



UTTALELSE OM DOW AGROSCIENCES GENMODIFISERTE BOMULL 281-24-236 x 3006-210-23 (EFSA/GMO/NL/2005/16)

Vurdert og godkjent av Faggruppe for genmodifiserte organismer

DATO: 17.11.05

SAMMENDRAG

Vurderingen av den genmodifiserte herbicidresistente og insektstolerante bomullslinjen 281-24-236 x 3006-210-23 fra Dow AgroSciences er utført av Faggruppe for genmodifiserte organismer under Vitenskapskomiteen for mattrygghet. Mattilsynet ber Vitenskapskomiteen for mattrygghet om å vurdere den genmodifiserte bomullslinjen 281-24-236 x 3006-210-23 til bruk i næringsmidler og fôrvarer.

Hybriden 281-24-236 x 3006-210-23 er fremkommet ved krysning mellom 281-24-236 og 3006-210-23. Hensikten med 281-24-236 x 3006-210-23 er motstandsdyktighet mot enkelte insektsarter og sprøytemiddelet Roundup.

Vurdering av den genmodifiserte bomullen er basert på den dokumentasjonen som er gjort tilgjengelig på EFSAs nettside GMO EFSA-net. 281-24-236 x 3006-210-23 er vurdert i henhold til tiltenkt bruk og de prinsipper som er lagt til grunn i EFSAs retningslinjer for risikovurdering av genmodifiserte planter (EFSA 99, 2004) og Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) konsensusdokument for bomull (OECD 2004). Den vitenskapelige vurderingen omfatter transformeringsprosessen, bruk av vektor og det transgene konstruktet, komparativ analyse av ernæringsmessig kvalitet, mineraler, kritiske toksiner, antinæringsstoffer, allergener og nye proteiner.

Det er hovedsakelig oljen fra bomullsfrø som brukes som menneskeføde, mens avfallet fra oljeproduksjonen brukes som fôr. Analysene av ernæringsmessige viktige komponenter i frø ble vurdert. Det ble bemerket at noen av de komponenter som OECDs konsensusdokument (OECD 2004) anbefaler analysert for bomull ikke er utført. Det er funnet statistiske forskjeller for enkelte komponenter. De statistiske forskjellene for disse komponentene er ikke konsistente da forskjellene som er påvist i enkelte forsøksfelt, ikke er påvist i de andre forsøksfeltene. Faggruppen anser analysene for å være tilstrekkelige for en vurdering av hybrid 281-24-236 x 3006-210-23 til bruk som mat og fôr.

Informasjon vedrørende allergenisitet viser at for de parametere som er målt, har ikke de uttrykte proteinene likheter med kjente allergener eller egenskaper som tilsier at de er allergener.

Faggruppen finner det vanskelig å vurdere om fôrvarer fra bomullen 281-24-236 x 3006-210-23 er mer allergifremkallende enn fôrvarer fra umodifisert bomullsfrø. På bakgrunn av foreliggende eksperimentelle studier i mus, finner Faggruppen imidlertid at muligheten for økt allergifremkallende aktivitet hos fôrvarer fra 281-24-236 x 3006-210-23 i forhold til umodifisert bomull med den informasjon vi har tilgang til, ikke med rimelig sikkerhet kan utelukkes. Da mengde Cry1Ac og Cry1F i bomullsfrø kan henholdsvis være 0,89 og 6,6 µg/g fersk vekt, mener Faggruppen at det må kreves av Dow AgroSciences å kommentere forsøkene som viser adjuvanseffekt av Cry1Ac.

Faggruppen konkluderer med at bomullsolje fra 281-24-236 x 3006-210-23 er vesentlig lik olje fra umodifiserte bomullsfrø, og finner ikke at bruk av olje fra 281-24-236 x 3006-210-23 utgjør noen større helserisiko enn kommersiell olje fra umodifiserte bomullsplanter.

NØKKELOD

Genmodifisert bomull, 3006-210-23, 281-24-236, 281-24-236 x 3006-210-23, insektsresistens, herbicidtoleranse, PAT, Cry1Ac, Cry1F, helsemessig trygghet, helse.

BAKGRUNN

Faggruppe for genmodifiserte organismer under Vitenskapskomiteen for mattrygghet er blitt bedt av Mattilsynet om en vitenskapelig risikovurdering av EFSA/GMO/NL/2005/16 genmodifisert bomull (281-24-236 x 3006-210-23) til bruk i næringsmidler og fôrvarer. Vurdering av den genmodifiserte bomullen er basert på den dokumentasjonen som er gjort tilgjengelig på EFSA's nettside GMO EFSA.net. 281-24-236 x 3006-210-23 er vurdert i henhold til tiltenkt bruk og de prinsipper som er lagt til grunn i EFSA's dokument "Guidance document for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed" (EFSA 99, 2004). Ved vurdering av vesentlig likhet har Faggruppen lagt vekt på OECDs konsensusdokument for bomull (OECD 2004), som gir anbefalinger over hvilke parametre som bør undersøkes.

I henhold til Vitenskapskomiteen for mattrygghets uttalelse på møtet 23. april 2004 har Faggruppe for genmodifiserte organismer vedtatt at i de sakene hvor EFSA har kommet med sine uttalelser før Faggruppe for genmodifiserte organismer får sakene til behandling, skal søknadene behandles på samme måte som i EU-landene, dvs. ved en noe forenklet risikovurdering. Det vil imidlertid bli tatt hensyn til særnorske forhold der slike kan påvises.

Det er kun medlemmene i Faggruppen som har vurdert den genmodifiserte bomullen.

OPPDRAK FRA MATTILSYNET

I sitt brev ber Mattilsynet Vitenskapskomiteen for mattrygghet om å vurdere den genmodifiserte bomullen. Bruksområdet som søknaden gjelder for er prosessering, næringsmidler og fôrvarer i henhold til EUs Forordning (EC) nr. 1829/2003, artiklene 3(1) og 15(1). Søknaden gjelder ikke for import og kultivering, og krever derfor ikke vurdering for miljørisiko i henhold til Direktiv 2001/18/EØF. Mattilsynet ber VKM om vurdering av helseaspekter ved disse produktene, og legge risikovurderingen inn på EFSA.net, og sende kopi av vurderingen til Mattilsynet.

Linjen er fremkommet ved tradisjonell krysning mellom de genmodifiserte bomullslinjene 3006-210-23 og 281-24-236.

Produktet som ønskes vurdert, er:

Genmodifisert bomull, EFSA/GMO/NL/2005/16 (281-24-236 x 3006-210-23). Unik kode er DAS-24236-5 x DAS-21Ø23-5

Status i EU: Søknad under 1829/2003/EF. EFSA's frist for innspill er 17.11.05.

RISIKOVURDERING

Innledning

Den genmodifiserte bomullshybriden 281-24-236 x 3006-210-23 ble vurdert ut fra Mattilsynets oppdrag. I henhold til Dow AgroSciences er søknaden kun for import og bruk som næringsmidler, fôrvarer og industrielle produkter, ikke for utsetting. Primærbruken av produkter fra bomullsfrø i Norge i dag er til matolje, men avfall fra bomullsoljeproduksjonen brukes til dyrefôr.

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

Faggruppe for genmodifiserte organismer vurderer søknaden om markedsføring av genmodifisert bomull (EFSA/GMO/NL/2005/16) til bruk i næringsmidler og fôrvarer under forordning 1829/2003.

Bakgrunnsinformasjon

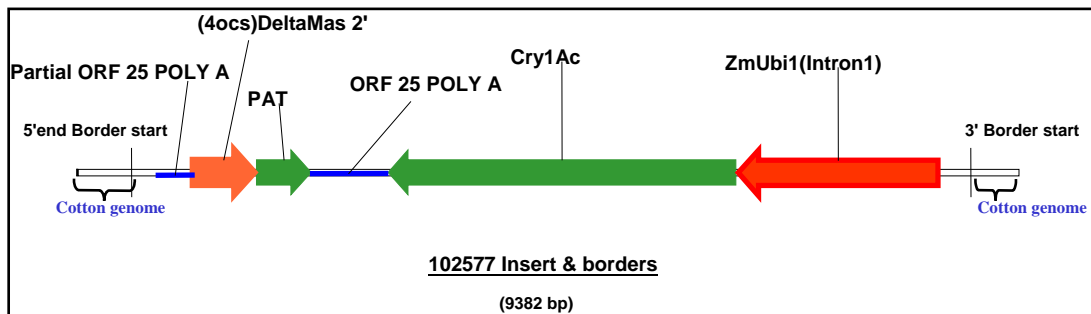
Beskrivelse av de innsatte genene

3006-210-23 (foreldrelinje):

Den molekylærbiologiske karakteriseringen viser at det er satt inn ett rekombinant DNA-fragment i 3006-210-23 bomull. Fragmentet inneholder en ekspresjonskasset.

*CryI*Ac-ekspresjonskassetten inneholder:

- a) *UbiZm1*-promoter fra mais, inneholder exon 1 og intron 1
- b) et modifisert *cryI*Ac-gen som finnes i én kopi i genomet. *cryI*Ac-genet stammer fra jordbakterien *Bacillus thuringiensis*. Inneholder også deler av protoksinene *cryI*Ca3 og *cryI*Ab1.
- c) *Orf25* – terminator sekvens fra *A. tumefaciens* plasmidet pTi15955
- d) *pat* – syntetisk versjon av glufosinatresistensgenet *pat* fra den gram-positive jordbakterien *Streptomyces viridochromogenes*.
- e) *(4OC)deltaMas2'* – mannopin syntase promoter fra *A. tumefaciens* plasmidet pTi15955, inkludert 4 kopier av octopin syntase enhancer fra plasmidet pTiAch5



Figur 1: Rekombinant DNA-fragment i bomull 3006-210-23.

Det rekombinante DNA-fragmentet som er satt inn i planten inneholder som vist på figuren ett fullengde *pat* – og *cry1Ac* gen, samt en partiell åpen ORF25 poly A leseramme.

Genenes funksjon:

pat-genet:

Sprøytemidler basert på glufosinat-ammonium gir en irreversibel hemming av planters eget enzym glutaminsyntetase. Glutaminsyntetase lager aminosyren glutamin fra glutamat og ammoniakk. Enzymet hindrer dermed opphopning av den giftige ammoniakken som dannes ved fotorespirasjon. Sprøyting fører til at planten dør på grunn av akkumulering av ammoniakk. *pat*-genet koder for enzymet PAT (Phosphinothricin-Acetyl-Transferase) som acetylerer og inaktiverer glufosinat, den aktive komponenten i sprøytemidler som Liberty, Basta og Finale. Den genmodifiserte bomullslinjen overlever sprøyting med glufosinat-ammonium siden virkestoffet acetyleres og plantens eget glutamat syntetase-enzym ikke inhiberes, men fortsatt kan utføre sin syntese av glutamat og detoksifisering av ammoniakk.

cry1Ac-genet.

Bacillus thuringiensis (*B.t.*) er en vanlig jordbakterie som danner et intracellulært proteinkrystall [for eksempel Cry1Ac] som har entomopatogen effekt. Cry-proteinkrystallet som er et protoksin, løses opp i larvens tarm for så å spaltes av proteaser til det aktive toksinet. Cry-toksinet binder seg med høy affinitet til spesifikke reseptorer på plasmamembranen i tarmepitelceller. Cry-toksinet fører til osmotisk ubalanse i cellen og massiv vevsødeleggelse opptrer. Cry1Ac har størst effekt mot enkelte sommerfuglarter.

Påvisning av åpne leserammer (ORF)

Det gjort studie for å påvise åpne leserammer. Det er påvist 3 åpne leserammer, ORF3, ORF4 og ORF10 i områdene hvor DNA fragmentet er koblet til genomisk DNA. Homologi til de hypotetiske uttrykte aminosyresekvensene som kan stamme fra disse 3 åpne leserammene ble sammenlignet med aminosyresekvenser i en "in house" database for allergener (2414 aminosyresekvenser fra allergener) og GenPept fra GenBank (1846720 aminosyresekvenser) for homologi til toksiner. ORF-4 har en 6-mer likhet til pollenallergenene Car b 1 (*Carpinus betulus*) og Cor a 1 (*Corylus avellana*). Søk etter 7-mer likhet ga ingen likhet til noen allergener. BlastP søk for sekvenshomologi viste ingen domener som har likhet med toksiner. BlastP søk indikerer at ORF3 og ORF10 har henholdsvis noe homologi til en transposase fra

Streptococcus mutans og en hypotetisk transkripsjonsfaktor fra *Prunus persica*. Fordi et eventuelt uttrykk fra disse tre ORFene har færre enn 80 aminosyrer, ble det ikke foretatt søk for 35 % eller større homologi i et vindu med 80 aminosyrer, som er anbefalt i FAO/WHO prosedyre for vurdering av potensiell allergenisitet (FAO/WHO 2001).

Molekylærbiologiske analyser viser at det rekombinante fragmentet i planten inneholder de samme gener og genelementer som er på det tilsvarende fragmentet i bakterien. Genene på det rekombinante DNA-fragmentet i 3006-210-23 uttrykker Cry1Ac- og PAT-protein som er identisk med proteinene som uttrykkes i bakterien. Analysene viser også at det er fjernet 16 bp ved innsetningsstedet. Det var ingen åpne leserammer i de 16 bp.

Mengde Cry1Ac protein i frø fra vekstsesongene 2001 og 2003 er henholdsvis $0,57 \pm 0,09$ $\mu\text{g/g}$ ferskvekt (Range= 0,33-0,78) og $0,43 \pm 0,12$ $\mu\text{g/g}$ ferskvekt (Range=0,16-0,89). Prøvene som er analysert stammer fra seks feltforsøk utført i USA. I hver bomullsåker ble det plantet fire blokker, en blokk for hver av kontroll- og de tre genmodifiserte bomullsplantene. Verdiene er et gjennomsnitt av de seks forsøksfeltene og gjennomsnitt av tre paralleller fra hver de fire blokkene. Forsøksfeltene var lokaliserte på områder som representerer forskjellige vekstmiljøer for bomull.

Mengde PAT protein i frø fra vekstsesongene 2001 og 2003 er henholdsvis lavere enn 0,09 $\mu\text{g/g}$ ferskvekt og lavere enn 0,04 $\mu\text{g/g}$ ferskvekt. Prøvene som er analysert stammer fra de seks feltforsøk utført i USA. Statistisk analyse er som for Cry1Ac proteinet.

Det ble ikke påvist Cry- eller PAT-protein i olje.

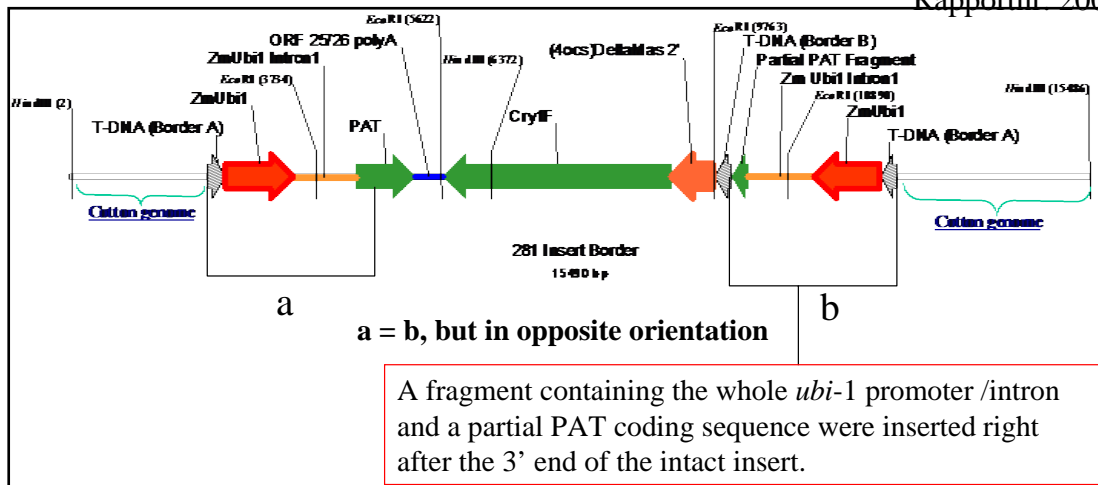
Faggruppen mener at karakteriseringen av det rekombinante innskuddet i 3006-210-23 er tilfredsstillende.

281-24-236 (foreldrelinje):

Den molekylærbiologiske karakteriseringen viser at det er satt inn ett rekombinant DNA-fragment i 281-24-236 bomull. Fragmentet inneholder en ekspresjonskasset.

CryIF-ekspresjonskassetten inneholder:

- f) *(4OC)deltaMas2'* – mannosyltransferase promotor fra *A. tumefaciens* plasmidet pTi15955, inkludert 4 kopier av octopin syntase enhancer fra plasmidet pTiAch5
- g) *cryIF* - et modifisert *cryIF*-gen som finnes i én kopi i genomet. *cryIF*-genet stammer fra jordbakterien *Bacillus thuringiensis*. Inneholder også deler av protoksinene *cryICa3* og *cryIAb1*.
- h) *Orf25* – terminator sekvens fra *A. tumefaciens* plasmidet pTi15955
- i) *pat* – syntetisk versjon av glufosinatresistensgenet *pat* fra den gram-positive jordbakterien *Streptomyces viridochromogenes*.
- j) *UbiZm1*-promotor fra mais, inneholder exon 1 og intron 1



Figur 2: Rekombinante DNA fragment i bomullsplanten 281-24-236.

Det rekombinante DNA fragmentet som er satt inn i planten inneholder som vist på figuren inneholder ett fullengde *pat* og *cryIF* gen, og ett partielt *pat*-gen (231 bp) drevet av *UbiZm1* promoteren.

Partielt *pat* mRNA ble påvist med revers transkriptase-PCR i en mengde som tilsvarende 1/16 av full-lengde *pat* mRNA. Potensielt partielt PAT protein kunne imidlertid ikke påvises med Western blot i noe bomullsvev. Det er blitt påvist en ny åpen leseramme (ORF-7). ORF-7 har en 6-mer likhet med aminosyrer til ett soyagen som har 40 % homologi til et rug pollenallergen (*Lol P 1, Lolium perenne*). Ved analyse av flankesekvenser rundt innsetningsstedene for det rekombinante fragmentet er det funnet at *Cry1F*-genet er innsatt på en plass i bomullsgenomet som inneholder genet GA 20-oksidasen. GA 20-oksidasen er involvert i produksjonen av giberelliner, en gruppe av plantehormoner som har mange ulike funksjoner. Det er derfor vanskelig å forutsi effekten av en mulig endring i uttrykket av GA20-oksidasen. Søker mener det likevel er lite trolig at plasseringen av genkonstruksjonen med *Cry1F*-genet har innvirkning på de ernæringsmessige egenskapene til bomullslinjen.

Mengde *Cry1F* protein i frø fra vekstsesongene 2001 og 2003 er henholdsvis $5,13 \pm 1,2$ $\mu\text{g/g}$ ferskvekt (Range= 3,2-8,2) og $2,27 \pm 0,6$ $\mu\text{g/g}$ ferskvekt (Range=0,99-3,86). Prøvene som er analysert stammer fra seks feltforsøk utført i USA. I hver bomullsåker ble det plantet fire blokker, en blokk for hver av kontroll- og de tre genmodifiserte bomullsplantene. Verdiene er et gjennomsnitt av de seks forsøksfeltene og gjennomsnitt av tre paralleller fra hver de fire bomullsplantene. Forsøksfeltene var lokaliserte på områder som representerer forskjellige vekstmiljøer for bomull.

Mengde *PAT* protein i frø fra vekstsesongene 2001 og 2003 er henholdsvis $0,47 \pm 0,17$ $\mu\text{g/g}$ ferskvekt (Range= 0,23-1,07) og $0,43 \pm 0,20$ $\mu\text{g/g}$ ferskvekt (Range=0,16-0,69). Prøvene som er analysert stammer fra de seks feltforsøk utført i USA. Statistisk analyse er som for *Cry1F* proteinet.

Det ble ikke påvist *Cry*- eller *PAT*-protein i bomullsolje.

Molekylærbiologiske analyser viser at ett rekombinant fragment er satt inn i planten. Dette fragmentet inneholder de samme gener og genelementer som er på det tilsvarende fragmentet i bakterien. Genene på det rekombinante DNA-fragmentet i 281-24-236 uttrykker PAT- og Cry-protein som er identisk med proteinene som uttrykkes i bakterien.

Faggruppen mener at karakteriseringen av det rekombinante innskuddet i 281-24-236 er tilfredsstillende.

281-24-236 x 3006-210-23:

281-24-236 x 3006-210-23 er dannet ved konvensjonell kryssing mellom 281-24-236 og 3006-210-23. Analyse etter 6 generasjoner viser at de rekombinante fragmentene er stabilt integrert.

Det er foretatt Southern blot-analyse, PCR og sekvensering for å undersøke tilstedeværelsen og antall kopier av 281-24-236- og 3006-210-23-ekspresjonskassetene i 281-24-236 x 3006-210-23, samt å undersøke for fravær eller tilstedeværelse av andre potensielle mRNA transkript som følge av genssekvensene i de innsatte rekombinante DNA fragmentene. Det er påvist tilsvarende rekombinante ekspresjonskassetter som dem i 281-24-236- og 3006-210-23, pluss at det med *pat*-proben er påvist tre ekstra bånd på henholdsvis 1300 bp, ~ 8500 bp og ~9800 bp. Søker tilskriver 1300 og 9800 båndene til det partielle *pat*-genet, mens det ukarakteriserte 8500 båndet som stammer fra kutting med *HpaI*, tilskrives *HpaI* enzymets måte å kutte på.

Søker mener det er lite trolig at plasseringen av genkonstruksjonen med Cry1F-genet i GA 20-oksidasen genotyper har innvirkning på de ernæringsmessige egenskapene til bomullslinje 281-24-236 x 3006-210-23. Dette fordi 1) plasseringen av Cry1F er i den ikke-kodende 3'-delen av GA 20-oksidasen og dermed ikke forstyrrer den kodende sekvensen, 2) bomullslinje 281-24-236 x 3006-210-23 er tetraploid (inneholder fire kromosomsett) og planten har derfor ytterligere tre kopier av GA 20-oksidasen, 3) GA 20-oksidaser tilhører en større genfamilie, noe som innebærer at det finnes enda flere varianter av denne genotypen i bomull, 4) utover motstandsdyktighet overfor enkelte insekter og sprøytemidler av type glufosinat er det ikke observert endrede agronomiske egenskaper hos linje 281-24-236 x 3006-210-23 sammenliknet med ikke-genmodifisert kontroll og 5) næringsinnholdet i frø fra 281-24-236 x 3006-210-23 avviker ikke vesentlig fra kontrollfrøene.

Det konkluderes med at begge ekspresjonskassetene fra henholdsvis 3006-210-23 og 281-24-236 er satt inn i 281-24-236 x 3006-210-23. Sammenlignende Southern blot-analyser mellom hybridene 281-24-236 x 3006-210-23 og de to foreldrelinjene viser at bruttostørrelsen på de innsatte DNA-fragmentene er intakte, og at det er påvist med *pat*-proben et ekstra bånd på ~8500 bp som ikke er karakterisert.

Mengde Cry1Ac protein i frø fra vekstsesongene 2001 og 2003 er målt til henholdsvis $0,57 \pm 0,09$ $\mu\text{g/g}$ ferskvekt (Range=0,33-0,78) og $0,46 \pm 0,12$ $\mu\text{g/g}$ ferskvekt (Range=0,16-0,89). Mengde Cry1F protein er målt til henholdsvis $4,13 \pm 1,1$ $\mu\text{g/g}$ ferskvekt (Range=1,4-6,6) og $2,34 \pm 0,52$ $\mu\text{g/g}$ ferskvekt (Range=1,5-4,15). Mengde PAT protein er målt til henholdsvis $0,53 \pm 0,21$ $\mu\text{g/g}$ ferskvekt (Range=0,20-1,31) og $0,53 \pm 0,17$ $\mu\text{g/g}$ ferskvekt (Range=0,22-1,02). Prøvene som er analysert stammer fra de samme feltforsøk som for 281-24-236 og 3006-210-23.

Det ble ikke påvist DNA, Cry- og PAT protein i bomullsolje.

Dokumentasjon av "vesentlig likhet"

Søkerens hoveddokument er presentert som anbefalt i EFSA's retningslinjer for risikovurdering av genmodifiserte planter og forordning 1829/2003. Analyser av sammensetning i bomullsfrø er fra bomullslinjene 281-24-236 x 3006-210-23, 3006-210-23, 281-24-236 og en umodifisert kontrollhybrid. Prøvene som er analysert, stammer fra seks feltforsøk utført på seks forskjellige dyrkningsområder i USA. Dyrkningsområdene representerer forskjellige vekstmiljøer for bomull, og undersøkelsene ble utført i 2001 og 2003. I hvert av de seks forsøksfeltene ble forskjellige bomullssortene plantet i fire blokker. Det er tatt ut tre prøver fra de fire blokkene fra hvert felt, og disse analysene omfatter bomullssortene 281-24-236 x 3006-210-23, 3006-210-23, 281-24-236 og en umodifisert kontrollhybrid. Alle bomullssortene ble dyrket på de samme forsøksfeltene. I søknadsdokumentet er det imidlertid kun dokumentert sammenligninger mellom 281-24-236 x 3006-210-23 og umodifisert kontrollhybrid, som er i henhold til EFSA's retningslinjer (EFSA 99, 2004).

Hovedkomponenter i bomullsfrø:

Søker har ikke for 281-24-236 x 3006-210-23, 3006-210-23, 281-24-236 og umodifisert kontrollhybrid gitt uttrykk for at valget av analyseparametere er gjort i henhold til aksepterte internasjonale standarder og OECDs konsensusdokument for bomull (OECD 2004). Imidlertid henviser søker til verdier i tabeller over analyserte parametre i OECD dokumentet. Det er foretatt forskjellige analyser av hovedkomponenter i en rekke vev. Faggruppen har konsentrert sin vurdering av frø, og avlede produkter fra frø som benyttes til mat (olje) og fôr (frøskall, frøkake og mel). Det ble analysert for aske, fett, protein, vann, karbohydrater, total fiber, kalorier, syrestabil fiber (ADF), nøytralstabil fiber NDF), aminosyrer, fettsyrer, vitaminene (kun for 2003) A, B₁, B₂, B₆, C, folat, niacin, tokoferoler (alfa, beta, gamma, delta), fosfor, jern, kalium, kalsium, kobber, magnesium, mangan, molybden, natrium, sink, svovel, anti-næringsmidlene gossypol (totalt og fritt) og cyklopropenoid fettsyrer (sterculic, malvalic og dihydrosterculic), samt aflatoksinene B₁, B₂, G₁ og G₂. Analysene ble utført under god laboratoriepraksis (GLP).

For hovedkomponentene vann (2001) og fiber (2001) funnet statistiske forskjeller som er mindre enn 10 %.

Fettsyresammensetning i bomullsfrø:

Fettsyresammensetningen i frø for 281-24-236 x 3006-210-23, 3006-210-23, 281-24-236 og umodifisert kontrollhybrid er målt i henhold til OECDs konsensusdokument for bomull. Det ble analysert for 22 fettsyrer. Fettsyrenivået er i noen tilfelle lavere enn litteraturverdier, imidlertid er nivåene svært like for 281-24-236 x 3006-210-23 og foreldrelinjene.

Aminosyrer i bomullsfrø:

Både essensielle og ikke-essensielle aminosyrer ble analysert. De aminosyrer som er målt er i henhold til OECD dokumentet. Det er ikke funnet store statistiske forskjeller for alle forsøksfeltene. Verdien ligger innenfor 20 %, og for alle aminosyrene ligger verdiene innenfor de typiske verdiene som er rapportert i litteraturen.

Vitaminer:

Vitaminer som det i henhold til OECDs konsensusdokument for bomull bør undersøkes for, er vitamin E. For feltforsøkene i 2003 er det målt for vitaminene A, B₁, B₂, B₆, C, folat, niacin, tokoferoler (alfa, beta, gamma, delta). Det er ikke funnet store statistiske forskjeller. Vitamin A, alfa - og delta tokoferol var ikke påvisbare med de målemetodene som ble brukt.

Mineraler:

Med unntak for selen er mineralene som er målt i henhold til OECDs konsensusdokument for bomull. Det er funnet statistiske forskjeller for flere mineraler, men forskjellen ligger innenfor 5 %. For noen mineraler ligger verdiene utenfor typiske verdier for andre bomullssorter som er rapportert i litteraturen. Imidlertid er forskjellene mellom verdiene for umodifisert kontrollhybrid og genmodifisert hybrid mindre enn 5 %.

Antiernæringsstoffer:

Det er ikke funnet statistiske forskjeller for gossypol. Det er små forskjeller for syklopropenoidsyrene for vekstsesongen 2001, men ikke for 2003.

Toksiner:

Aflatoksinene B₁, B₂, G₁ og G₂ er ikke påvist over påvisningsgrensen på 1 ppb.

Analyse av protein og DNA i raffinert bomullsolje.

Dow AgroSciences har analysert raffinert bomullsolje for protein og DNA. Det er ikke påvist protein eller DNA over påvisningsgrensene.

Konklusjon

Det er funnet statistiske forskjeller i enkeltparametere. Enkelte av verdiene for noen av komponentene ligger utenfor typiske verdier for andre bomullssorter som er rapportert i litteraturen. Imidlertid er forskjellene mellom genmodifisert bomull og umodifisert kontrollhybrid mindre enn 10 %. Faggruppen anser derfor at de forskjellene som er påvist ikke har noen helsemessig betydning.

Dokumentasjon av toksisitet og allegenisitet

Toksisitet:

Siden det kun er olje som benyttes som mat, krever søker at fôringsforsøk med de nye proteinene utføres i sammenheng med dyrehelse. Søknaden inneholder dokumentasjon på fôringsforsøk av mus med renfremstilt Cry1Ac, Cry1F og PAT- proteiner, og en 42 dagers studie med broilere.

Fôringsforsøkene med renfremstilte proteiner er gjort i henhold til OECDs retningslinjer nr. 401 for akutt oral toksisitet (1987), EPAs retningslinjer for helseeffekter OPPTS 870.1100 (1998), JMAFF retningslinjer for akutt oral toksisitet (2000) og EUs retningslinjer for akutt oral toksisitet (EEC Methods Number B.1, 1992). Det er ikke funnet noen testrelaterte endringer hos musene ved fôring med 350 mg Cry1Ac/kg kroppsvekt(kv), 375 mg Cry1F/kg kv og 6000 mg PAT/kg kv.

Fôringsforsøk på broiler:

Søknaden inneholder dokumentasjon fra 42-dagers fôringsforsøk på broilere, 480 dyr, fordelt i fire grupper. Dyrene ble fôret med henholdsvis bomullsmel fra 281-24-236 x 3006-210-23, en umodifisert kontrollhybrid og to kommersielle umodifiserte referansehybride bomullssorter. Det ble påvist testrelaterte endringer for de dyrene som ble fôret med 281-24-236 x 3006-210-23 genmodifisert bomullsmel. Fôring med genmodifisert bomullsmel ga lavest og best fôromdannelsen. For de andre målte parametrene var det ingen statistiske forskjeller mellom dyrene. Faggruppen konkluderer med at det er ingen grunn til å anta at den ernæringsmessige kvaliteten til fôr fra genmodifiserte bomull er dårligere enn fôr fra umodifisert bomull.

Allergenisitet:

Bt-proteiner

Til tross for vel 50 års bruk av B.t.k. som sprøytemiddel er det ingen bekreftede rapporter over øyeblikkelige eller forsinkede allergiske reaksjoner til tross for betydelig human oral-, dermal- og inhalasjonseksposering. (EHC 1999) Laboratoriestudier med pattedyr indikerer heller ingen potensielle allergiske reaksjoner mot *Bacillus thuringiensis* eller dets komponenter innbefattet delta-endotoksinet i krystallproteinet. Allergiske reaksjoner mot *Bacillus thuringiensis* har vært rapportert, men disse har ikke vært tilskrevet krystallproteinet (EHC 1999).

Det har ikke vært utført immunologiske studier med de transgene produktene. Det er vist at Cry1Ac-proteinet binder seg til musetarmoverflaten og induserer immunologiske reaksjoner mot seg selv og mot proteiner gitt samtidig (Vazquez-Padron *et al.* 2000a, Vazquez *et al.* 1999, Moreno-Fierros *et al.* 2003, Rojas-Hernández *et al.* 2004). Immunologisk kartlegging av systemisk og mucosal immunreaksjon på Cry1Ac har videre påvist at mus lager både systemisk IgM, IgG og sekretorisk IgA etter intraperitoneal og intragastrisk immunisering (Vazques-Padron *et al.* 2000b). Det er ukjent om Cry1Ac-proteinet som er benyttet i disse studiene, tilsvarer Cry1F-toksinet som den transgene maislinjen lager. Det er vist at domene II fra Cry1Ab og Cry1Ac genererer ulik immunologisk respons i kanin (Vazquez-Padron *et al.* 1998). I en annen studie er det vist at Cry1Ac hadde utpreget mucosal adjuvanseffekt ved å potensere IgM-, IgG- og IgA-responsen mot hepatittvirusantigen og bovint serumalbumin som ble gitt med sondefôring samtidig med Cry1Ac (Vazquez *et al.* 1999). Produksjonen av IgE-antistoff, som er knyttet til allergisk reaksjon, ble ikke målt. Også i tidligere studier (Prasad & Shetna 1975) er det påvist adjuvanseffekt av krystallprotein fra *Bacillus thuringiensis*. Adjuvanseffekten av Cry1Ac er bekreftet i to senere publikasjoner med henholdsvis pneumokokk-antigen (Moreno-Fierros *et al.* 2003) og amøbe-lysat (Rojas-Hernández *et al.* 2004). Adjuvanseffekten av Cry1Ac ble funnet å være like sterk som adjuvanseffekten av koleratoksin (Vazques-Padron *et al.* 1999), som er et mye brukt slimhinneadjuvans i eksperimentelle studier av vaksinasjon og av allergi, og som regnes for å være det sterkeste slimhinneadjuvans vi kjenner.

De mengder Cry1Ac som ga mucosal adjuvanseffekt ved sondefôring av mus var fra 0,1 µg til 100 µg (Vazquez *et al.* 1999). De adjuvansdoser som brukes for immunisering av mus og mennesker i andre sammenhenger er ofte av samme størrelsesorden, det vil si om lag samme dose brukes til mus og menneske. Det er mulig at også Cry1F som benyttes i 281-24-236 x 3006-210-23 kan ha tilsvarende effekter som vist for det beslektede Cry1Ac-proteinet, som induserer immunologiske reaksjoner mot seg selv og økt reaksjon mot proteiner gitt samtidig. Dersom Cry1F har tilsvarende adjuvanseffekt som det beslektede Cry1Ac-proteinet er rapportert å ha, vil dette teoretisk kunne føre til økt utvikling av allergi for dyrene mot fôrvarer spist sammen med for eksempel bomullsmel. Man ville vente at adjuvanseffekten kom til syne først og fremst som økt forekomst av allergi mot de matvarene der matallergi fra før er vanligst. IgE ble ikke målt i de refererte studiene av adjuvanseffekt av Cry1Ac-proteinet.

Konklusjon:

Faggruppen finner det ut fra tilgjengelige data vanskelig å vurdere om bomullsmel fra 281-24-236 x 3006-210-23 er mer allergifremkallende for dyr enn umodifisert bomullsmel. På bakgrunn av foreliggende eksperimentelle studier i mus, finner Faggruppen imidlertid at muligheten for økt allergifremkallende aktivitet til 281-24-236 x 3006-210-23 med den informasjon vi har tilgang til, ikke med rimelig sikkerhet kan utelukkes. Faggruppen mener at siden adjuvanseffekt av Cry1F ikke med rimelig sikkerhet kan utelukkes, må det kreves av Dow AgroSciences å kommentere forsøkene som viser adjuvanseffekt av Cry1Ac i forhold til muligheten for adjuvanseffekt av Cry1F

KONKLUSJON

Det er funnet statistiske forskjeller i enkeltparametere. Noen av verdiene for de enkelte analyserte komponentene ligger utenfor typiske verdier for andre bomullssorter som er rapportert i litteraturen. Faggruppen finner at disse forskjellene er små og anser at de ikke har noen helsemessig signifikans. Da det ikke er funnet store statistiske forskjeller mellom genmodifisert – og umodifisert kontrollhybrid i enkeltparametere for olje konkluderer faggruppen derfor med at det ikke er grunn til å anta at den ernæringsmessige kvaliteten til olje fra den genmodifiserte bomullsplanten er forskjellig fra olje fra umodifisert bomullsplante.

Flere studier viser at proteinene PAT, Cry1Ac og Cry1F ikke er akutt toksiske. Dow AgroSciences har utført akuttstudier på mus med disse proteinene. Disse studiene viser at disse proteinene, ikke fører til påvisbare helseeffekter på dyrene. Dow AgroSciences har utført fôringsforsøk med broilere, men ikke utført sub-kroniske studier på rotter med fôr fra 281-24-236 x 3006-210-23. Faggruppen konkluderer med at det er lite sannsynlig at eksponering for PAT-proteinet i seg selv og i de mengder som tilføres via fôr fra den genmodifisert bomullen, er helsemessig betenkelige for dyr. Faggruppen finner imidlertid at for Cry1Ac- og Cry1F proteinene er det ut fra tilgjengelige data vanskelig å vurdere om bomullsmel fra 281-24-236 x 3006-210-23 er mer allergifremkallende for dyr enn umodifisert bomullsmel.

Faggruppen konkluderer med at bomullsolje fra 281-24-236 x 3006-210-23 er vesentlig lik olje fra umodifiserte bomullsfrø, og finner ikke at bruk av olje fra 281-24-236 x 3006-210-23 utgjør noen større helserisiko enn kommersiell olje fra umodifiserte bomullsplanter.

VURDERT AV

Faggruppe for genmodifiserte organismer:

Ingolf Nes, Knut Berdal, Grethe Foss, Leiv S. Håvarstein, Casper Linnestad, Martinus Løvik, Audun Nerland, Vibeke Thrane, Sonja Klemsdal.

Koordinator fra sekretariatet: Arne Mikalsen

REFERANSER

EFSA 99, 2004. "Guidance document for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed".

EHC, 1999. Environmental Health Criteria 217. *Bacillus thuringiensis*. WHO, Geneve 1999

FAO/WHO 2001 Evaluation of allergenicity of genetically modified foods. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Allergenicity of Foods Derived from Biotechnology

22 – 25 January 2001. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).

Moreno-Fierros L, Ruiz-Medina EJ, Esquivel R, López-Revilla R, Piña-Cruz S., 2003. Intranasal Cry1Ac protoxin is an effective mucosal and systemic carrier and adjuvant of *Streptococcus pneumoniae* polysaccharides in mice. Scand J Immunol., 57: 45-55.

OECD, 2004. Consensus Document on Compositional Consideration for New Varieties of Cotton (*Gossypium hirsutum* and *Gossypium barbadense*): Key Food and Feed Nutrients and Anti-nutrients., No. 11, Series on Safety of Novel Foods and Feeds.

Prasad S.S.S.V. & Shethna, Y.I., 1975. Enhancement of immune response by the proteinaceous crystal of *Bacillus thuringiensis* var *thuringiensis*. Biochem Biophys Res Commun., 62: 517-521.

Rojas-Hernández S, Rodríguez-Monroy MA, López-Revilla R, Reséndiz-Albor AA, Moreno-Fierros L., 2004. Intranasal coadministration of the Cry1Ac protoxin with amoebal lysates increases protection against *Naegleria fowleri* meningoencephalitis. Infect Immun., 72:4368-4375

Vazquez-Padron RI. Martinez-Gil AF. Ayra-Pardo C. Gonzalez-Cabrera J. Prieto-Samsonov DL. de la Riva GA., 1998. Biochemical characterization of the third domain from *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins. Biochem Mol Biol Int., 45(5):1011-20.

Vazquez RI. Moreno-Fierros L. Neri-Bazan L. De La Riva GA. Lopez-Revilla R., 1999. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protoxin is a potent systemic and mucosal adjuvant. Scand J Immunol., 49: 578-84.

Vazquez-Padron RI. Gonzales-Cabrera J. Garcia-Tovar C. Neri-Bazan L. Lopez-Revilla R. Hernandez M. Moreno-Fierro L. de la Riva GA., 2000a. Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* sp. *kurstaki* HD73 binds to surface proteins in the mouse small intestine. Biochem Biophys Res Commun., 271:54-8.

Vazquez-Padron RI. Moreno-Fierros L. Neri-Bazan L. Martinez-Gil AF. de-la-Riva GA. Lopez-Revilla R., 2000b. Characterization of the mucosal and systemic immune response induced by Cry1Ac protein from *Bacillus thuringiensis* HD 73 in mice. Braz J Med Biol Res., 33: 147-55.

