nok til å gi en kraftig IgG-respons. Hvis det er snakk om nye epitoper som en potensiell forbruker ikke har "sett" før, så har vedkommende ikke opparbeidet oral toleranse mot disse proteinene. En IgG-respons kan da gi en subklinisk immunkompleksreaksjon (Type III) i tarmslimhinnen slik at permeabiliteten økes for sterke matvare-antigener som peanøtter etc. Dersom forbrukeren har genetisk disposisjon for IgE-mediert allergi (atopi), kan dette teoretisk sett bli resultatet av å møte et nytt fremmet antigen som det ikke er utviklet oral toleranse mot i nyfødtp perioden.

Faggruppen finner at søkers informasjon i stor grad følger OECDs retningslinjer, og er tilstrekkelig til at det er mulig å foreta en vurdering av den foreliggende GMO.

7 Innspill til EFSA GMO ExtraNet

D.07.08 - Toxicology

In the acute toxicity studies in mice, the applicant has used single doses of Pj Δ 6D- and Nc Δ 15D-protein (4.7 mg/kg body weight and 37.3 mg/kg body weight, respectively). According to the OECD guideline 401 "Acute oral toxicity", a limit test at one dose level of at least 2000 mg/kg bodyweight should be carried out. In the OECD guideline 423 it is recommended to use 3 doses.

According to toxicological practice NOAEL is the lowest dose where there is no adverse effect, i.e. at least one higher dose has to give an adverse effect. The Norwegian GMO Panel is of the opinion that the applicant, in order to exclude any acute health effects of the newly introduced proteins, should have performed an acute toxicity test on mice with at least 2000 mg/kg bodyweight with purified Pj Δ 6D- and Nc Δ 15D-protein.

D, 07.09 - Allergenicity

According to the technical dossier, the accurate pH level in the pepsin test is not given. The pH level of the gastric acid of children below the age of two is higher than the general population. As these proteins can be a part of the food of young children or patients with ulcer (Utersmayer & Jensen-Jarloom 2008), the applicant is asked to give the accurate pH level of the pepsin test.

According to the applicant the epitope tests show that there are no similarities to IgE epitopes of allelgenetic proteins. The Norwegian GMO Panel asks the notifier to elaborate whether these proteins have immunogenic potential to elicit strong IgG-response.

Vurdering basert på tilgjengelig datagrunnlag

Molekylær karakterisering

Faggruppen vurderer karakteriseringen av det rekombinante innskuddet i MON 87769, og de fysiske, kjemiske og funksjonelle karakteriseringene 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

Analysene av ernæringsmessige komponenter viser signifikante forskjeller mellom soyalinjen MON 87769 og umodifisert kontroll i enkeltparametre. Forskjellene er imidlertid ikke konsistente over forsøkssteder. Verdiene for de analyserte komponentene ligger også innenfor typiske verdier for andre soyasorter som er rapportert i litteraturen, og innenfor variasjonsområdene for kommersielle referansesorter som inngår i søkers dokumentasjon. Faggruppen anser at analysene av sentrale ernæringskomponenter er tilstrekkelige for en vurdering av soyalinjen til bruk som mat og fôr, og konkluderer med at forskjellene som er påviste ikke har ernæringsmessig betydning.

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

Feltforsøk over to vekstsesonger i USA viser ingen signifikante forskjeller mellom MON 87769 og umodifisert kontroll med hensyn på andre fenotypiske og agronomiske karakterer.

Toksisitet og allergenitet

Pj Δ 6D- og Nc Δ 15D -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, dvs. at det i proteinene ikke er påvist aminosyresekvenser som er lik allergene proteiners epitoper, at proteinene brytes raskt ned av mage-tarmsaft, samt at konsentrasjonene av Pj Δ 6D- og Nc Δ 15D-protein er svært lave (mindre enn 0,002 % av total mengde protein), anser faggruppen det som lite trolig at disse proteinene medfører et signifikant større potensiale for utvikling av matallergi hos mennesker sammenlignet med umodifisert soya.

Det er utført akutt-oral toksisitetsstudie(sondefôring) på mus med reinfremstilt Pj Δ 6D- og Nc Δ 15D-protein, 42 dagers fôringsforsøk med broilere og 90 dagers fôringsforsøk på rotter. Det ble ikke påvist helseskader verken på mus, broilere eller rotter. På bakgrunn fra dyreforsøk med MON 87769, som er dokumentert i denne søknaden, vurderer faggruppen det lite sannsynlig at mel som inneholder MON 87769 og som tilsettes fôr til dyr, er helsemessig betenkelige for dyr.

Faggruppen vurderer at olje produsert fra MON 87769, i norsk sammenheng, kan ha størst aktualitet som fettkilde i fôr til oppdrettsfisk. Det etterlyses derfor egne fôringsstudier med den transgene soyalinjen på fisk.

Miljørisiko

Søknaden gjelder godkjenning av soyalinjen MON 87769 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. Det er 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.

Referanser

- Alhazzaa, R., Bridle, A.R., Nichols, P.D., Chris, G. & Carter, C.G. (2011). Replacing dietary fish oil with Echium oil enriched barramundi with C18 PUFA rather than long-chain PUFA. *Aquaculture* (in press). doi:10.1016/j.aquaculture.2010.12.023
- American Dietetic Association (2009). Position of the American Dietetic Association: *Vegetarian Diets*. *J Am Diet Assoc.* **109**, 1266-1282.
- Bell, J.G., Strachan, F., Good, J.E. & Tocher DR (2006). Effect of dietary echium oil on growth, fatty acid composition and metabolism, gill prostaglandin production and macrophage activity in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquac. Res.* **37**, 606–617.
- Bensasson, D., Boore, J. L. & Nielsen, K. M. (2004). Genes without frontiers. *Heredity*, **92**, 483-489.
- Bharadwaj AS, Hart SD, Brown BJ, Li Y, Bruce A, Watkins BA, Paul B, Brown PB (2010) Dietary Source of Stearidonic Acid Promotes Higher Muscle DHA Concentrations than Linolenic Acid in Hybrid Striped Bass. *Lipids*, 45, 21-27.
- Brenna, J.T., Salem, Jr. N., Sinclair, A.J. & Cunnane, S.C. (2009). α -Linolenic acid supplementation and conversion to n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in humans. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, **80**, 85–91.
- Burdge, G.C. & Calder, P.C. (2006). Dietary α -linolenic acid and health-related outcomes: a metabolic perspective. *Nutrition Research Reviews*, **19**, 26–52.
- CERA (2010). The Center for Environmental Risk Assessment (CERA). GM Crop Database. http://cera-gmc.org/index.php?action=gm_crop_database
- Chassy B, Hlywka JJ, Kleter GA, Kok EJ, Kuiper HA, m.fl. (2005) Nutritional and safety assessments of foods and feeds nutritionally improved through biotechnology. *Food Nutr Bull.*; 26(4):436-42
- de Vries, J. & Wackernagel, W. (2002). Integration of foreign DNA during natural transformation of *Acinetobacter* sp. by homology-facilitated illegitimate recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**(4), 2094-2099.
- Díaz-López, M., Pérez, MJ., Guadalupe Acosta, N., Jerez, S., Dorta-Guerra, R., Tocher, D.R., Lorenzo, A. & Rodríguez, C. (2010). Effects of dietary fish oil substitution by Echium oil on enterocyte and hepatocyte lipid metabolism of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Comp Biochem Physiol B*, **155**, 371–379.
- 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
- 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

- 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
- 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.
- Ezaki, O., Takahashi, M., Shigematsu, T., Shimamura, K., Kimura, J., Ezaki H. & Gotoh, T. (1999). Long-term effects of dietary α -linolenic acid from perilla oil on serum fatty acids composition and on the risk factors of coronary heart disease in japanese elderly subjects. *J Nutr Sci Vitaminol*, **45**, 759-772.
- FAOSTAT (2006). <http://faostat.fao.org>
- Forsheea, R.A., Storey, M.L. & Anderson, P.A. (2009). Assessing the Potential Public Health Impacts of Next Generation Foods Derived from Recombinant DNA Technology: A Case Study of Omega-3 Fatty Acids Enhanced Vegetable Oils. *Food Biotechnology*, **23(1)**: 32 – 49.
- Hammond, B.G., Lemen, J.K., Ahmed, G., Miller, K., Kirkpatrick, J. & Fleeman, T. (2008). Safety assessment of SDA soybean oil: Results of a 28-day gavage study and a 90-day/one generation reproduction feeding study in rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **52**, 311-323.
- Haughn, G.W. & Somerville, C. (1986) Sulfonylurea — resistant mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet*, **204**, 430–434.
- Haughn, G.W. & Somerville, C. (1990). A mutation causing imidazolinone resistance maps to the *csrl* locus of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **92(4)**, 1081–1085.
- Harris, W.S., Lemke, S.L., Hansen, S.N., Goldstein, DA & DiRienzo, M.A. et al. (2008). Stearidonic acid-enriched soybean oil increased the omega-3 index, an emerging cardiovascular risk marker. *Lipids* **43**, 805-811.
- ILSI (2008). ILSI Crop Composition Database (2008) International Life Science Institute, Washington, DC. Accessible at: <http://www.cropcomposition.org/>.
- James, M.J., Ursin, V.M. & Cleland, L.G. (2003). Metabolism of stearidonic acid in human subjects: comparison with the metabolism of other n-3 fatty acids. *Am J Clin Nutr*, **77**, 1140-1145.
- Johansson, A., Laakso, P. & Kallio, H. (1997). Characterization of seed oils of wild, edible Finnish berries. *Z Lebensm Unters Forsch A*, **204**, 300 – 307.
- Lemke, S.L., Vicini, J.L., Su, H., Goldstein, D.A. & Nemeth MA et al. (2010). Dietary intake of stearidonic acid-enriched soybean oil increases the omega-3 index: randomized, double-blind clinical study of efficacy and safety. *Amer J Clin Nutr*, **92(4)**, 766-775.
- L'Hocine L., Boye J.I. (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 D.T. (2005). Norsk flora. Det Norske Samlaget, Oslo. 7. utgave. 1230 s. ISBN: 82-521-6029-8.

- Lu, B.R. (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.
- Miller, M.R., Bridle, A.R., Nichols, P.D. & Carter, C.G. (2008). Increased elongase and desaturase gene expression with stearidonic acid enriched diet does not enhance long-chain (n-3) content of seawater Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *J. Nutr.*, **138**, 2179–2185.
- Miller, M.R., Nichols, P.D. & Carter, C.G. (2007). Replacement of dietary fish oil for Atlantic salmon parr (*Salmo salar* L.) with a stearidonic acid containing oil has no effect on omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acid concentrations. *Comp Biochem Physiol B.*, **146**, 197–206.
- Monsanto (2009). GRAS Notice for Stearidonic (SDA) Omega-3 Soybean Oil. Monsanto 09-SY-195F.
Prepared for: Robert L. Martin, Ph.D. Office of Food Additive Safety (HFS-200), Center for Food Safety and Applied Nutrition. Food and Drug Administration, 5100 Paint Branch Parkway College Park, MD 20740-3835.
Tilgjengelig fra:
http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/gras_notices/grn000283.pdf
- Netherwood, T., Martín-Orúe, S.M., O'Donnell, A.G., Gockling, S., Graham, J., Mathers, J.C. & Gilbert, H.J. (2004). Assessing the survival of transgenic plant DNA in the human gastrointestinal tract. *Nature Biotechnology*, **22**, 204-209.
- Nielsen, K.M., van Elsas, J.D. & Smalla, K. (2000). Transformation of *Acinetobacter* sp. 13(pFG4delta*nptII*) 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), Vol. 1. pp. 96-149.
- Nielsen, K.M. & Townsend, J.P. (2004). Monitoring and modeling horizontal gene transfer. *Nature Biotechnology*, **22(9)**, 1110-1114.
- NOU 2000:19. GMO-mat. Helsemessige konsekvenser ved bruk av genmodifiserte næringsmidler og næringsmiddelingsredienser.
<http://www.regjeringen.no/nb/dep/hod/dok/nouer/2000/nou-2000-29.html?id=143253>
- 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 (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)
- Pawlosky R, Hibbeln J, Lin Y & Salem N Jr (2003) n-3 Fatty acid metabolism in women. *Br J Nutr* **90**, 993–994.

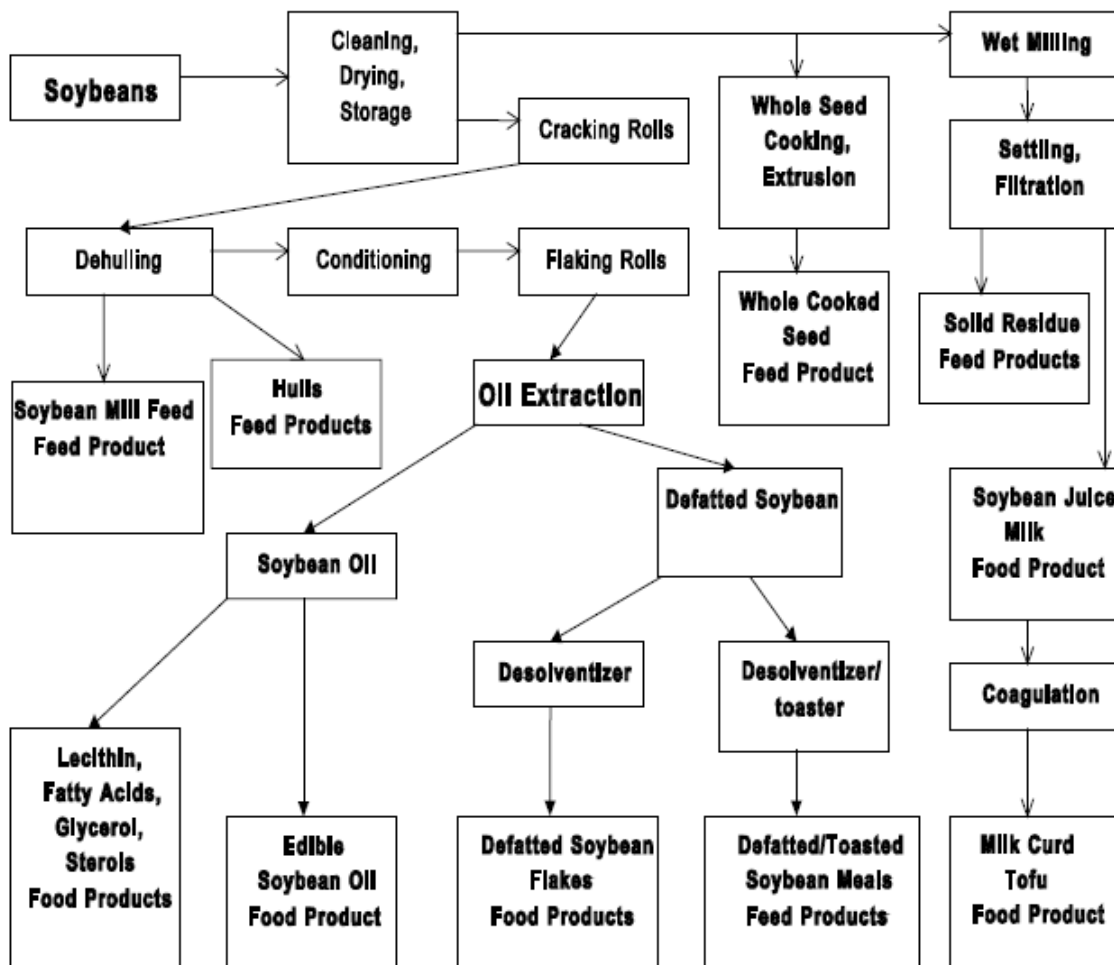
- Pedersen, A.M. (2007). Olje fra raudåte (*Calanus finmarchicus*). Oksidativ stabilitet, fettklasser og karotenoidinnhold [Masteroppgave]. Tromsø: Institutt for marin bioteknologi, Norges fiskerihøgskole, Universitetet i Tromsø.
- Pedersen, J.I. (2006). Forebygger alfaolienolensyre hjertedød? Tidsskrift for den norske lægeforening **21**, 126.
- Sathasivan, K., Haughn, G.W. & Murai, N. (1990) Nucleotide sequence of a mutant *acetolactate synthase* gene from an imidazolinoneresistant *Arabidopsis thaliana* var. Columbia. *Nucleic Acids Res* **18(8)**, 2188.
- Schubert, G.W., Lettmann, C. & Doerfler, W. (1994). Ingested foreign (phage M13) DNA survives transiently in the gastrointestinal tract and enters the bloodstream of mice. *Molecular & General Genetics*, **242**, 495-504.
- TemaNord (1998). *Safety Assessment of Novel Food Plants: Chemical Analytical Approaches to the Determination of Substantial Equivalence*. TemaNord 1998:591. ISBN 92-893-0263-1.
- Untersmayr E.& Jensen-Jarolim E. (2008) The role of protein digestibility and antacids on food allergy outcomes. *J Allergy Clin Immunol.*;121(6):1301-8; quiz 1309-10.
- 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.
- VKM (2007). *Risikovurdering av genmodifisert soya Mon 89788 (EFSA/GMO/NL/2006/36). Uttalelse fra Faggruppe for genmodifiserte organismer 8.09.2007. 07/312-endelig*. Vitenskapskomiteen for mattrygghet, Oslo, Norge.

1 VEDLEGG 1

Prosessering av soyabønne.

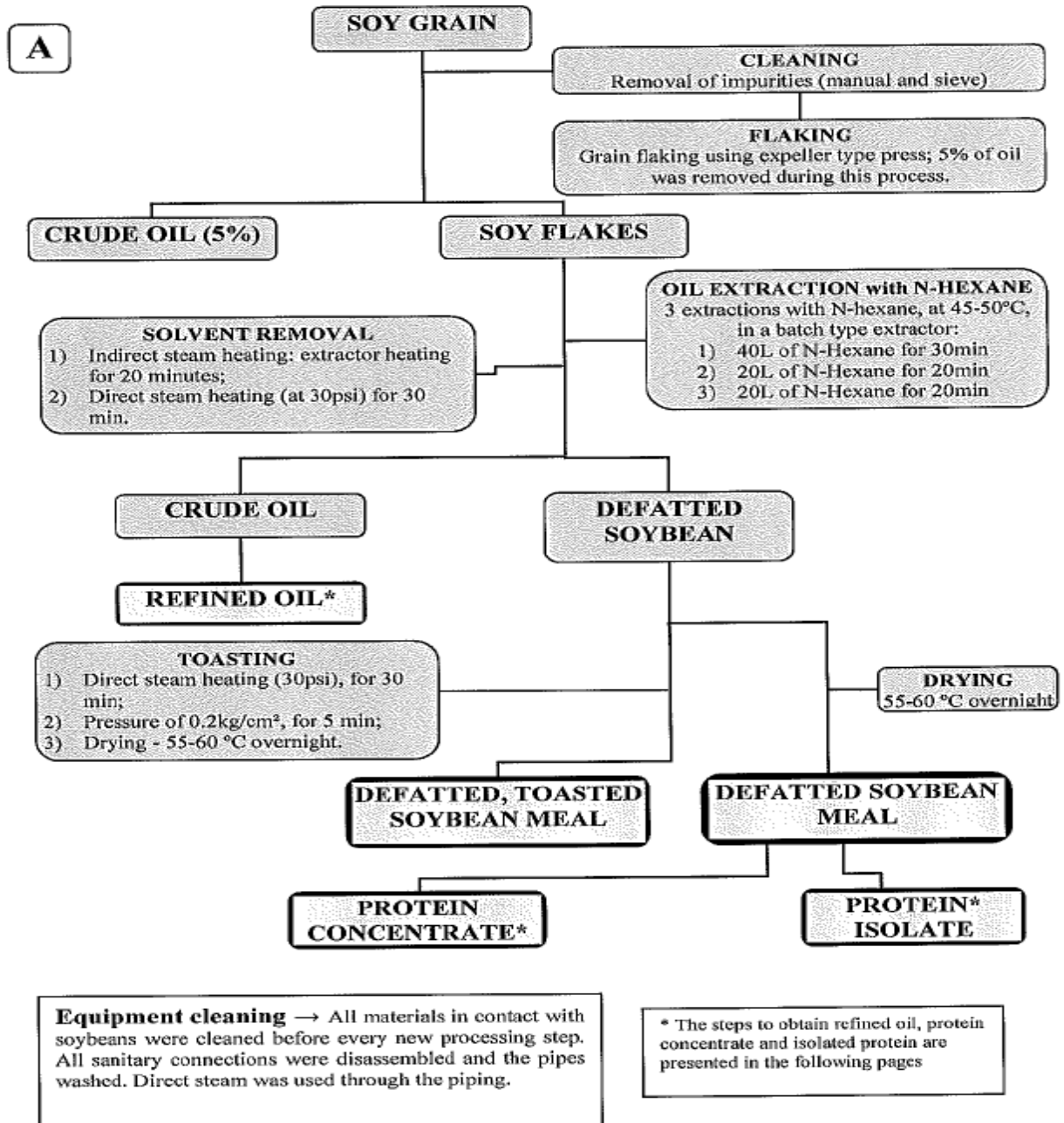
Ved prosessering av soyabønne dannes det en rekke produkter, som olje, proteinisolat, proteinkonsentrat, avfette rostet mel, avfettet mel, fôrprodukter m.m., se oversikt hentet fra OECDs soyadokument. Søker har lagt ved oversikter over produksjon av de forskjellige fraksjonene som ble produsert hos ITAL,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

WHOLE SOYBEAN PROCESSING

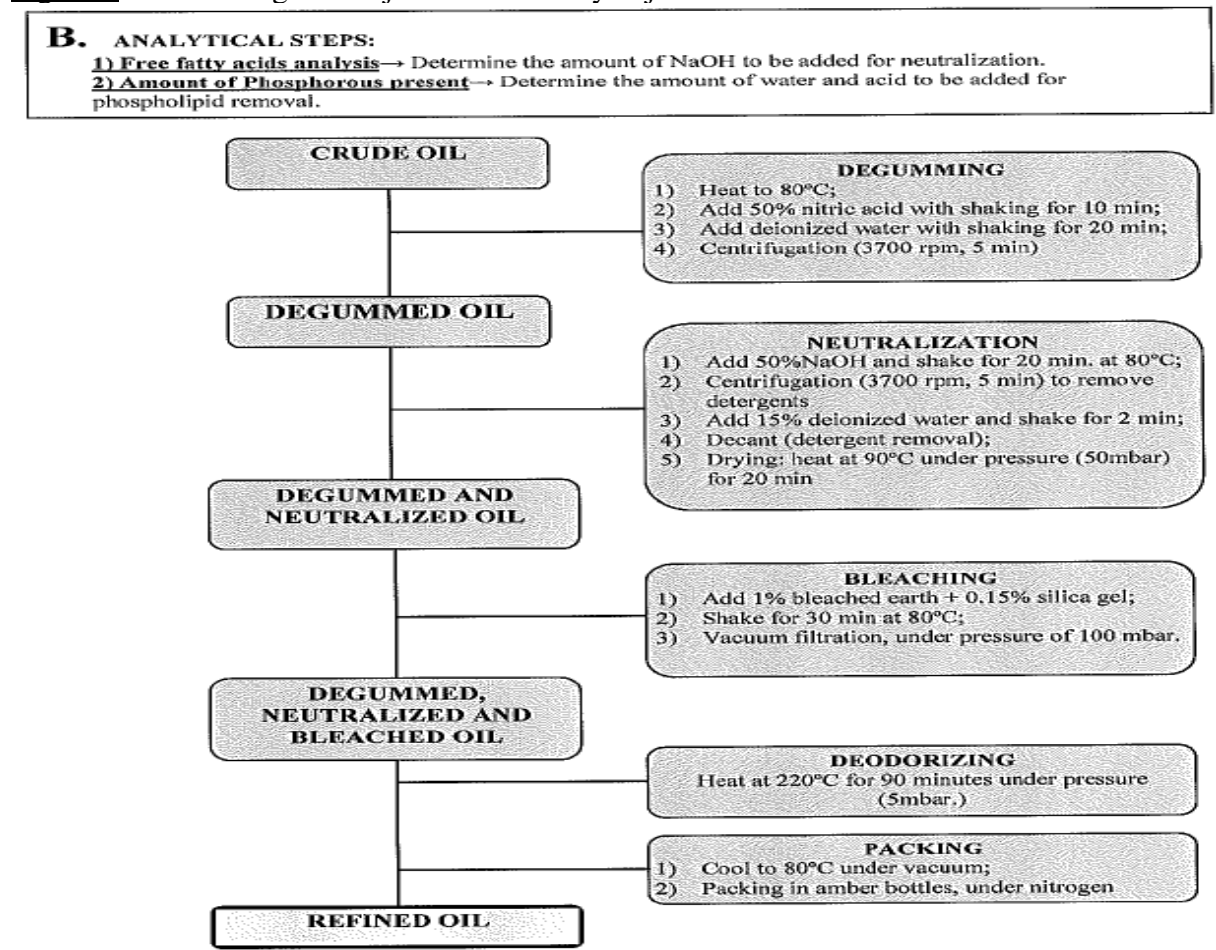


Søkers skjematisk fremstilling av prosessering av soyabønne (figur A), soyaolje (figur B) og proteinisolat og proteinkonsentrat (figur C).

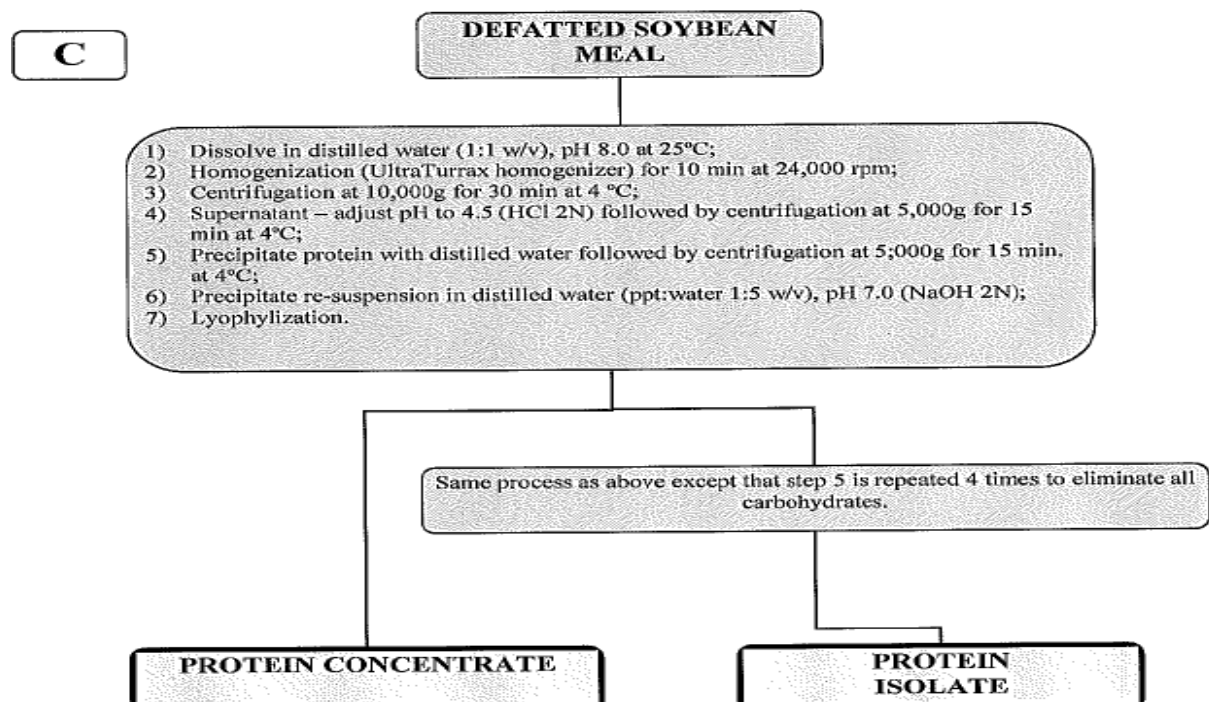
Figur A. Prosessering av soyabønne



Figur B: Prosessering av råolje til raffinert soyaolje

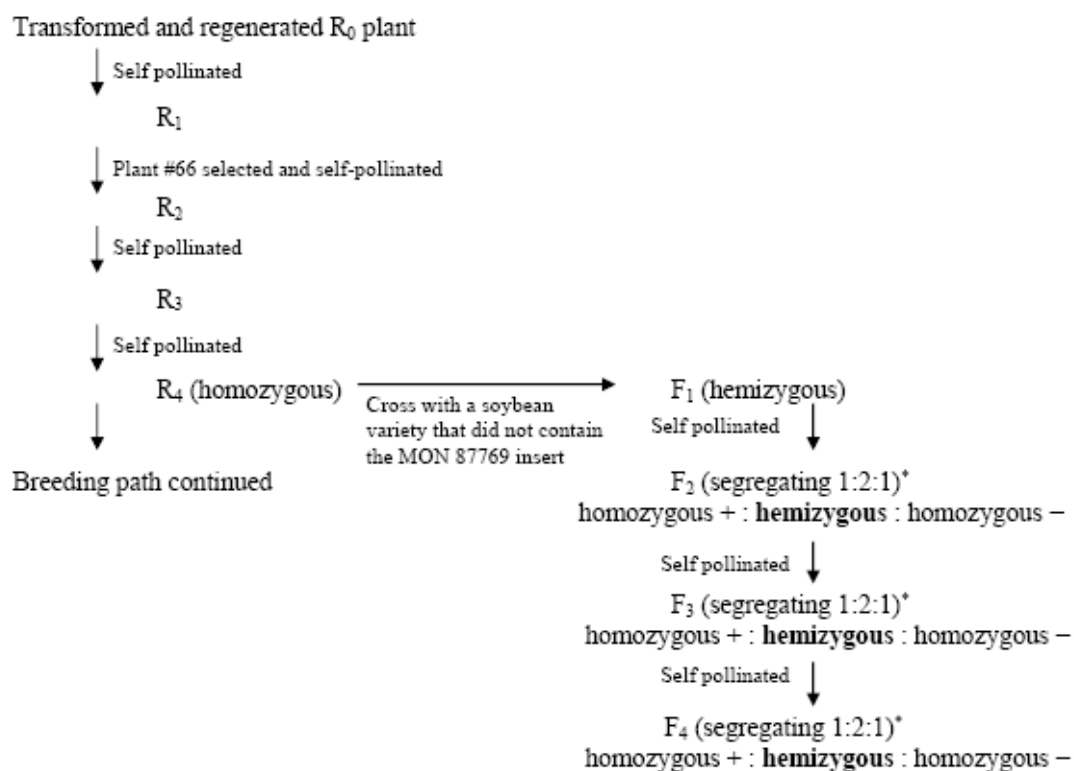


Figur C: Prosessering av avfettet soyamel til proteinisolat og proteinkonsentrat.



2 VEDLEGG 2

Kryssingsskjema for generering av spaltingsdata



* Chi-square analysis was conducted on segregation data from these generations (Table 17)

Resultater av spaltingsanalyser MON 87769