



Helse- og miljørisikovurdering
av
genmodifisert soyahybrid MON 87701 x MON 89788
Monsanto Company
(EFSA/GMO/NL/2009/73)

1. innspillsrunde

Uttalelse fra
Faggruppe for genmodifiserte organismer
Vitenskapskomiteen for mattrygghet

6. april 2010

ISBN: 978-82-8082-405-9

VKM Report 2010: 10

BIDRAGSYTERE

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:

Hilde-Gunn Opsahl Sorteberg (leder), Thomas Bøhn, Askild Holck, Helge Klungland, Richard Meadow, Anne I. Myhr, Audun Nerland, Ingolf Nes, Kåre M. Nielsen, Odd E. Stabbetorp, Vibeke Thrane, Rose Vikse

Koordinatorer fra sekretariatet:

Arne Mikalsen og Merethe Aasmo Finne

SAMMENDRAG

Helse- og miljørisikovurderingen av den insektsresistente og herbicidtolerante soyahybriden MON 87701 x MON 89788 (EFSA/GMO/NL/2009/73) 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 soyahybriden MON 87701 x MON 89788 til bruk i næringsmidler og fôrvarer, men ikke til dyrking.

Risikovurderingen av den genmodifiserte soyaen er basert på dokumentasjon som er gjort tilgjengelig på EFSA's nettside GMO EFSA Extranet. I tillegg er det benyttet informasjon fra uavhengige vitenskapelige publikasjoner i vurderingen. MON 87701 x MON 89788 er risikovurdert i henhold til tiltent bruk i EU/EØS-området, og faggruppen har derfor ikke vurdert helse- og miljøeffekter knyttet til dyrking av soyahybriden.

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. Det presiseres at de deler av den norske konsekvensutredningsforskriften som vedrører bærekraft, samfunnsnytte og etikk er utenfor VKMs mandat, og er ikke vurdert av faggruppen. 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, 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 horisontal og vertikal genoverføring vurdert.

F₁-hybriden MON 87701 x MON 89788 er dannet ved tradisjonell kryssingsforedling mellom to innavlede linjer, avledet av de genmodifiserte soyalinjene MON 87701 og MON 89788.

Foreldrelinjene MON 87701 og MON 89788 er fremkommet ved *Agrobacterium*-mediert transformasjon av celler fra de kommersielle soyalinjene A5547 og A3244. Den innsatte genkonstruksjonen i MON 87701 inneholder en enkeltkopi av et modifisert *cry1Ac*-gen fra bakterien *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. Genet koder for δ -endotoksinet Cry1Ac som gir plantene resistens mot enkelte skadegjørere i ordenen *Lepidoptera*, eksempelvis *Anticarsia gemmatalis* ("velvetbean caterpillar"), *Pseudoplusia includens* ("soybean looper"), *Epinotia aporema* ("soybean anxil borer") og *Rachiplusia nu* ("sunflower looper").

Den innsatte genkonstruksjonen i MON 89788 inneholder en enkeltkopi av et modifisert *cp4 epsps*-gen. Genet koder for enzymet 5-enolpyruvylsikimat-3-fosfatsyntetase (CP4 EPSPS), som omdanner fosfoenolpyruvat og sikimat-3-fosfat til 5-enolpyruvylsikimat-3-fosfat, en viktig metabolitt i syntesen av aromatiske aminosyrer. I motsetning til plantens enzym er det bakterielle enzymet også aktivt ved nærvær av N-fosfonometyl glycin (glyfosat). De transgene plantene vil derfor tolerere høyere doser av herbicider med virkestoff glyfosat sammenlignet med konkurrerende ugras. Shikimatbiosynteseveien finnes hos alle planter, bakterier og sopp, men ikke hos dyr. Genkonstruksjonen inneholder også et optimalisert kloroplastoverføringspeptid (CTP2) fra *Arabidopsis thaliana*, som bidrar til å lokalisere proteinene til kloroplastene. MON 89788 er tidligere vurdert av VKM med hensyn på helserisiko (VKM 2007).

MON 87701 x MON 89788 inneholder ingen markørgener for antibiotikaresistens.

Soyahybrid MON 87701 x MON 89788

Olje fra soyahybriden MON 87701 x MON 89788 er primært tiltenkt brukt i matvareindustrien. I tillegg benyttes soyamel, proteinisolat, lecitin og rostet soyabønne som næringsmiddel og dyrefôr. Soyabønner inneholder antinæringsstoffer som trypsinhemmere 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).

Komparative analyser

Analysen av ernæringsmessige komponenter er i hovedsak utført i tråd med OECDs konsensusdokument for soya (OECD 2009). Det er påvist statistisk signifikante forskjeller mellom soyahybrid MON 87701 x MON 89788 og kontroll i enkeltparametere. Forskjellene er imidlertid ikke konsistente over forsøksfelt, og verdiene for de analyserte komponentene ligger innenfor typiske verdier for andre soyasorter som er rapportert i litteraturen, og innenfor variasjonsområdene til kommersielle referansesorter som er inkludert i søkers dokumentasjon. Faggruppen konkluderer med at forskjellene som er påvist ikke har ernæringsmessig betydning.

Faggruppen påpeker at søker ikke har foretatt analyser av fosfatider i lecitin. Det understrekes at konsensusdokumentet i størst mulig grad skal følges når det legges fram dokumentasjon på nivåene av næringsstoffer, antinæringsstoffer og metabolitter.

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

Feltforsøk over en vekstsesong viser signifikante forskjeller mellom MON 87701 x MON 89788 og umodifisert kontroll for enkelte av de agronomiske karakterene som er evaluert. Gjennomsnittsverdiene for disse karakterene ligger imidlertid innenfor variasjonsområdene for referansesortene som var inkludert i feltforsøkene. Søker viser til at forskjellene som er påviste er uten biologisk relevans, og konkluderer med morfologisk og agronomisk ekvivalens mellom den transgene linjen MON 87701 x MON 89788 og nær-isogen kontroll.

Toksisitet og allergisitet

Cry1Ac- og CP4-EPSPS-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 magesaft, samt at konsentrasjonene av Cry1Ac- og CP4-EPSPS-protein er svært lave (mindre enn 0,04 %), anser faggruppen det som lite trolig at disse proteinene medfører et signifikant større potensiale for utvikling av matallergi hos mennesker sammenlignet med umodifisert soya. Akutte føringstudier (oral sondeføring) på mus med reinfremstilt Cry1Ac- og CP4-EPSPS-protein og 42 dagers føringstudier med broilere viste ingen skadelige helseeffekter. Søker har ikke utført toksisitetsstudier på gnagere eller fisk med fôr som inneholder soya MON 87701 x MON 89788.

På bakgrunn fra forsøk med Cry1Ac- og CP4-EPSPS-proteinene som er dokumentert i denne søknaden, konkluderer faggruppen med at det er lite sannsynlig at eksponering for Cry1Ac- og CP4-EPSPS-proteinene i seg selv, og i de mengder som tilføres via fôr fra den genmodifiserte soyaen, vil føre til helseskade hos dyr.

Faggruppen har ikke vurdert problematikken knyttet til eventuell rester av glyfosat, metabolitten AMPA, eller andre nedbrytingsprodukter i mat- og fôrprodukter av soyahybriden MON 87701 x MON 89788. Slike vurderinger foretas av VKMs Faggruppe for plantevernmidler. Faggruppe for GMO legger imidlertid til grunn at produkter der verdiene ligger under grenseverdiene for akseptabelt daglig inntak, ikke innebærer endret helserisiko i forhold til annen soya.

Soyahybrid MON 87701 x MON 89788**Miljørisiko**

Søknaden gjelder godkjenning av soyahybriden MON 87701 x MON 89788 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 soyahybriden. Det er ingen indikasjoner på økt sannsynlighet for spredning, etablering og invasjon av soyahybriden 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.

NØKKELOORD

Soya, *Glycine max* (L.) Merr., genmodifisert soyahybrid, MON 87701 x MON 89788, EFSA/GMO/NL/2009/73, Cry1Ac, insektsresistens, CP4 EPSPS, herbicidtoleranse, 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	Antibiotikaresistensmarkørgen
Backcross (BC)	Tilbakekryssing. Kryssing mellom en hybridlinje (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 EPSPS	Glyfosattolerant EPSPS
<i>cp4 epsps</i>	DNA-sekvens fra <i>Agrobacterium</i> sp. stamme CP4, koder for CP4 EPSPS-protein.
Cry	Krystallproteiner (δ -endotoksiner) fra <i>Bacillus thuringiensis</i> .
Cry1Ac	Et Cry1-klasse krystallprotein fra <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>
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.
GAT	Glyfosatacetyltransferase-enzym
GLP	Good Laboratory Practices, retningslinjer for godt laboratoriearbeid.
Glyfosat	Bredspektret herbicid
GMO	Genmodifisert organisme
GMP	Genmodifisert plante
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.

Soyahybrid MON 87701 x MON 89788

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 lokus eller kromosom-segment.
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

BIDRAGSYTERE	2
VURDERT AV	2
SAMMENDRAG.....	3
NØKKELOD.....	5
FORKORTELSER OG ORDFORKLARINGER.....	6
INNHOLDSFORTEGNELSE.....	8
BAKGRUNN	10
OPPDRAK FRA DIREKTORATET FOR NATURFORVALTING OG MATTILSYNET	10
RISIKOVURDERING	11
1. Innledning.....	11
1.1. Beskrivelse av egenskap(er) og virkningsmekanismer	11
2. Molekylær karakterisering	12
2.1. Evaluering av foreldrelinjer	12
2.2. Hybriden MON 87701 x MON 89788	19
2.3. Delkonklusjon	22
3. Komparative analyser.....	23
3.1. Valg av komparator og forsøksdesign.....	23
3.2. Analyser av ernæringsmessige komponenter	23
3.3. Agronomiske egenskaper	29
3.4. Delkonklusjon	30
4. Dokumentasjon av toksisitet, allergenisitet og næringsverdi.....	30
4.1. Toksisitet	30
4.2. Allergenisitet	31
4.3. Delkonklusjon	32
5. Miljørisikovurdering	33
5.1. Potensiale for ikke tilsiktede effekter på fitness relatert til genmodifiseringen...	33
5.2. Potensiale for genoverføring	33
5.3. Miljøovervåkingsplan.....	35
5.4. Delkonklusjon	35
6. Vurdering av søkers dokumentasjon, kunnskapshull.....	35
KONKLUSJON	38
REFERANSER	40
VEDLEGG 1.....	43

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 soyahybriden MON 87701 x MON 89788 fra Monsanto (EFSA/GMO/NL/2009/73). MON 87701 x MON 89788 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 nederlandske myndigheter i august 2009. Dokumentasjonen knyttet til søknaden ble lagt ut på EFSAAs nettside GMO Extranet 8. desember 2009, med frist på 90-dager for innspill fra EU- og EØS/EFTA-landene. Norge har ikke tidligere uttalt seg om soyahybriden MON 87701 x MON 89788.

Foreldrelinjen MON 89788 ble søkt godkjent til bruk som mat og fôr, og til import og prosessering i 2006 (søknad EFSA/GMO/NL/2006/36), og ble godkjent av EU-kommisjonen i desember 2008. Foreldrelinje MON 87701 er ikke tidligere søkt godkjent for noen bruksområder i EU, og er ikke risikovurdert verken av EFSA eller VKM.

MON 87701 x MON 89788 er foreløpig ikke godkjent for kommersiell dyrking eller omsetning som mat og/eller fôr i noen land (Agbios 2010; EFSA/GMO/NL/2009/73). I følge søker er soyahybriden primært tenkt dyrket i Brasil og Argentina. Søknader om godkjenning av MON 87701 x MON 89788 for alle bruksområder er levert i USA, Brasil, Japan og Canada. I tillegg vil det bli søkt om godkjenning av MON 87701 x MON 89788 til import og bruk som mat og fôr i Kina, Australia, New Zealand, Filippinene, Mexico, Malaysia, Taiwan, Sør-Korea og Indonesia.

OPPDRA FRA DIREKTORATET FOR NATURFORVALTING OG MATTILSYNET

Mattilsynet og Direktoratet for naturforvaltning har i brev datert 12.5.2006 (ref. 2006/17817) og 3.7.2009 (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-nett.

Søknad EFSA/GMO/NL/2009/73, genmodifisert soyahybrid MON 87701 x MON 89788, ble lagt ut på EFSA-nett 8. desember 2009. Faggruppe for genmodifiserte organismer skal i tråd med oppdragsbrev utarbeide helse- og miljørisikovurdering av soyahybriden til import og industriell prosessering, samt til bruk som næringsmiddel og fôrvarer. Søknaden omfatter ikke dyrking. Vurderingen skal utføres i henhold til tiltenkt bruk og i overensstemmelse med prinsippene som er nedfelt i EFSAAs retningslinjer for vurdering av genmodifiserte planter ("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. Det skal også gis en samlet konklusjon om miljørisiko, i tråd med kravene i forskrift om konsekvensutredning etter genteknologiloven, vedlegg 2 C.

Produktet som ønskes vurdert

Genmodifisert soya, EFSA/GMO/NL/2009/73 (soya MON 87701 x MON 89788).

Unik kode: MON-877Ø1-2 x MON-89788-1

Status i EU: Søknad under 1829/2003/EF. EFSAAs frist for innspill er 7.3.10.

Ønsket svarfrist til Mattilsynet/DN er 4. mars 2010.

RISIKOVURDERING

1. Innledning

Risikovurderingen av den genmodifiserte soyahybriden MON 87701 x MON 89788 er i basert på dokumentasjon som er gjort tilgjengelig på EFSA's 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 utsetningsdirektiv 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 EFSA's retningslinjer for vurdering av genmodifiserte planter. Prinsippene som er lagt til grunn for vurderingen, er derfor hentet fra EFSA's 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 egenskap(er) og virkningsmekanismer

F₁-hybriden MON 87701 x MON 89788 er dannet ved tradisjonell kryssingsforedling mellom to innavlede linjer, avledet av de genmodifiserte soyalinjene MON 87701 og MON 89788.

Foreldrelinjene MON 87701 og MON 89788 er fremkommet ved *Agrobacterium*-mediert transformasjon av celler fra de kommersielle soyalinjene A5547 og A3244. Den innsatte genkonstruksjonen i MON 87701 inneholder en enkeltkopi av et modifisert *cryIAc*-gen fra bakterien *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. Genet koder for δ -endotoksinet Cry1Ac som gir plantene resistens mot enkelte skadegjørere i ordenen *Lepidoptera*, eksempelvis *Anticarsia gemmatilis* ("velvetbean caterpillar"), *Pseudoplusia includens* ("soybean looper"), *Epinotia aporema* ("soybean anvil borer") og *Rachiplusia nu* ("sunflower looper").

Den innsatte genkonstruksjonen i MON 89788 ("Roundup RReady2Yield soybean") inneholder en enkeltkopi av et modifisert *cp4 epsps*-gen. Genet koder for enzymet 5-enolpyruvylsiki-3-fosfat-3-kinase (CP4 EPSPS), som omdanner fosfoenolpyruvat og siki-3-fosfat til 5-enolpyruvylsiki-3-fosfat, en viktig metabolitt i syntesen av aromatiske aminosyrer. I motsetning til plantens enzym er det bakterielle enzymet også aktivt ved nærvær av N-fosfonometyl-glycin (glyfosat). De transgene plantene vil derfor tolerere høyere doser av herbicider med virkestoff glyfosat sammenlignet med konkurrerende ugras.

Uttrykket av *cp4 epsps*-genet reguleres av en kimær promotor bestående av enhancerelementer fra 35S-promotoren fra fikenmosaikkvirus og en *Tsfl*-promotor fra vårskrinneblom (*Arabidopsis thaliana*). Videre er det satt inn en ikke-translatert ledersekvens og intron fra *Tsfl*-genet for økt

Soyahybrid MON 87701 x MON 89788

uttrykk, samt et kloroplastoverføringspeptid (CTP2) fra *A. thaliana*, som bidrar til å lokalisere proteinene til kloroplastene.

2. Molekylær karakterisering

2.1. Evaluering av foreldrelinjer

2.1.1. Foreldrelinje MON 87701

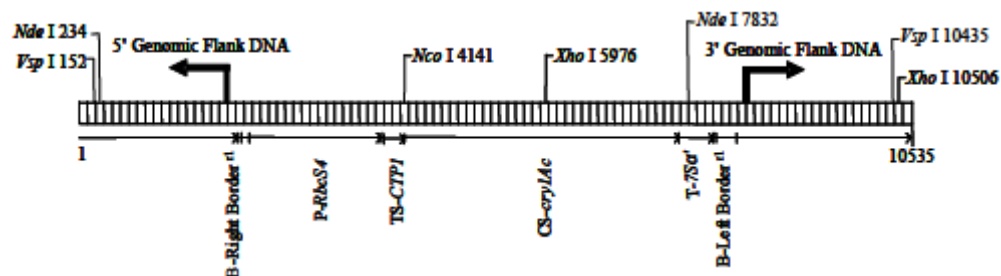
Transformasjonssystem og vektorkonstruksjon

MON 87701 er fremkommet ved *Agrobacterium*-mediert transformasjon av meristematisk vev fra den kommersielle soyalinjen A5547. Den binære vektoren PV-GMIR9, som inneholder to rekombinante DNA-fragmenter (T-DNA I og II), ble benyttet til transformasjonen. De rekombinante DNA-fragmentene inneholder henholdsvis en *cryIAc*-ekspressjonskassett (T-DNA I) og en *cp4 epsps*-ekspressjonskassett (T-DNA II). Ved transformasjonen ble ekspressjonskassetten satt inn som to uavhengige loki. Transformanter ble selektert ved at de overlevde og vokste i nærvær av virkestoffet glyfosat. Påfølgende innavl av F₁-generasjonen førte til at T-DNA I (*cryIAc*-kassetten) ble segregert fra T-DNA II (*cp4 epsps*-kassetten), og genotyper som inneholdt *cp4 epsps*-kassetten (T-DNA II) ble eliminert. Foreldrelinjen MON 87701 inneholder derfor bare ett rekombinant DNA-fragment med *cryIAc*-genkassetten (T-DNA I).

Karakterisering av geninnsettingen/genkonstruksjonen

CryIAc-ekspressjonskassetten inneholder to DNA-sekvenser fra vårskrinneblom (*Arabidopsis thaliana*). Vårskrinneblomsekvensene stammer fra genet *ribulose 1,5-difosfatkarboksylase* small subunit 1A (*RbcS4*-gen), promoter og ledersekvens *P-RbcS4*, samt N-terminal kloroplasttransittpeptid *TS-CTP*. *TS-CTP*-peptidet bidrar til å målrette uttrykket av CP4 EPSPS-proteinet til kloroplastene. Videre inneholder ekspressjonskassetten *cryIAc*-sekvenser, som er optimalisert for ekspresjon i enfrøbladet planter, og en 3' ikke-translatert sekvens (T-7S a') fra soya. Sekvensen avslutter transkripsjonen (se figur 1 og tabell 1 og 2). DNA-fragmentet inneholder ikke antibiotikaresistensgener.

Southern blot og PCR (sekvensanalyse) er benyttet for å karakterisere det rekombinante DNA-fragmentet i planten. Molekylærbiologisk karakterisering viser at det er satt inn bare 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. Rekombinant T-DNA I-fragment i soyaens genom.

Tabell 1. Beskrivelse av de innsatte genene.

*cryI*Ac-ekspressjonskassett

- | | |
|----------------------|--|
| a) <i>P-RbcS4</i> | promoter, ledesekvens og 5' ikke-translatert område fra vårskrinneblom (<i>Arabidopsis thaliana</i>)-genet <i>ribulose 1,5-difosfatkarboksylase (RbcS4)</i> , uttrykkes ikke i planten |
| b) <i>TS-CTP1</i> | N-terminal kloroplasttransittpeptid (<i>TS-CTP</i>) fra <i>RbcS4</i> -genet, overfører <i>cryI</i> Ac til kloroplast |
| c) <i>CS-cryI</i> Ac | gen som koder for et syntetisk Cry1Ac-protein, genet stammer av <i>Bacillus thuringiensis</i> |
| d) <i>T-7S a'</i> | 3' DNA sekvens som avslutter transkripsjonen, kommer fra soya, se tabell 2, uttrykkes ikke i planten |

Tabell 2. Størrelsesfordeling av gener og regulatoriske elementer i MON 87701

Genetic element ^{1, 2}	Location in sequence ³	Function and/or reference
Sequence flanking 5' end of the insert	1-2000	Soybean genomic DNA
B-Right Border ^{*1}	2001-2045	45 bp DNA region from the Right Border region remaining after integration (Depicker <i>et al.</i> , 1982)
IS	2046-2154	Sequence used in DNA cloning
<i>P- RbcS4</i>	2155-3877	Promoter, leader, and 5' non-translated region of the <i>Arabidopsis thaliana RbcS4</i> gene encoding ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase small subunit 1A (Krebbers <i>et al.</i> , 1988)
<i>TS-CTP1</i>	3878-4141	Targeting sequence encoding the transit peptide of the <i>Arabidopsis RbcS4</i> encoding small subunit 1A transit peptide, from <i>Arabidopsis thaliana</i> , present to direct the Cry1Ac protein to the chloroplast, (Krebbers <i>et al.</i> , 1988)
<i>CS-Cry1Ac</i>	4142-7678	Codon-modified coding sequence of the Cry1Ac protein of <i>Bacillus thuringiensis</i> (Fischhoff and Perlak, 1995)
IS	7679-7687	Sequences used in DNA cloning
<i>T-7S a'</i>	7688-8126	3' region of the <i>Sphas1</i> gene of <i>Glycine max</i> encoding the 7S a' seed storage protein, β-conglycinin, including 35 nucleotides of the carboxyl terminal β-conglycinin coding region with the termination codon and the polyadenylation sequence (Schuler <i>et al.</i> , 1982). The element functions to terminate transcription and direct polyadenylation of the mRNA.
IS	8127-8162	Sequence used in DNA cloning
B-Left Border ^{*1}	8163-8426	264 bp DNA region from the Left Border region remaining after integration (Barker <i>et al.</i> , 1983)
Sequence flanking 3' end of the insert	8427-10535	Soybean genomic DNA

¹ Flanking sequences and intervening sequences (IS) are not regarded as functional genetic elements.

² P - Promoter; I - Intron; CS - Coding Sequence; T - 3' non-translated transcriptional termination sequence and polyadenylation signal sequences; B - Border.

^{*1} Suscript in Left and Right Border indicates that the border sequences in MON 87701 are smaller than those in PV-GMIR9 plasmid due to the mechanism of *Agrobacterium* transformation.

³ Numbering refers to the sequence in Arackal *et al.* (2009).

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-GMIR9. Ett DNA-fragment på 6426 bp gjenfinnes som et enkelt lokus i soyaens genom.

Søker har sekvensert 2000 baser oppstrøms for 5'-enden og ca. 2100 baser nedstrøms for 3'-enden av innskuddet (se tabell 2). I henhold til søker er flankesekvensene brukt ved søk i siste versjon av "Genbank non-redundant cDNA nucleotide database" (oppdatert 2. mai 2009), og "Genbank public

Soyahybrid MON 87701 x MON 89788

non-redundant amino acid database” (oppdatert 28. april 2009). Søker har benyttet BLASTn og BLASTx algoritmer i sekvenssøkene. Søkene viser at flankesekvensene er soyasekvenser. DNA-analyser ved hjelp av Southern blot, DNA- sekvensanalyser, PCR og primere, som er spesifikke for sekvensene ved 5'-enden og 3'-enden for det transgene innskuddet, viser at under innsetningen av plasmidets rekombinante T DNA I-fragment ble 32 bp fjernet og 16 bp satt inn i 5'-enden til det rekombinante DNAet. Søker har også vist at T-DNA II, ”backbone” elementer og seleksjonsmarkørsekvenser fra plasmid PV-GMIR9 ikke er tilstede i genomet til MON 87701. Videre er det vist at insertet er stabilt over fem generasjoner. Søker konkluderer ut fra sine sekvensanalyser med at innsetningen av det rekombinante DNA-fragmentet ikke har ødelagte kode- eller regulatoriske sekvenser i området rundt innskuddet.

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

I dokumentasjonen fra søker presenteres resultater fra to proteinekspresjonsstudier med foreldrelinjen MON 87701. Feltforsøkene, som ligger til grunn for studiene, ble gjennomført på henholdsvis fem lokaliteter i USA i 2007 og fem lokaliteter i Argentina vekstsesongen 2007/2008 (tabell 3). Forsøkene ble lagt ut som fullstendig randomiserte blokkdesign med tre gjentak, og inkluderte foruten testlinjen MON 87701 (generasjon R₈ og R₉) en umodifisert kontroll med tilsvarende genetisk bakgrunn (A5547). I begge forsøksseriene ble det tatt prøver av bønne (frø), fôrfraksjon, røtter, samt blad på ulike tidspunkt gjennom vekstsesongen. I tillegg ble det i forsøkene i USA tatt prøver av pollen. Ekspresjonen av Cry1Ac-protein ble målt ved hjelp av enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Med unntak for røtter, ble det detektert Cry1Ac-protein i alle undersøkte vev. I de nordamerikanske forsøkene varierte nivåene av Cry1Ac mellom 340 µg pr. g tørrvekt (t.v.) i blad på vekststadium V14-V16, til 2,3 µg pr. g råvekt i pollen (tabell 3). Resultatene fra de argentinske forsøkene viser høyere konsentrasjoner av det transgene proteinet i blad tidlig i vekstsesongen. I motsetning til resultatene fra USA, ble nivåene av Cry1Ac her redusert utover i vekstsesongen.

Tabell 3. Nivå av Cry1Ac-protein i blad, hel plante, røtter, bønne og pollen fra MON87701 på ulike utviklingsstadier. Resultater fra feltforsøk i USA i 2007 og Argentina i 2007/2008.

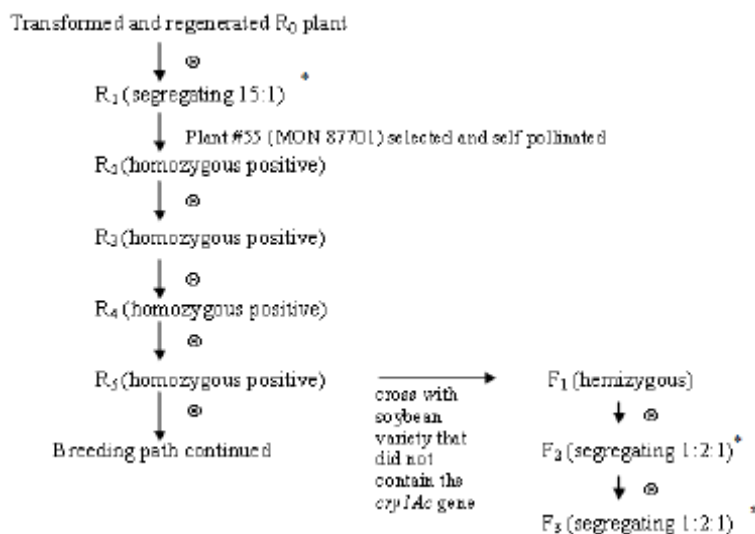
		USA	Argentina
Vevstype	Utviklingstrinn ¹	Gjennomsnitt (SD) Variasjonsområde (µg/g t.v.)	Gjennomsnitt (SD) Variasjonsområde (µg/g t.v.)
Blad	OSL-1 (V3-V4)	220 (70) 110-350	450 (77) 320-580
	OSL-2 (V6-V8)	260 (100) 130-500	290 (130) 150-580
	OSL-3 (V10-V12)	240 (110) 94-480	140 (52) 61-250
	OSL-4 (V14-V16)	340 (290) 78-960	180 (49) 78-250
Hel plante (fôr)	R6	29 (28) 8,2-95	70 (43) 10-150
Røtter R6	R6	LOD ²	LOD
Bønne	R8	4,7 (0,79) 3,4-5,7	5,1 (0,82) 3,9-6,7
		(µg/g råvekt.)	
Pollen	R2	2,3 (0,58) 1,8-3,1	Ikke analysert

1 Utviklingstrinnene er beskrevet i oversikten over ordforklaringer/forkortelser

2 LOD: 0,347 µg/g råvekt

Soyahybrid MON 87701 x MON 89788

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 er søkt etter seks potensielle åpne leserammer, dvs. i 5'- og 3'-flankerende områder. Det ble ikke påvist endogene åpne leserammer ved 5'-enden og i 3'-enden. For de seks åpne leserammene i endene av insertet er det undersøkt for polypeptider som er lik eller større enn 8 aminosyrer. Det er påvist 5 mulige polypeptider som kan uttrykkes fra hver ende av insertet. Det er utført teoretiske analyser av de 5 mulige polypeptidene fra hver leseramme 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.



Figur 2. Kryssingsskjema for generering av spaltingsdata fra MON 87701.

Nedarving og stabilitet av innsatt DNA

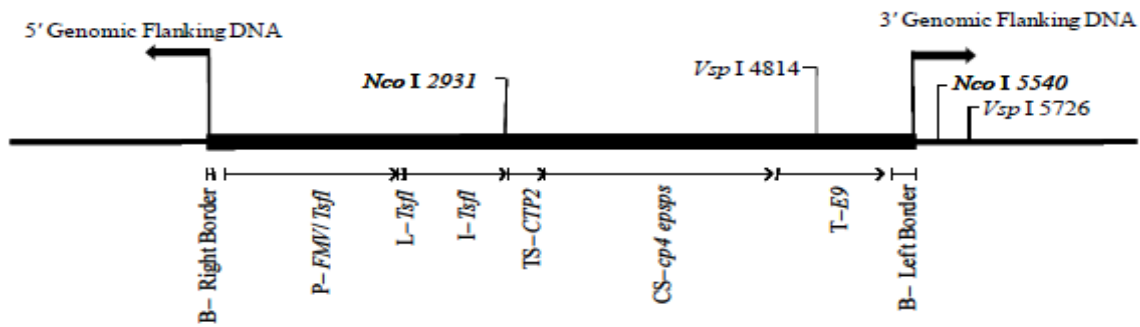
I henhold til dokumentasjonen fra søker er genetisk stabilitet undersøkt ved analyse av genomisk DNA fra fem ulike generasjoner (R₄, R₅, R₆, R₈, R₉). Resultatene fra Southern blot-analysene viser at det rekombinante DNA-innskuddet er integrert i genomet og nedarves stabilt over generasjoner. Fenotypisk stabilitet er vist ved spaltingsdata fra generasjonene R₁, F₂ og F₃ (se figur 2). Segregasjonsanalysene (chi-kvadrat-test) viser forventet spaltingsstall for insektsresistens, og det konkluderes med at rekombinante DNA-fragmentet følger mønsteret for mendelsk nedarving av et enkelt, dominant lokus.

2.1.2. Foreldrelinje MON 89788

Transformasjonssystem og vektorkonstruksjon

MON 88798 er fremkommet ved *Agrobacterium*-mediert transformasjon av meristematisk vev fra den kommersielle soyalinjen A3244. Plasmidet PV-GMGOX20 ble benyttet til transformasjonen. Ekspresjonskassetten i plasmidet inneholder et syntetisk *cp4 epsps*-gen, som koder for CP4 EPSPS-protein. Celler som hadde tatt opp det rekombinante fragmentet ble selektert på medium med glyfosat.

Den molekylærbiologiske karakteriseringen viser at det er satt inn ett rekombinant DNA-fragment i soyaen. Fragmentet inneholder kun en ekspresjonskasset.



Figur 3. Rekombinant DNA fragment i MON 89788, funksjonelt innskudd.

Tabell 4. Beskrivelse av de innsatte genene

Cp4 epsps-ekspresjonskasset

- | | | |
|----|---------------------|--|
| a) | <i>P-FMV/Tsfl</i> | promoter sammensatt av 35S promoter fra fiken-mosaikkvirus og promoter fra <i>Tsfl</i> -genet til vårskrinneblom (<i>Arabidopsis thaliana</i>) |
| b) | <i>L-Tsfl</i> | ledersekvens (ekson 1) fra vårskrinneblom uttrykkes ikke |
| c) | <i>I-Tsfl</i> | Intron fra <i>Tsfl</i> genet fra vårskrinneblom, uttrykkes ikke |
| d) | <i>TS-CTP</i> | kloroplast overføringspeptidsekvens fra <i>ShkG</i> genet til vårskrinneblom |
| e) | <i>CS-cp4 epsps</i> | syntetisk versjon av glyfosat resistensgenet <i>cp4 epsps</i> fra den gram-positive jordbakterien <i>Agrobacterium</i> sp. stamme CP4. Genet <i>cp4 epsps</i> uttrykker proteinet CP4 EPSPS. |
| f) | <i>T-E9</i> | terminatorsekvens fra E9-genet fra ert. Uttrykkes ikke i planten. |
-

Analyser av genomisk DNA fra MON 89788 med Southern- og Northern blot, ELISA og PCR viser at DNA-fragmentet i MON 89788 er stabilt inkorporert i plantens genom over mer enn fire generasjoner, og at *cp4 epsps*-genet er aktivt i blad, stengel, rot og bønner. Som vist i figur 3 inneholder det rekombinante DNA-fragmentet, som er satt inn i planten, et fullengde *cp4 epsps*-gen. Genomiske områder til soyaen som er sekvensert er 1103 bp i 5'- og 1060 bp i 3'-flankerende områder av det rekombinante fragmentet.

Molekylærbiologiske analyser viser at det rekombinante fragmentet i planten inneholder det samme genet og deler av andre genelementer som er på *cp4 epsps*-ekspresjonskassetten i plasmidet PV-GMGOX20. MON 89788 inneholder én kopi av det innsatte rekombinante DNA-fragmentet. Ekspresjonskassetten på det rekombinante DNA-fragmentet i MON 89788 uttrykker CP4 EPSPS protein som er identisk med proteinet som uttrykkes i bakterien. Undersøkelse av 5'- og 3'-flankesekvenser fra innsetningsstedet viser at *cp4 epsps*-kassetten ikke er integrert i et kjent kodingsområde i genomet, og det inaktiverer heller ikke områder med kjente regulatoriske sekvenser. Northern blot med hybridiseringsprober for å plukke ut spesifikke transkripsjonenheter fra flankeområdene ved innsetningsstedet, viser ikke uttrykk av eventuell kryptisk ekspresjon i blad, rot, stilk eller bønne.

Tabell 5. Størrelsesfordeling av gener og regulatoriske elementer i MON 89788.

Genetic element ^{1,2}	Location in sequence ³	Function and/or reference
Sequence flanking 5' end of the insert	1-1103	Soybean nuclear genomic DNA
B-Right border ^{*1}	1104-1145	DNA region from <i>Agrobacterium tumefaciens</i> containing the right border sequence used for transfer of the T-DNA (Depicker <i>et al.</i> , 1982)
IS	1146-1215	Sequences used in DNA cloning
P-FMV/Tsf1	1216-2255	Chimeric promoter consisting of enhancer sequences from the 35S promoter of the Figwort Mosaic Virus (Richins <i>et al.</i> , 1987) and the promoter from the Tsf1 gene of <i>Arabidopsis thaliana</i> encoding the elongation factor EF-1 alpha (Axelos <i>et al.</i> , 1989)
L-Tsf1	2256-2301	5' nontranslated leader (exon 1) from the Tsf1 gene of <i>Arabidopsis thaliana</i> encoding the elongation factor EF-1 alpha (Axelos <i>et al.</i> , 1989)
I-Tsf1	2302-2923	Intron from the Tsf1 gene of <i>Arabidopsis thaliana</i> encoding the elongation factor EF-1 alpha (Axelos <i>et al.</i> , 1989)
IS	2924-2932	Sequences used in DNA cloning
TS-CTP2	2933-3160	Sequences encoding the chloroplast transit peptide from the ShkG gene of <i>Arabidopsis thaliana</i> encoding EPSPS (Klee <i>et al.</i> , 1987)
CS-cp4 epsps	3161-4528	Codon optimized coding sequence of the <i>aroA</i> (<i>epsps</i>) gene from the <i>Agrobacterium</i> sp. strain CP4 encoding the CP4 EPSPS protein (Barry <i>et al.</i> , 1997; Padgett <i>et al.</i> , 1996)
IS	4529-4570	Sequences used in DNA cloning
T-E9	4571-5213	3' nontranslated sequence from the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit (<i>RbcS2</i>) E9 gene of pea (<i>Pisum sativum</i>) (Coruzzi <i>et al.</i> , 1984)
IS	5214-5256	Sequences used in DNA cloning
B-Left border ^{*1}	5257-5406	DNA region from <i>Agrobacterium tumefaciens</i> containing the left border sequence used for transfer of the T-DNA (Barker <i>et al.</i> , 1983)
Sequence flanking 3' end of the insert	5407-6466	Soybean nuclear genomic DNA

¹ Flanking sequences and intervening sequences (IS) are not regarded as functional genetic elements.

² B – Border; P – Promoter; L – Leader; I – Intron; TS – Targeting sequence; CS – Coding sequence; T – 3' nontranslated transcriptional termination and polyadenylation signal sequences.

^{*1} Subscripts in Left and Right Borders indicate that the sequences in MON 89788 are smaller than sequences in the PV-GMGOX20 plasmid, due to the mechanism of *Agrobacterium* transformation.

³ Numbers correspond to the sequence in Dickinson (2006).

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

I dokumentasjonen fra søker presenteres resultater fra tre proteinekspressjonsstudier med MON 89788. Feltforsøkene, som ligger til grunn for studiene, ble gjennomført på henholdsvis fem lokaliteter USA i 2005 og fem lokaliteter i Argentina vekstsesongene 2004/2005 og 2007/2008 (tabell 6). Forsøkene ble lagt ut som fullstendig randomiserte blokkdesign med tre gjentak, og inkluderte foruten testlinjen MON 89788, en umodifisert kontroll med tilsvarende genetisk bakgrunn (A3244).

I alle forsøksseriene ble det tatt prøver av bønne (frø), fôrfraksjon, røtter, samt blad på ulike tidspunkt gjennom vekstsesongen. Ekspressjonen av CP4 EPSPS-protein ble målt ved hjelp av enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Resultatene fra samtlige forsøksserier viser at det ble detektert CP4 EPSPS-protein i alle undersøkte vev og utviklingsstadier (tabell 6). Dette er som forventet siden *cp4 epsps*-genet er under kontroll av

Soyahybrid MON 87701 x MON 89788

en konstitutiv promotor. I de nordamerikanske forsøkene varierte nivåene av proteinet mellom 41 og 520 µg/g tørrvekt (t.v.), avhengig av vekststadium og vevstype. I gjennomsnitt over forsøkssteder varierte nivået av CP4 EPSPS-protein mellom 290 og 340 µg/g t.v. i blad, mens det i fôrfraksjon (hel plante), røtter og bønne ble målt mengder på henholdsvis 220, 74 og 150 µg/g t.v. Resultatene fra feltforsøk i Argentina viste i hovedsak tilsvarende uttrykk av CP4 EPSPS i de ulike vevene som ble undersøkte (tabell 6).

Tabell 6. Nivå av CP4 EPSPS-protein i blad, hel plante, røtter og bønne fra MON 89788 på ulike utviklingsstadier. Resultater fra feltforsøk i USA i 2005 og Argentina i vekstsesongene 2004/2005 og 2007/2008.

		USA	Argentina	
Vevstype	Utviklingstrinn ¹	Gjennomsnitt (SD) Variasjonsområde (µg/g t.v.)	Gjennomsnitt (SD) Variasjonsområde (µg/g t.v.)	
			2004/2005	2007/2008
Blad	OSL-1 (V3-V4)	300 (51) 220-380	280 (71) 140-370	380(66) 270-490
	OSL-2 (V6-V8)	340 (55) 250-440	340 (61) 250-440	400(90) 250-590
	OSL-3 (V10-V12)	330 (94) 200-520	310 (75) 200-420	260(71) 180-390
	OSL-4 (V14-V16)	290 (48) 210-390	460 (130) 250-780	430(87) 300-580
Hel plante (fôr)	R6	220 (51) 140-330	290 (25) 240-230	110(40) 56-210
	Røtter	R6	74(27) 41-150	100(26) 63-160
Bønne	R8	150 (22) 110-180	170 (33) 130-260	160(68) 38-300

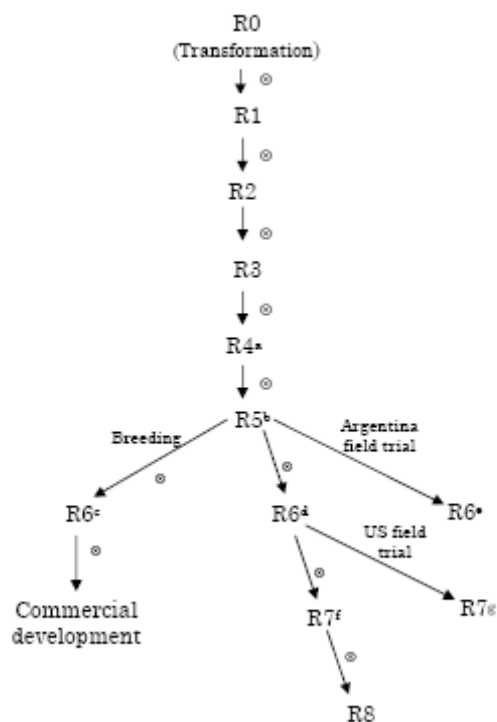
¹ Utviklingstrinnene er beskrevet i oversikten over ordforklaringer/forkortelser

I 2006 ble det er gjort studier for å påvise åpne leserammer i 5'- og 3' flankerende ende av det rekombinante DNA-fragmentet. Søker har sekvensert 1103 baser oppstrøms for 5'-enden og 1060 baser nedstrøms for 3'-enden av innskuddet. Det er søkt på seks potensielt åpne leserammer både i 5'- og 3' flankerende områder. Teoretiske analyser av mulige polypeptider fra hver leseramme v.h.a. allergen (AD6)-, toksin (TOXIN5)- og peptid (ALLPEPTIDES)-databasene viser ingen biologisk relevante strukturelle likheter til allergener, toksiner og farmakologiske aktive proteiner.

I 2009 utførte søker nye søk for om mulig å påvise om kodende sekvenser kan ha blitt ødelagt ved innsetting av det rekombinante DNA-fragmentet i soyaens genom. Det er gjort nye teoretiske analyser av mulige polypeptider fra hver leseramme v.h.a. allergen (AD_2009)-, toksin (TOX_2009)- og polypeptid (PRT_2009)-databasene studier for eventuelt å påvise endogene åpne leserammer i 5'- og 3' flankerende ende til det rekombinante DNA-fragmentet, eller om endogene åpne leserammer kan ha blitt ødelagt ved innsettingen av DNA-fragmentet. Resultatene fra disse teoretiske analysene viser tilsvarende resultat som studiene utført i 2006. Søkene i de oppdaterte databaser viste ingen biologisk relevante strukturelle likheter til allergener, toksiner eller farmakologiske aktive proteiner.

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 av MON 89788 (R₄-R₇) (figur 4). 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 generasjonene R₁, R₂ og R₃ (se figur 4). I henhold til søker ble R₀-generasjonen selvbefruktet og R₁-populasjonen evaluert med hensyn på glyfosattoleranse. Segregasjons-analysene (chi-kvadrat-test) viser forventet spaltningstall på 3:1 for den introduserte egenskapen. Herbicidtolerante R₁-planter ble selektert og innavllet, og analyser av de påfølgende generasjonene R₂ og R₃ bekreftet at 100 % av plantene uttrykte glyfosattoleranse. Det konkluderes med at det rekombinante DNA-fragmentet følger mønsteret for mendelsk nedarving av et enkelt, dominant lokus.



Figur 4. Kryssingsskjema for produksjon av soyalinje MON 89788.

2.2. Hybriden MON 87701 x MON 89788

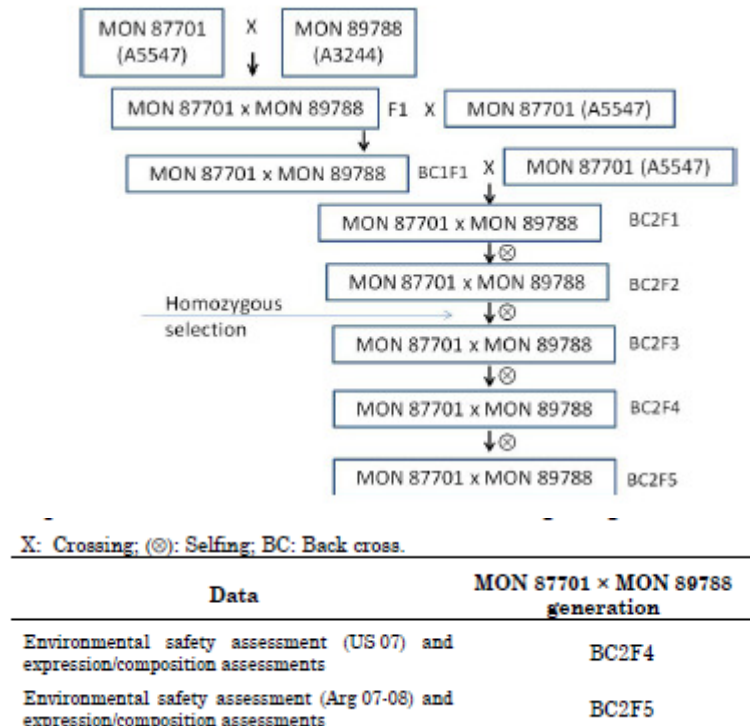
Molekylær karakterisering

Hybriden MON 87701 x MON 89788 er dannet ved konvensjonell kryssing mellom soyalinjene MON 87701 og 89788 (figur 5). Southern blot-analyse av DNA rensset fra blad fra MON 87701 x MON 89788 viser at de rekombinante fragmentene i planten inneholder de samme gener og genelementer som er satt inn i foreldrelinjene MON 87701 og MON 89788. Flankerende sekvenser til de rekombinante DNA-fragmentene i MON 87701 x MON 89788 er ikke sekvensert. Siden MON 87701 x MON 89788 er fremkommet ved konvensjonell kryssing mellom MON 87701 og MON 89788 hevder Monsanto at sekvensene i og rundt de respektive fragmentene er uendret. Det er ikke foretatt analyser av åpne leserammer hos MON 87701 x MON 89788

Analyser av enzymatisk aktivitet av CP4 EPSPS-proteinet, dokumentert i søknaden MON 89788 (EFSA/GMO/NL/2006/36), viser ingen forskjell mellom plante- og bakterieprodusert protein. Fordøyelighetstester har også vist at CP4 EPSPS-proteinet fordøyes raskt i simulert mage- og tarmsaft.

Soyahybrid MON 87701 x MON 89788

Fordøyelighetstest som er lagt ved søkers dokumentasjonen knyttet til MON 87701 (vedlegg dossier), viser at Cry1Ac-proteinet fordøyes raskt i simulert magesaft. Cry1Ac-proteinet består av en proteaseresistent og en proteasefordøyelig del. I insektarmen vil den proteasefordøyelige delen spaltes til aminosyrer, mens den resistente delen ikke blir fordøyd. I simulert tarmsaft fra mennesker fordøyes fullengdeproteinene raskt. Etter 24 timer er den proteaseresistente delen av proteinene spaltet i minst 3 deler.



Figur 5. Kryssingsskjema som viser produksjon av testlinje MON 87701 x MON 89788 for feltforsøkene i 2007/2008.

Informasjon vedr. uttrykk av introduserte gener

I henhold til dokumentasjonen fra søker er konsentrasjonen av proteinene Cry1Ac og CP4 EPSPS målt i feltforsøk i Argentina vekstsesongen 2007/2008. Forsøkene ble lagt ut på 5 ulike lokaliteter i representative områder for soyadyrking i provinsene Buenos Aires, Cordoba og Santa Fe. Forsøkene inkluderte foruten MON 87701 x MON 89788, foreldrelinjene MON 87701 og MON 89788 (positiv kontroll) og en umodifisert, kommersiell soyalinje (A5547), med tilsvarende genetisk bakgrunn som testlinjen (negativ kontroll). Forsøkene ble etablert som fullstendig randomiserte blokkdesign med 3 gjentak.

Ekspressjonen av proteinene ble målt ved hjelp av ELISA i ulike plantevev og på ulike vekststadier. Det ble tatt prøver av bladvev på fire utviklingsstadier, henholdsvis V3-V4, V6-V8, V10-V12 og V14-V16. Videre ble det analysert prøver av røtter og fôrfraksjon fra planter i stadium R6, og av frø (bønner) ved fysiologisk modning (R8). For nærmere beskrivelse av vegetative og reproduktive utviklingsstadier hos soya, se forkortelser og ordforklaringer.

Nivåene av Cry- og CP4 EPSPS-protein i ulike plantevev og utviklingsstadier er vist i tabell 7. I gjennomsnitt over forsøkssteder var konsentrasjonen av Cry1Ac høyest i unge blad (450 µg/g t.v.), mens nivået i fôrfraksjon og modne bønner ble målt til henholdsvis 81 og 7,9 µg/g t.v. Det ble ikke detektert Cry-protein i rotvev (LOD: 0,347 µg/g råvekt). Når det gjelder uttrykk av CP4 EPSPS-

Soyahybrid MON 87701 x MON 89788

protein, ble det i gjennomsnitt målt høyest konsentrasjoner av proteinet i unge blad (650 µg/g t.v.), mens det i frø, fôr og røtter ble målt henholdsvis 160, 120 og 52 µg/g t.v.

I følge søker var nivåene av målte proteinprodukter i vegetativt vev og frø i overensstemmelse med variasjonsområdene for de respektive foreldrelinjene. Konsentrasjonen av CP4 EPSPS-protein var imidlertid signifikant høyere i unge blad (V3-V4) fra hybridene sammenlignet med nivået i foreldrelinjen MON 89788. Det bemerkes også at nivået av Cry1Ac-protein i blad på utviklingstrinn V14-V16 og i moden bønne var henholdsvis om lag 100 % og 50 % høyere i MON 87701 x MON 89788 sammenlignet med foreldrelinjen MON 87701. I bønner fra MON 87701 x MON 89788 har søker beregnet mengdene av Cry1Ac- og CP4 EPSPS-protein til henholdsvis 0,002 % og 0,04 % av gjennomsnittlig proteinmengde.

Tabell 7. Nivå av Cry1Ac- og CP4 EPSPS-protein i MON 87701 x MON 89788 og foreldrelinjene MON 87701 og MON 89788 i ulike vev og utviklingsstadier. Fra feltforsøk i Argentina vekstsesongen 2007/2008.

Vevstype	Utvik. trinn ¹	Cry1Ac-protein		CP4 EPSPS-protein	
		Gjennomsnitt (SD) Variasjonsområde (µg/g t.v.)		Gjennomsnitt (SD) Variasjonsområde (µg/g t.v.)	
		MON 87701	MON 87701 x MON 89788	MON 89788	MON 87701 x MON 89788
Blad	OSL-1 V3-V4	450 (77) 320-580	450 (170) 240-870	380 (66) 270-490	650 (110) 480-890
	OSL-2 V6-V8	290 (130) 150-580	320 (92) 95-430	400 (90) 250-590	380 (78) 270-560
	OSL-3 V10-V12	140 (52) 61-250	190 (100) 65-430	260 (71) 300-580	260 (220) 110-960
	OSL-4 V14-V16	180(49) 78-250	350(130) 230-640	430(87) 300-580	460(85) 350-670
Røtter	R6	LOD	LOD	43 (14) 18-73	52 (12) 38-71
Hel plante (fôr)	R6	70 (43) 10-150	81 (55) 8,9-49	110 (40) 56-210	120 (31) 63-170
Bønne	R8	5,1 (0,82) 3,9-6,7	7,9 (2,3) 4,5-12	160 (68) 38-300	160 (82) 74-300

¹ Utviklingstrinnene er beskrevet i oversikten over ordforklaringer/forkortelser

Cry1Ac og CP4-EPSPS proteinet som uttrykkes i MON 87701 x MON 89788 er undersøkt med Western-blot analyse og densitometri, SDS-PAGE og densitometri, proteolytisk peptidkartlegging med MALDI-TOF MS analyse av peptider, N-enden sekvensering ved Edman-degradering. For Cry1Ac er det foretatt undersøkt med insektlarver for se på insekticidvirkning. Det ble konkludert med at toksinet ikke var forskjellig fra *E. coli*-produsert toksin. Disse analysene viser at Cry1Ac- og CP4-EPSPS- proteinet som produseres i soyaene er ekvivalent med Cry1Ac- og CP4-EPSPS-proteinene som produseres i *E. coli*. Det ble ikke påvist glykoliserings seter på proteinene.

Nedarving og stabilitet

Molekylærbiologiske analyser av F₁-hybriden viser at det er molekylær ekvivalens og identisk kopitall med de rekombinante DNA-innskuddene i de respektive foreldrelinjene. Søker konkluderer derfor med at er det svært sannsynlig de rekombinante innskuddene i hybridene er stabilt integrert i genomet. Videre viser Monsanto til at F₂-generasjonen som høstes, kun skal benyttes til mat, fôr og industriell

Soyahybrid MON 87701 x MON 89788

prosessering, og ikke inngå i videre foredlingsarbeid. Søker vurderer det derfor ikke nødvendig å undersøke stabilitet over generasjoner.

(I følge EFSA's retningslinjer vedrørende risikovurdering av GMP med stabile egenskaper (EFSA 2007), anbefales det at sammenligningen av de innsatte genkonstruksjonene i foreldrelinjene og den transgene hybridene foretas på representative materialer for det som skal benyttes i den kommersielle produksjonen, dvs. inngår i mat/fôrkjeden og/eller settes ut i miljøet).

2.3. Delkonklusjon

Den transgene soya hybrid MON 87701 x MON 89788 har fått tilført genene *cryIA*- og *cp4 epsps*. I henhold til søkers dokumentasjon vedrørende integreringsplass og flankesekvenser til de integrerte transgenene, samt analyser vha Southern blot er det grunn til å tro at transgenene sitter i hvert sitt lokus i genomet. Det konkluderes med at nedarvingen av *cryIAC*- og *cp4 epsps*-genet i soya hybrid MON 87701 x MON 89788 følger mønsteret for mendelsk nedarving av dominant lokus, og at fusjonsproteiner ikke uttrykkes i MON 87701 x MON 89788.

Faggruppen konkluderer med at karakterisering av de rekombinante innskuddene og de fysiske, kjemiske og funksjonelle karakteriseringene av MON 87701 x MON 89788 er tilstrekkelig for en helse- og miljørisikovurdering av soya hybrid.

3. Komparative analyser

3.1. Valg av komparator og forsøksdesign

I henhold til søkers dokumentasjon er den transgene soya hybrid MON 87701 x MON 89788 testet i en serie feltforsøk over en vekstsesong i sentrale dyrkingsområder for soya i USA og Argentina.

Feltforsøkene for komparative analyser av ernæringsmessige karakterer ble utført på henholdsvis fem lokaliteter i USA i 2007 og fem lokaliteter i Argentina i 2007/2008. Den konvensjonelle soyalinjen A5547, med tilsvarende genetisk bakgrunn som testlinjen men som ikke uttrykker Cry1Ac- og CP4 EPSPS-protein, ble benyttet som umodifisert kontroll i forsøkene. I tillegg var det inkludert 20 umodifiserte, kommersielle soyalinjer som referansesorter i forsøkene (fire 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. Forsøksruter med MON 87701 x MON 89788 ble behandlet med herbicider med virkestoff glyfosat en gang i løpet av vekstsesongen (Argentina 1,25 kg a.e./ha V6-V8; USA 0,74-0,86 kg a.e./ha V2-V6). 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.

Registreringer av agronomiske karakterer ble foretatt i feltforsøk i Argentina vekstsesongen 2007/2008. De åtte forsøksfeltene som inngikk i studien var lokaliserte i sentrale dyrkingsområder for soya i Argentina, områder der en forventer at den kommersielle produksjonen av MON 87701 x MON 89788 i hovedsak vil foregå. Hvert forsøksfelt bestod av randomiserte blokkdesign, med fire rep på tre av lokalitetene og tre rep på de øvrige fem forsøksstedene. Det ble benyttet fire kommersielt tilgjengelige soyasorter som referansemateriale på hver forsøkslokalitet, til sammen 20 ulike sorter. I tillegg ble A5547 benyttet som nær-isogen kontroll. Hver forsøksrute bestod av åtte planterækker, der registreringer av fenotypiske karakterer ble foretatt på av to av rekkene. I henhold til søkers dokumentasjon ble ikke forsøksruter med testlinjen MON 87701 x MON 89788 behandlet med glyfosat.

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

Med unntak for analyser av fosfatider i lecitin, er valg av analyseparametere gjort i henhold til OECDs konsensusdokument for soya (OECD 2009). Det er foretatt en rekke analyser av hovedkomponenter i fôr og bønne. Det er også foretatt analyser av 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).

Når det gjelder fôrfraksjonen ble det analysert for innhold av aske, fett, protein, kalorier, total fiber, vann, ADF (acid detergent fiber), NDF (neutral detergent fiber), og karbohydrater. Videre ble det foretatt analyser av følgende parametere i bønne: protein, fett, aske, karbohydrater, ADF, NDF, total

Soyahybrid MON 87701 x MON 89788

fiber, råfiber, vann, karbohydrater, aminosyrer (18), fettsyrer (C14-C22), fosfor, jern, kalium, kalsium, magnesium, totalmengde vitamin E, isoflavoner (daidzein, glycitein, genistein), oligosakkaridene raffinose og staktyose, sekundære metabolitter og anti-næringsstoffene (lektiner, trypsinhemmer, og fytinsyre).

Fôrfraksjon

I henhold til søker viser statistiske analyser over lokaliteter ingen signifikante forskjeller mellom MON 87701 x MON 89788 og den nærismetogene linjen for komponentene aske, fett, total fiber, ADF (acid detergent fibre), NDF (neutral detergent fibre) og karbohydrater i forsøkene fra USA (tabell 8). Det ble imidlertid funnet statistiske signifikante forskjeller mellom testlinjen og kontroll for protein ($p < 0,005$). I de argentinske analysene ble det funnet signifikante forskjeller for ADF ($p < 0,05$).

Tabell 8. Resultater fra analyser av fôrfraksjon fra soyahybriden MON 87701 x MON 89788 og kontrollinjen A5547. Fra feltforsøk i Argentina 2007/2008 og USA 2007.

Komponenter analysert (g/100 g tørrvekt)	Argentina 2007/2008		USA 2007	
	Gj.snitt [Variasjonsområde]		Gj.snitt [Variasjonsområde]	
	Isogen kontroll A5547	MON 87701 x MON 89788	Isogen kontroll A5547	MON 87701 x MON 89788
Vann	69,78 (62,76-72,79)	69,96 (60,23-73,41)	73,41 (69,4-78,1)	72,94 (70,2-76,4)
Aske	6,09 (5,56-6,53)	6,02 (5,20-6,69)	6,32 (5,10-8,13)	6,10 (4,79-8,05)
Fett	4,91 (3,73-7,22)	5,16 (3,87-7,06)	5,65 (4,23-7,23)	5,31 (3,78-6,88)
Protein	18,31 (14,93-20,38)	18,70 (16,70-20,45)	17,07 (14,20-23,3)	18,77 (13,17-24,94)
Karbohydrater	70,70 (66,44-73,87)	70,13 (66,53-73,41)	70,97 (63,68-74,26)	69,82 (64,17-75,00)
ADF	34,70 (29,71-46,90)	37,53 (30,32-46,11)	36,53 (27,42-42,06)	38,78 (31,47-48,03)
NDF	41,46 (35,55-50,64)	41,10 (35,58-48,01)	45,57 (34,24-64,19)	43,55 (32,07-61,02)

Soyabønne

Når det gjelder soyabønne er det foretatt analyser av komponentene vann, protein, fett, aske, ADF, NDF, råfiber og karbohydrater (tabell 9). Analysene ble utførte under god laboratoriepraksis (GLP). Det ble funnet signifikante forskjell mellom MON 87701 x MON 89788 og isogen kontroll for protein i USA ($p < 0,005$) og for aske i de argentinske feltforsøkene ($p < 0,005$).

Tabell 9. Resultater fra analyser av hovedkomponenter og fiber i bønner fra soyahybriden MON 87701 x MON 89788 og kontrollinjen A5547. Fra feltforsøk i Argentina 2007/2008 og USA 2007.

Komponenter analysert (g/100 g tørrvekt)	Argentina 2007/2008		USA 2007	
	Gj.snitt [Variasjonsområde]		Gj.snitt [Variasjonsområde]	
	Isogen kontroll A5547	MON 87701 x MON 89788	Isogen kontroll A5547	MON 87701 x MON 89788
Vann	10,04 (8.70 - 11.63)	9,85 (8.74 - 13.18)	6,84 (5.44 - 8.74)	7,48 (5.38 - 10.30)
Aske	4,92 (4.46 - 5.25)	4,77 (4.43 - 5.33)	5,14 (4.70 - 5.88)	5,04 (4.60 - 5.67)
Fett	18,41 (3,73-7,22)	18,13 (3,87-7,06)	20,12 (17.24 - 22.55)	19,98 (16.66 - 22.31)
Protein	18,31 (17.59 - 19.28)	18,70 (17.30 - 19.09)	17,07 (14,20–23,3)	18,77 (13,17-24,94)
Karbohydrater	38,78 (36.73 - 40.36)	38,67 (37.43 - 40.31)	37,80 (32.29 - 41.87)	39,75 (37.29 - 43.02)
ADF	14,88 (12.61 - 19.45)	15,12 (12.76 - 20.87)	15,62 (14.00 - 19.02)	15,91 (14.10 - 19.47)
NDF	16,23 (15.00 - 17.53)	15,70 (13.83 - 17.06)	17,28 (15.02 - 22.45)	17,06 (14.16 - 22.59)

Fettsyresammensetning i soyabønne

Fettsyresammensetningen i soyabønne er målt i henhold til OECDs konsensusdokument for soya (tabell 10). 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 14 fettsyrer (tabell 10). Innholdet av de enkelte fettsyrene ble sammenlignet både innen og over lokaliteter. Statistiske analyser over lokaliteter i USA viser signifikante forskjeller mellom testlinje og kontroll for fettsyrene palmitin, stearin, arakidon ($p < 0,005$), samt linolen ($p < 0,05$). Resultater fra forsøkene i Argentina viser signifikante forskjeller for parameterne stearin ($p < 0,005$) og linol og arakidon ($p \leq 0,001$). Resultatene viser imidlertid at forskjellene er 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.

Aminosyrer i soyabønne

I henhold til dokumentasjonen er innholdet av både essensielle og ikke-essensielle aminosyrer analysert (tabell 11). 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 ($p < 0,01$). Videre ble det påvist signifikante forskjeller for aminosyrene glutamin og leucin ($p < 0,05$) i prøver fra de argentinske feltene. Verdiene for alle aminosyrene ligger imidlertid innenfor typiske verdier som er rapportert i litteraturen og toleranseintervallene for referansesortene som inngikk i studien.

Soyahybrid MON 87701 x MON 89788

Tabell 10. Resultater fra analyser av de enkelte fettsyrene i prøver fra soyahybriden MON 87701 x MON 89788 og kontrollinjen A5547. Fra feltforsøk i Argentina 2007/2008 og USA 2007.

Komponenter analysert (g/100 g tørrvekt)	Argentina 2007/2008		USA 2007	
	Gj.snitt [Variasjonsområde]		Gj.snitt [Variasjonsområde]	
	Isogen kontroll A5547	MON 87701 x MON 89788	Isogen kontroll A5547	MON 87701 x MON 89788
14:0 Myristic Acid	0.084 [0.075 - 0.096]	0.085 [0.079 - 0.096]	0.094 [0.083 - 0.11]	0.091 [0.079 - 0.099]
16:0 Palmitic Acid	11.43 [10.80 - 12.04]	11.29 [10.63 - 11.84]	11.88 [11.50 - 12.13]	11.53 [11.16 - 11.99]
16:1 Palmitoleic Acid	0.087 [0.070 - 0.10]	0.087 [0.063 - 0.099]	0.095 [0.078 - 0.11]	0.091 [0.083 - 0.11]
17:0 Heptadecanoic Acid	0.11 [0.096 - 0.11]	0.11 [0.091 - 0.12]	0.093 [0.082 - 0.099]	0.090 [0.082 - 0.096]
18:0 Stearic Acid	4.98 [4.59 - 5.63]	4.71 [4.41 - 5.26]	4.70 [4.03 - 5.36]	4.26 [3.46 - 5.21]
18:1 Oleic Acid	18.73 [17.69 - 19.99]	18.45 [17.31 - 19.43]	22.71 [20.34 - 28.78]	23.09 [19.66 - 29.38]
18:2 Linoleic Acid	54.51 [53.20 - 55.53]	55.29 [53.85 - 56.44]	51.76 [47.18 - 54.07]	52.51 [48.35 - 55.13]
18:3 Linolenic Acid	8.97 [8.32 - 9.90]	8.93 [8.26 - 9.73]	7.11 [5.34 - 8.26]	6.81 [5.04 - 7.82]
20:0 Arachidic Acid	0.46 [0.42 - 0.55]	0.43 [0.38 - 0.49]	0.51 [0.41 - 0.57]	0.46 [0.37 - 0.55]
20:1 Eicosenoic Acid	0,15 [0.13 - 0.19]	0,15 [0.14 - 0.16]	0.23 [0.18 - 0.28]	0.24 [0.18 - 0.30]
20:2 Eicosadienoic Acid	0.046 [0.020 - 0.077]	0.043 [0.018 - 0.071]	0.042 [0.020 - 0.047]	0.042 [0.023 - 0.053]
22:0 Behenic Acid	0.44 [0.39 - 0.49]	0.42 [0.38 - 0.47]	0.54 [0.45 - 0.65]	0.54 [0.44 - 0.62]
10:0 Capric Acid			0.21 [0.16 - 0.26]	0.20 [0.13 - 0.27]
17:1 Heptadecenoic Acid			0.041 [0.019 - 0.047]	0.038 [0.019 - 0.049]

Tabell 11. Resultater fra statistiske analyser av de enkelte aminosyrer i prøver fra soyahybriden MON 87701 x MON 89788 og kontrollinjen A5547. Fra feltforsøk i Argentina 2007/2008 og USA 2007.

Komponenter analysert (g/100 g tørrvekt)	Argentina 2007/2008		USA 2007	
	Gj.snitt [Variasjonsområde]		Gj.snitt [Variasjonsområde]	
	Isogen kontroll A5547	MON 87701 x MON 89788	Isogen kontroll A5547	MON 87701 x MON 89788
Alanin	1.62 [1.43 - 1.75]	1.68 [1.59 - 1.81]	1.69 [1.59 - 1.82]	1.74 [1.68 - 1.92]
Arginin	2.67 [2.34 - 2.97]	2.76 [2.50 - 3.36]	2.58 [2.37 - 2.89]	2.67 [2.38 - 2.91]
Asperginsyre	4.75 [4.01 - 5.18]	4.99 [4.63 - 5.54]	4.85 [4.46 - 5.34]	5.02 [4.73 - 5.59]
Cystin	0.57 [0.46 - 0.69]	0.60 [0.52 - 0.68]	0.61 [0.56 - 0.69]	0.63 [0.49 - 0.74]
Glutamic Acid	7.19 [5.49 - 7.82]	7.61 [7.09 - 8.49]	7.53 [6.89 - 8.26]	7.82 [7.42 - 8.74]
Glycin	1.63 [1.42 - 1.77]	1.68 [1.57 - 1.95]	1.70 [1.64 - 1.85]	1.75 [1.64 - 1.91]
Histidin	1.04 [0.90 - 1.19]	1.06 [0.95 - 1.26]	1.08 [1.03 - 1.15]	1.11 [1.04 - 1.20]
Isoleucin	1.69 [1.41 - 1.84]	1.76 [1.66 - 1.96]	1.76 [1.64 - 1.96]	1.82 [1.70 - 2.03]
Leucin	2.81 [2.41 - 3.01]	2.91 [2.73 - 3.23]	2.94 [2.73 - 3.29]	3.05 [2.84 - 3.36]
Lysin	2.49 [2.22 - 2.75]	2.58 [2.33 - 2.87]	2.62 [2.42 - 2.91]	2.75 [2.51 - 3.04]
Methionin	0.50 [0.42 - 0.59]	0.52 [0.44 - 0.66]	0.53 [0.47 - 0.59]	0.54 [0.45 - 0.63]
Phenylalanin	1.90 [1.63 - 2.10]	1.96 [1.82 - 2.26]	2.04 [1.91 - 2.38]	2.13 [1.91 - 2.37]
Prolin	1.93 [1.71 - 2.06]	2.00 [1.87 - 2.23]	1.96 [1.85 - 2.12]	2.02 [1.88 - 2.22]
Serin	1.89 [1.51 - 2.06]	1.96 [1.85 - 2.26]	1.96 [1.87 - 2.13]	2.04 [1.91 - 2.23]
Threonin	1.47 [1.23 - 1.60]	1.52 [1.41 - 1.76]	1.55 [1.49 - 1.68]	1.60 [1.51 - 1.71]
Tryptophan	0.49 [0.41 - 0.51]	0.51 [0.47 - 0.52]	0.50 [0.46 - 0.53]	0.51 [0.47 - 0.55]
Tyrosin	1.01 [0.74 - 1.22]	1.03 [0.88 - 1.24]	1.10 [0.98 - 1.22]	1.11 [1.01 - 1.25]
Valin	1.81 [1.50 - 1.94]	1.88 [1.77 - 2.11]	1.86 [1.76 - 2.04]	1.92 [1.81 - 2.09]

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

Soyahybrid MON 87701 x MON 89788

soyabønne er en god kilde til vitaminene 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. Dokumentasjonen knyttet til foreliggende søknad inneholder kun analyser av vitamin E. Det er funnet signifikante forskjeller mellom testlinje og den næringsogene kontrollen for dette vitaminet ($p < 0.001$) (tabell 12). Verdiene er imidlertid innenfor typiske verdier som er rapportert i litteraturen og toleranseintervallene for referansesortene som inngikk i studien.

Tabell 12. Resultater fra statistiske analyser av vitamin E i prøver fra soyahybriden MON 87701 x MON 89788 og kontrollinjen A5547. Fra feltforsøk i Argentina 2007/2008 og USA 2007.

Komponenter analysert (mg/100g tørrvekt)	Argentina 2007/2008		USA 2007	
	Gj.snitt [Variasjonsområde]		Gj.snitt [Variasjonsområde]	
	Isogen kontroll A5547	MON 87701 x MON 89788	Isogen kontroll A5547	MON 87701 x MON 89788
Vitamin E	3.42 [2.87 - 4.11]	2.87 [2.39 - 3.41]	6.24 [4.88 - 7.94]	5.65 [3.80 - 7.56]

Mineraler

OECDs konsensusdokument har ikke satt opp mineraler som komponenter det skal måles for i soya (OECD 2009). Konsensusdokument 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. Søkers dokumentasjon inneholder ingen analyser av mineraler.

Isoflavoner (fytøstrogener)

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. Det er funnet statistisk signifikante forskjeller for enkelte av parametrene. Søker har kun beregnet totalmengdene for isoflavongruppene daidzeiner, genisteiner og glyciteiner over steder (tabell 13).

Tabell 13. Resultater fra statistiske analyser av ulike isoflavoner i prøver fra soyahybriden MON 87701 x MON 89788 og kontrollinjen A5547. Fra feltforsøk i Argentina 2007/2008 og USA 2007.

Komponenter analysert (g/100g tørrvekt)	Argentina 2007/2008		USA 2007	
	Gj.snitt [Variasjonsområde]		Gj.snitt [Variasjonsområde]	
	Isogen kontroll A5547	MON 87701 x MON 89788	Isogen kontroll A5547	MON 87701 x MON 89788
Daidzein	934.74 [826.96 - 1095.41]	1056.85 [930.62 - 1238.97]	604.88 [198.95 - 830.65]	760.48 [323.44 - 946.42]
Genistein	858.71 [757.45 - 976.36]	940.92 [820.27 - 1037.15]	594.58 [244.95 - 760.87]	712.36 [414.27 - 918.92]
Glycitein	184.78 [136.52 - 217.42]	175.79 [134.21 - 221.98]	156.93 [61.28 - 227.25]	161.51 [99.87 - 200.81]

Soyahybrid MON 87701 x MON 89788

Oligosakkarider og antinæringsstoffer

Valget av analyseparametere er gjort i henhold til OECDs konsensusdokument for soya (OECD 2009) (tabell 14). Når det gjelder parametrene raffinose, staktyose og lektiner er det funnet statistiske signifikante forskjeller mellom kontroll, ubehandlet - og herbicidbehandlet MON 87701 x MON 89788. Det påpekes imidlertid at verdiene for fytinsyre, raffinose og trypsinhemmer ligger utenfor typiske verdier som er rapportert i litteraturen, men innenfor referansesortene som inngikk i studien.

Tabell 14. Resultater fra statistiske analyser av oligosakkarider og antinæringsstoffer fra soyahybriden MON 87701 x MON 89788 og kontrollinjen A5547. Fra feltforsøk i Argentina 2007/2008 og USA 2007.

Komponenter analysert	Argentina 2007/2008		USA 2007	
	Gj.snitt (SD) [Variasjonsområde]		Gj.snitt (SD) [Variasjonsområde]	
	Isogen kontroll A5547	MON 87701 x MON 89788	Isogen kontroll A5547	MON 87701 x MON 89788
Lectin (H.U./mg råvekt)	3.46 (0.43) [1.60 - 8.39]	3.07 (0.42) [1.29 - 7.43]	0.72 (0.19) [0.28 - 1.28]	1.29 (0.19) [0.21 - 3.97]
Phytic Acid (% t.v.)	1.55 (0.12) [1.02 - 2.10]	1.46 (0.12) [1.02 - 1.99]	1.97 (0.12) [1.31 - 2.66]	1.87 (0.12) [1.41 - 2.26]
Raffinose (% t.v.)	1.15 (0.039) [0.98 - 1.29]	1.05 (0.039) [0.77 - 1.38]	1.34 (0.19) [0.43 - 1.85]	1.32 (0.19) [0.69 - 1.90]
Stachyose (% t.w.)	4.02 (0.11) [3.14 - 4.38]	3.82 (0.11) [3.36 - 4.24]	4.93 (0.63) [2.27 - 6.65]	4.70 (0.63) [2.77 - 6.12]
Trypsin Inhibitor (TIU/mg t.v.)	27.21 (1.42) [23.45 - 30.96]	27.81 (1.41) [21.43 - 34.37]	28.57 (1.24) [22.49 - 34.20]	27.07 (1.23) [23.43 - 34.78]

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.

Prosesserte produkter

Soyabønne blir prosessert til en rekke ulike formål, hovedsakelig fôr, olje og mel (OECD 2009) ([vedlegg 1](#)). Avfettet roset mel blir hovedsakelig benyttet til fôr, mens avfettet mel blir brukt som mat. De ulike proteinfraksjonene fra avfettet soyamel blir brukt i forskjellige matvarer for mennesker. Soyaolje brukes hovedsakelig i matvarer, som matolje og i salatdressing.

I dokumentasjonen fra Monsanto er det ikke presentert data fra prosesserte produkter.

Analyser av soyaolje

I dokumentasjonen fra Monsanto er det ikke presentert data fra analyser av soyaolje. I henhold til OECDs konsensusdokument (OECD, 2009) er soyaolje en god kilde til vitamin K.

Analyser av allergener fra soya.

I OECDs konsensusdokument for 2009 er et av kapitlene viet allergener i soya. Soyabønner inneholder ca. 16 proteiner som binder IgE (L'Hocine & Boye 2007), og disse betraktes som potensielle allergener. Både uraffinert og raffinert soyaolje er vist å inneholde allergene proteiner (Ramazzoti *et al.* 2008). OECDs konsensusdokument gir ingen anbefalinger med hensyn på analyser av mulige allergene proteiner i soya.

3.3. 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 basert på observasjoner over en vekstsesong. Fenotypiske karakterer som ble vurdert inkluderte kvantitative karakterer som vitalitet hos frøplanten, plantetetthet, plantehøyde, legde, tidlighet (målt som antall dager til 50 % blomstring), legde, frøstørrelse og frøavling. I tillegg ble det gjort observasjoner av ulike karakterer knyttet til resistens mot ulike biotiske (sjukdommer, skadedyr) og abiotiske stressfaktorer.

I henhold til søkers dokumentasjon er det foretatt statistiske analyser over lokaliteter for hver av de fenotypiske karakterene (tabell 15). 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. Basert på 15 av referansesortene (tre fra hver av de fem forsøksstedene) er 99 % toleranseintervall (95 % konfidens.) kalkulert.

Resultatene fra variansanalysen over forsøksfelt viser signifikante forskjeller mellom MON 87701 x MON 89788 og nær-isogen kontroll for sju av de observerte variablene ($p < 0,05$) (tabell 15). Plantetetthet tidlig og seint i vekstsesongen, testvekt og avling var signifikant høyere hos den transgene hybridene sammenlignet med umodifisert kontroll. Tilsvarende ble det dokumentert mindre legde, frøstørrelse og vanninnhold i frø hos testlinjen sammenlignet med kontroll. Analyser innen lokaliteter viste signifikante forskjeller for nevnte parametrene på fra 3 til 7 forsøkssteder. Det konkluderes imidlertid med at gjennomsnittsverdiene for disse karakterene ligger innenfor variasjonsområdene for referansesortene som var inkludert feltforsøkene. For de øvrige agronomiske karakterene ble det ikke påvist forskjeller mellom MON 87701 x MON 89788 og kontroll.

Tabell 15. Resultater fra variansanalyse over steder for fenotypiske og agronomiske karakterer for testlinjen MON 87701 x MON 89788, nær-isogen kontroll, samt kommersielle referansesorter. Fra feltforsøk i Argentina vekstsesongen 2007/2008.

Fenotypiske karakterer	MON 87701 x MON 89788		Kontroll		Test-kontroll	Referansesorter	
	Gj. snitt	SE	Gj. snitt	SE	p-verdi	Min.	Max-
Plantetetthet (V2-V4) (antall pl. i 2 av planterk.)	140,6* ¹	5,34	105,9	5,50	<.0001	103,8	204,0
Frøplantevitalitet (V2-V4) (1-9)	1,9	0,31	2,1	0,35	0,0539	1,0	6,0
Tidlighet (R1-R2) (antall dager til 50 % blomstring)	47,6	0,15	48,2	0,25	0,1082	39,0	52,3
Plantehøyde (R8) (cm)	96,6	2,70	95,3	3,39	0,6791	73,9	124,2
Legde (R8) (0-9)	2,4*	0,22	3,3	0,27	0,0132	0,5	6,7
Tap av knopper (R8) (0-9)	0,1	0,06	0,2	0,08	0,2914	0,0	0,7
Plantetetthet (R8)	130,0*	4,83	97,1	5,20	<.0001	86,0	190,3
Vanninnhold frø (høsting) (%)	10,9*	0,19	11,6	0,18	<.0001	9,4	13,2
100-frøvekt (g)	15,3*	0,20	16,0	0,23	0,0254	10,9	18,5
Testvekt (g/0,25 L)	171,8*	0,99	169,2	1,14	0,0006	157,0	181,4
Avling (tonn/ha)	2,8*	0,10	2,5	0,14	0,0027	1,3	3,7

¹*: $p < 0,05$

Soyahybrid MON 87701 x MON 89788

I henhold til søker ble seks karakterer knyttet til abiotisk stress og sjukdomsresistens evaluert på hver av de åtte forsøkslokalitetene fire ganger i løpet av vekstsesongen. Valg av skadegjørere og øvrige parametere ble valgt ut fra relevans i den enkelte region i den aktuelle dyringsperioden. Dokumentasjonen inkluderer ikke resultater fra disse observasjonene, og det er ikke utført statistisk analyse av dette datamaterialet. I henhold til søker ble det, med unntak av mottagelighet for mosaikkvirus ved en lokalitet en gang i løpet av vekstsesongen, ikke observert forskjeller mellom testlinje og kontroll for noen av karakterene som ble observert.

3.4. Delkonklusjon

Analyser av ernæringsmessige komponenter er i hovedsak utført i tråd med OECDs konsensusedokument for soya (OECD 2009). Det er påvist statistisk signifikante forskjeller mellom soyahybrid MON 87701 x MON 89788 og kontroll i enkeltparametere. Forskjellene er imidlertid ikke konsistente over forsøksfelt, og verdiene for de analyserte komponentene ligger innenfor typiske verdier for andre soyasorter som er rapportert i litteraturen, og innenfor variasjonsområdene til kommersielle referansesorter som er inkludert i søkers dokumentasjon. Faggruppen konkluderer med at forskjellene som er påvist ikke har ernæringsmessig betydning.

Faggruppen påpeker at søker ikke har foretatt analyser av fosfatider i lecitin. Det understrekes at konsensusedokumentet i størst mulig grad skal følges når det legges fram dokumentasjon på nivåene av næringsstoffer, antinæringsstoffer og metabolitter.

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

Feltforsøk over en vekstsesong viser signifikante forskjeller mellom MON 87701 x MON 89788 og umodifisert kontroll for enkelte av de agronomiske karakterene som er evaluert. Gjennomsnittsverdiene for disse karakterene ligger imidlertid innenfor variasjonsområdene for referansesortene som var inkludert feltforsøkene. Søker viser til at forskjellene som er påviste er uten biologisk relevans, og konkluderer med morfologisk og agronomisk ekvivalens mellom den transgene linjen MON 87701 x MON 89788 og nær-isogen kontroll.

4. Dokumentasjon av toksisitet, allergisitet og næringsverdi

4.1. Toksisitet

Akuttoral toksisitetsstudie på mus ved eksponering av renfremstilt Cry1A-c og CP4-EPSPS-protein

Monsanto har utført akutt-toksisk studie på mus med oral eksponering av Cry1Ac- og CP4-EPSPS-protein produsert av bakterien *E. coli*. Når det gjelder akutt oralstudie med Cry1Ac-protein henviser Monsanto til dokumentasjon knyttet til foreldrelinje MON 87701, som er lagt ved dossieret til MON 87701 x MON 89788 (se Annex 1 i dossieret). For akutt oralstudie med CP4 EPSPS-protein henviser Monsanto til andre EFSA-søknader for eksempel EFSA/GMO/NL/2006/36, Monsanto Company (2006). Forsøkene er utført i henhold til god laboratoriepraksis (GLP) (EU-direktiv 88/320/EC) og akutt oral toksisitetsretningslinjene fra U.S. EPA og OECD (U.S. EPA Health Effects Test Guidelines. OPPTS 870.1100; Acute Oral Toxicity (August 1998), OECD Guideline for Testing of Chemicals; Method No. 420: Acute Oral Toxicity-Fixed Dose Method; July 17, 1992). Hunn- og hannmus stamme Crl:CD-1, ble eksponert for henholdsvis 1290 mg og 572 mg Cry1Ac- og CP4-EPSPS-protein/kg kroppsvekt. Som kontroll ble det benyttet bovint serumalbumin (BSA) (1280 mg/kg kroppsvekt). Samtlige forsøksdyr ble observert for kliniske tegn på forgiftning over en periode på 15 dager. Observasjonene ble foretatt to ganger daglig på arbeidsdager og en gang daglig i helger.

Soyahybrid MON 87701 x MON 89788

Følgende parametre ble vurdert: "Unormal oppførsel ved håndtering", 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 Cry1Ac og CP4-EPSPS. Det ble imidlertid påvist statistisk signifikant redusert kroppsvekt hos hannmus, men ikke hos hunnmus. Monsanto har foretatt en ny studie på hannmus med 1460 mg Cry1Ac/kg kroppsvekt. Denne studien viste ingen redusert kroppsvekt hos dyr føret med transgent protein sammenlignet med kontrollgruppen. NOAEL for hann- og hunnmus ble satt til henholdsvis 1460 og 1290 mg Cry1Ac-protein/kg kroppsvekt. For BSA ble NOAEL satt til 572 mg/kg kroppsvekt.

Fôringforsøk på broiler

Søknaden inneholder dokumentasjon fra et 42-dagers fôringforsøk på Cobb x Cobb 500 broilere. Det ble benyttet totalt 900 dyr. Forsøksdyrene ble fordelt på 9 grupper med 100 dyr per gruppe, halvparten av hvert kjønn (MSL0021801). Soyabønner som ble benyttet i dette forsøket kommer fra feltforsøket utført i sesongen 2006/2007 i Santo Antonio de Posse. Dyrene ble føret med prosessert mel fra de transgene linjene MON 87701 og MON 87701 x MON 89788, kontrollinjen A5547, samt 6 umodifiserte kommersielle sorter. Soyamelet ble undersøkt for mykotoksiner og pesticider. Det ble ikke påvist mykotoksiner, organofosfater, organonitrogener, organoklorider eller metylkarbamater. I tidlig vekstfase (0-21 dager) var andelen soyamel i føret ca. 33 %, i mellomvekstfasen og avslutningsfasen (21-42 dager) ca. 30 %. Fôringforsøket ble utført i 2009. Følgende parameter 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 fôring med fôr som inneholdt MON 87701 x MON 89788 ble det påvist signifikante forskjeller mellom testhybriden og A5547 for vekt av leggmuskel hos hanndyrene. Tilsvarende forskjeller ble også funnet mellom testgruppen og de seks umodifiserte kontrollene. Det ble imidlertid ikke påvist tilsvarende forskjeller mellom gruppene hos hunnbroiler, eller ved fôring med foreldrelinjen MON 87701. Det ble ellers ikke påvist andre statistisk signifikante endringer ved fôring med soyamel fra MON 87701 x MON 89788 og MON 87701 sammenlignet med A5547 og de umodifiserte kontrollene.

Fôringforsøk på rotter - 14 dager

Det er ikke utført 14 dagers fôringforsøk på gnagere med Cry1Ac- og CP4-EPSPS-protein.

Fôringforsøk på rotter -90 dager

Monsanto har ikke utført 13 ukers toksisitetstest på gnagere med fôr som inneholder mel fra MON 87701 og MON 87701 x MON 89788. I henhold til søker er det historisk sett ikke påvist helseskade på mennesker og dyr av de(t) transgene protein(ene) i MON 87701 og MON 87701 x MON 89788, og derfor ikke nødvendig å utføre 90 dagers fôringforsøk med de transgene plantene.

4.2. Allergenitet*Cry1Ac- og CP4-EPSPS- protein*

Med enkelte unntak, er proteiner som er matallergener generelt varme- og syrestabile. Proteinene er stabile både overfor mage- og tarmsafter, og er ofte hovedprotein-komponenter i matvaren. Typiske mengder er fra 1 til 80 % av proteininnholdet. Cry1Ac-proteinet som er benyttet i undersøkelsene for allergenitet er produsert av bakterien *E. coli*. Proteinet er modifisert slik at det er identisk med proteinet som er i MON 87701 og MON 87701 x MON 89788. Cry1Ac er testet i simulert mage (SGF)- og tarmsaft (SIF). SGF- og SIF-testene er dokumentert i MON 87701-dossieret. MON 87701-dossieret er lagt ved som vedlegg til MON 87701 x MON 89788 dossieret. Mengde Cry1Ac i SGF- og SIF-analysene var henholdsvis 176 µg og 280 µg. Nedbrytning av bakterielt produsert Cry1Ac i SGF ved pH 2 er hurtig, og Cry1Ac protein ble degraderer fullstendig innen 30 sekunder.

Soyahybrid MON 87701 x MON 89788

Påvisningsgrensen med fargestoffet Brilliant Blue G på SDS-PAGE gel er 0,0025 µg. Cry1Ac-proteinet ble fragmentert innen 5 minutter i SIF (pH 7,5). Den trypsinresistente delen av proteinet var stabilt i mere enn 24 timer. Påvisningen av Cry1Ac og fragmenter fra proteinet er utført med Western-blot ved bruk av antistoff mot proteinet. Søker hevder med grunnlig i disse testene at proteinet også brytes raskt ned i menneskets mage- og tarmkanal. For nedbrytning av CP4-EPSPS i SGF og SIF henviser søker til studier utført i andre søknader.

Søkers dokumentasjon inkluderer en undersøkelse av glykosylering av Cry1Ac-proteinet. Når det gjelder glykosylering av CP4 EPSPS-protein henvises det til andre søknader fra Monsanto. Cry1Ac-protein ble renfremstilt fra 1 kg frø (bønne) fra MON 87701-planter. Analyse av eventuelle bundne suktermolekyler på Cry1Ac-protein ble foretatt med en metode fra firmaet Molecular Probe. Det ble ikke påvist suktermolekyler på Cry1Ac-proteinet.

På bakgrunn av at det ikke ble funnet sekvenshomologi til allergene proteiner, glykosylerings seter på Cry1Ac-proteinet, samt at mengden av Cry1Ac-protein i bønner fra MON 87701 og MON 87701 x MON 89788 er målt til henholdsvis ca. 0,0013 % og 0,002 % av totalt proteininnhold, konkluderes det med at det er lite sannsynlig at Cry1Ac-proteinet vil utgjøre et allergent potensiale for mennesker.

Bt-proteiner

Flesteparten av *Bt*-plantevernmidler inneholder krystalltoksiner (protoksin) og levende sporer fra *Bt*-bakterien (EHC 1999). Laboratoriestudier med pattedyr indikerer ingen potensielle allergiske reaksjoner mot *Bacillus thuringiensis* eller dets komponenter, innbefattet delta (δ)-endotoksinet i krystallproteinene (EHC 1999). Til tross for vel 50 års bruk av plantevernmidler med *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* er det med ett unntak, ingen bekreftede rapporter over øyeblikkelige eller forsinkede allergiske reaksjoner. Dette til tross for betydelig human oral-, dermal- og inhalasjonseksponering (EHC 1999). Helseundersøkelse av en liten gruppe gårdsarbeidere (48 arbeidere) som brukte *Bt*-plantevernmidler viste ved hudtesting statistisk signifikant reaksjon mot *Bt*-sporeekstrakter i forhold til lav- og medium *Bt*-eksponeringsgrupper (Bernstein *et al.* 1999). Lav- og medium-eksponeringsgruppene var ikke i direkte kontakt med *Bt*-plantevernmidler. Positiv hudtest mot *Bt* pro-δ-endotoksiner ble også påvist hos to arbeidere i gruppen som brukte *Bt*-plantevernmidler (Bernstein *et al.* 1999).

4.3. Delkonklusjon

Cry1Ac- og CP4-EPSPS-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 magesaft, samt at konsentrasjonene av Cry1Ac- og CP4-EPSPS-protein er svært lave (mindre enn 0,04 %), anser faggruppen det som lite trolig at disse proteinene medfører et signifikant større potensiale for utvikling av matallergi hos mennesker sammenlignet med umodifisert soya. Akutte fôringsstudier (oral sondefôring) på mus med renfremstilt Cry1Ac- og CP4-EPSPS-protein og 42 dagers fôringsforsøk med broilere viste ingen skadelige helseeffekter.

Søker har ikke utført toksisitetsstudier på gnagere eller fisk med fôr som inneholder soya MON 87701 x MON 89788.

På bakgrunn fra forsøk med Cry1Ac- og CP4-EPSPS-proteinene som er dokumentert i denne søknaden, konkluderer faggruppen med at det er lite sannsynlig at eksponering for Cry1Ac- og CP4-EPSPS-proteinene via fôr fra den genmodifiserte soyaen, vil føre til helseskade hos dyr.

5. Miljørisikovurdering

Monsanto sin søknad om godkjenning av den transgene soyahybriden MON 87701 x MON 89788 under forordning 1829/2003/EF omfatter bruksområdene næringsmidler, fôrvarer, import og prosessering. Søknaden gjelder ikke dyrking. Miljørisikovurderingen av MON 87701 x MON 89788 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.

5.1. Potensiale for ikke tilsiktede 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 reproducere.

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 soyahybriden MON 87701 x MON 89788 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 87701 x MON 89788 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. De innsatte genene i planten har sin opprinnelse fra jordbakterier og sekvenshomologi vil derfor være stor i forhold til disse. I hvilken grad det forekommer tilfeldig sekvenshomologi mellom plantetransgener og andre naturlig forekommende bakterier er usikkert, men siden de fleste transgenene inneholder rekombinerte DNA sekvenser fra jordbakterier kan dette ikke utelukkes (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 87701 x MON 89788 vil etableres stabilt i genomet til mikroorganismer i miljøet eller i fordøyelseskanalen hos mennesker eller dyr. Ut fra tilgjengelig kunnskap og begrensinger i metodikk (Nielsen & Townsend 2004) kan det ikke utelukkes at horisontal genoverføring vil skje.

5.2.2. Vertikal genoverføring

Soya dyrkes ikke i Norge, og arten har ikke viltvoksende populasjoner eller nærstående arter utenfor dyrking i Europa. Utsiktet 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 87701 x MON 89788 og konvensjonelt foredlete soyasorter i dyrkingsområder for soya i Europa vil avhenge av utsiktet 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. Herbicidtoleranse vil ikke representere noen selektiv fordel for spredning av soya i Europa.

5.2.3. Samspill mellom GMP og målorganismer og ikke-målorganismer

Ikke relevant.

5.3. Miljøovervåkingsplan

I følge direktiv 2001/18/EF, annekse VII, er formålet med overvåkingsplanen 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/NL/2009/73 omfatter ikke dyrking, og potensiell miljøeksponering av den transgene soya hybrid 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. 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 87701 x MON 89788 anser Faggruppe for GMO at det ikke er behov for å iverksette særskilt program for overvåking av soya hybrid.

5.4. Delkonklusjon

Søknaden gjelder godkjenning av soya hybrid MON 87701 x MON 89788 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 fôret med genmodifisert soya.

Det er ingen indikasjoner på økt sannsynlighet for spredning, etablering og invasjon av soya hybrid 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

Adjuvans (fremming av immunreaksjon mot andre stoffer)

Det har ikke vært utført immunologiske studier med de transgene produktene. Det er vist at Cry1Ac-proteinet binder seg til musetarmoverflaten (Vazquez-Padron *et al.* 2000a) og induserer immunologiske reaksjoner mot seg selv og mot proteiner gitt samtidig (Vazquez *et al.* 1999). 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 (Vazquez-Padron *et al.* 2000b). I en annen studie er det vist at Cry1Ac hadde utpreget mucosal adjuvanseffekt ved å potensere IgM-, IgG- og IgA-responsen mot hepatittvirusantigen og

Soyahybrid MON 87701 x MON 89788

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 ved intranasal og intraperitoneal immunisering 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.

I en senere studie av Guimaraes *et al.* 2008 (Guimaraes *et al.* 2008) undersøkte man adjuvanseffekter av Cry1Ab i forbindelse med allergisk sensibilisering overfor peanøttekstrakt (PE). Koleratoksin (CT), som er en kjent Th2 adjuvant, ble benyttet for sammenligning. I disse forsøkene ble det ikke induisert spesifikk IgE ved bruk av Cry1Ab som adjuvant, mens induksjon av spesifikk IgE ble påvist ved bruk av CT som adjuvant. Imidlertid viste den samme undersøkelsen at når PE ble gitt sammen med Cry1Ab så medførte dette at når musene på et senere tidspunkt ble provosert med PE så økte produksjon av leukotriener (CTC4 og CTE4) i bronkiene umiddelbart. I tillegg ble det 36 timer etter provokasjonen målt økt produksjon av Th2- og Th17 cytokiner og økt influks av neutrofiler og eosinofiler. Det ble dermed konkludert med at Cry1Ab har en adjuvant effekt i forhold til allergi.

Det gjennomsnittlige inntaket av tørket soyabønne er beregnet av Monsanto Company (tabell 16). Det daglige inntaket av disse matvarene i Europa er beregnet som g/person/dag, mens 97,5 persentilen for høyt inntak på verdensbasis er beregnet som g/kg kroppsvekt/dag.

Tabell 16. Estimater over inntak av soya fra WHO GEMS/Food Programme

	DAGLIG INNTAK (g/person/dag)			HØYT INNTAK (g/kg kroppsvekt/dag)	
	Gjennomsnittlig inntak per capita i EU			Høyest 97,5 persentil	
Råvare	Cluster B (Sør-Europa)	Cluster E (Sentral-Europa)	Cluster F (Nord-Europa)	Generell befolkning	Barn ≤ 6 år
Soyabønne (tørr)	36,4	35,3	39,2	3,03	5,55

Kilde: Monsanto Company, søknad EFSA/GMO/NL/2009/73.

Spesielle målgrupper, som barn, har et større inntak av soya enn det beregnede gjennomsnittlige inntaket på verdensbasis (tabell 16). Det estimerte inntaket for store porsjoner, 97,5 persentil, for barn under 6 år er beregnet til 5,55 g/kg kroppsvekt/dag, mens inntaket for den generell befolkningen er beregnet til 3,03 g/kg kroppsvekt/dag. Teoretiske beregninger fra søker viser at dersom hele soyainntaket (97,5 persentilen) kommer fra MON 87701 eller MON 87701 x MON 89788 vil dette kunne medføre et inntak på henholdsvis 23,9 - og 43,9 µg/kg kroppsvekt/dag for barn og voksne. Den totale inntaksmengden av Cry1Ac for et voksent individ som veier 60 kg og et barn på 6 års som veier 21 kg, vil bli henholdsvis ca. 1400 - og 920 µg/dag. For de estimerte inntaksmengdene av Cry-protein som er presentert her er det ikke tatt hensyn til eventuelle nedbrytning av proteinet ved prosessering. De estimerte inntaksmengdene av Cry-protein antas å representere den høyest tenkelige mengden. Tilsvarende konsentrasjoner av Cry1Ac som er vist å gi mucosal adjuvanseffekt ved sondefôring av mus er fra 0,1 µg til 100 µg per mus (Vazquez *et al.* 1999).

Adjuvansdosene som benyttes for immunisering av mus og mennesker i andre sammenhenger (ved injeksjoner) er ofte av samme størrelsesorden, det vil si at om lag samme dose (ca. 10 µg) brukes til mus og menneske. Det er tvilsomt om denne sammenligningen kan overføres til tarmimmunisering siden den effektive konsentrasjonen av Cry-protein/tarmareal vil bli langt lavere hos menneske enn mus. Teoretisk sett kan konsentrasjonen av Cry1Ac i soya føre til økt utvikling av allergi mot matvarer spist sammen med soyaen, foruten mot soya i seg selv. Matallergi mot soya er vanlig, og er et problem

Soyahybrid MON 87701 x MON 89788

i noen områder, bl.a. Nord-Italia. 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.

Et realistisk inntak av Cry-protein vil være vesentlig lavere enn de mengdene som er angitt ovenfor. Soya er en bulkvare hvor flere typer soya fra mange åkre samles i felles siloer før videre prosessering. Man vil således aldri spise 100 % MON 87701 og MON 87701 x MON 89788. Stort sett spiser vi prosessert soyaprodukter hvor, i mange tilfeller, Cry-proteinet er helt eller delvis degradert eller er fjernet. Søker oppgir at Cry1Ac -proteinet brytes raskt ned i magesaft. Eksponering av tarmepitel for Cry1Ac-proteinet forventes dermed å være marginal.

Cry proteiner er ikke varmemestabile. I maisgrøt er det for eksempel vist at konsentrasjonen av Cry1Ab ble redusert med 90 % etter 3 minutters oppvarming ved 75 °C. Proteinet kunne ikke påvises etter steking av tortillas ved 190 °C i 10 s (de Luis *et al.* 2009). Dette innebærer igjen at eksponering av tarmepitel for Cry proteiner vil være marginal hvis maten er kokt eller stekt.

Induksjon av IgE er ikke vist for Cry1Ac Det finnes lite litteratur på området omkring betydning av adjuvanter for induksjon av IgE-mediert allergisk respons. Den foreliggende litteratur tyder i flere tilfeller på at betydningen er liten. I en musemodell for allergiutvikling mot lupin ga bruk av koleratoksin (CT) økt immunrespons for andre klasser av immunglobuliner, men ingen IgE respons. Forfatterne antyder at IgE-respons er mer avhengig av indre egenskaper ved allergenene, og ikke relatert til CT-adjuvans (Foss *et al.* 2006). I en lignende rottemodell viste CT også kun en begrenset effekt på utvikling av peanøttallergi (de Jonge *et al.* 2007). De Jonge *et al.* viste også at det var krevende å klare å indusere allergi i rottene. Rotter som gikk på streng diett i 3 generasjoner ga IgE respons, mens rotter som gikk på allergenfri diett i én generasjon ga ikke IgE respons etter indusering. Disse forsøkene indikerer en begrenset betydning av adjuvans for utvikling av IgE-mediert allergi. Utvikling av matallergi skyldes et komplekst samspill av faktorer som genetisk predisposisjon, alder ved introduksjon av allergenet, amming, sammensetning av ernæring, sammensetning av tarmfloraen og infeksjonsstatus i mage-tarmsystemet (van Wijk & Knippels 2007).

Innspill til EFSA GMO Extranett

VKMs Faggruppe for GMO har ikke levert innspill til EFSA GMO Extranett i tilknytting til denne søknaden.

KONKLUSJON

Analysen av ernæringsmessige komponenter er i hovedsak utført i tråd med OECDs konsensusdokument for soya (OECD 2009). Det er påvist statistisk signifikante forskjeller mellom soyahybrid MON 87701 x MON 89788 og kontroll i enkeltparametere. Forskjellene er imidlertid ikke konsistente over forsøksfelt, og verdiene for de analyserte komponentene ligger innenfor typiske verdier for andre soyasorter som er rapportert i litteraturen, og innenfor variasjonsområdene til kommersielle referansesorter som er inkludert i søkers dokumentasjon. Faggruppen konkluderer med at forskjellene som er påvist ikke har ernæringsmessig betydning.

Faggruppen påpeker at søker ikke har foretatt analyser av fosfatider i lecitin. Det understrekes at konsensusdokumentet i størst mulig grad skal følges når det legges fram dokumentasjon på nivåene av næringsstoffer, antinæringsstoffer og metabolitter.

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

Cry1Ac- og CP4-EPSPS-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 magesaft, samt at konsentrasjonene av Cry1Ac- og CP4-EPSPS-protein er svært lave (mindre enn 0,04 %), anser faggruppen det som lite trolig at disse proteinene medfører et signifikant større potensiale for utvikling av matallergi hos mennesker sammenlignet med umodifisert soya. Akutte fôringsstudier (oral sondefôring) på mus med reinfremstilt Cry1Ac- og CP4-EPSPS-protein og 42 dagers fôringsforsøk med broilere viste ingen skadelige helseeffekter.

Søker har ikke utført toksisitetsstudier på gnagere eller fisk med fôr som inneholder soya MON 87701 x MON 89788.

På bakgrunn fra forsøk med Cry1Ac- og CP4-EPSPS-proteinene som er dokumentert i denne søknaden, konkluderer faggruppen med at det er lite sannsynlig at eksponering for Cry1Ac- og CP4-EPSPS-proteinene i seg selv, og i de mengder som tilføres via fôr fra den genmodifiserte soyaen, vil føre til helseskade hos dyr.

Faggruppen har ikke vurdert problematikken knyttet til eventuell rester av glyfosat, metabolitten AMPA eller andre nedbrytingsprodukter i mat- og fôrprodukter av soyahybriden MON 87701 x MON 89788. Slike vurderinger foretas av VKMs Faggruppe for plantevernmidler. Faggruppe for GMO legger imidlertid til grunn at produkter der verdiene ligger under grenseverdiene for akseptabelt daglig inntak, ikke innebærer endret helserisiko i forhold til annen soya.

Feltforsøk over en vekstsesong viser signifikante forskjeller mellom MON 87701 x MON 89788 og umodifisert kontroll for enkelte av de agronomiske karakterene som er evaluert. Gjennomsnittsverdiene for disse karakterene ligger imidlertid innenfor variasjonsområdene for referansesortene som var inkludert i feltforsøkene. Søker viser til at forskjellene som er påviste er uten biologisk relevans, og konkluderer med morfologisk og agronomisk ekvivalens mellom den transgene linjen MON 87701 x MON 89788 og nær-isogen kontroll.

Søknaden gjelder godkjenning av soyahybriden MON 87701 x MON 89788 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 soyahybriden. Det er ingen indikasjoner på økt sannsynlighet for spredning, etablering og invasjon av soyahybriden 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

Soyahybrid MON 87701 x MON 89788

populasjoner eller nærstående arter utenfor dyrking i Europa. Det er derfor ikke risiko for utkryssing med dyrkede sorter eller ville planter i Norge.

REFERANSER

- Agbios (2010). Agbios GM Database. Information on GM Approved Products.
<http://www.agbios.com/dbase.php>
- Bensasson, D., Boore, J. L. & Nielsen, K. M. (2004). Genes without frontiers. *Heredity*, **92**, 483-489.
- Bernstein, I.L., Bernstein, J.A., Miller, M., Tierzieva, S., David I. Bernstein, D.I., Zana Lummus, Z., Selgrade, M.J.K., Doerfler, D.L. & Seligy, V.L. (1999). Immune Responses in Farm Workers after Exposure to Bacillus Thuringiensis Pesticides. *Environ. Health Perspect.* **107**(7), 575-582.
- de Jonge, J. D., Knippels, L.M.J., Ezendam, J., Odink, J. Penninks, A. H. & van Loveren, H.(2007). The importance of dietary control in the development of a peanut allergy model in Brown Norway rats *Methods*, **41**, 99-111.
- de Luis, R., Lavilla, M., Sanchez, L., Calvo, M. & Perez, M. D. (2009). Immunochemical detection of Cry1A(b) protein in model processed foods made with transgenic maize. *European Food Research Technology* DOI 10.1007/s00217-009-1021-4.
- 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.
- 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
- EHC (1999). *Bacillus thuringiensis*. Environmental Health Criteria Monograph 217, International Programme on Chemical Safety, World Health Organization, Geneva, 1999.
- 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.
- FAOSTAT (2006). <http://faostat.fao.org>
- Foss, N., Duranti, M., Magni, C. & Frøkiær, H. (2006). Assessment of Lupin Allergenicity in the Cholera Toxin Model: Induction of IgE Response Depends on the Intrinsic Properties of the Conglutins and Matrix Effects. *Int Arch Allergy Immunol*, **141**, 141-150 (DOI: 10.1159/000094716).

Soyahybrid MON 87701 x MON 89788

Guimaraes, V. D., Drumare, M. F., Ah-Leung, S., Lereclus, D., Bernard, H., Creminon, C., Wal, J. M. & Adel-Patient, K. (2008). Comparative study of the adjuvanticity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab protein and cholera toxin on allergic sensitisation and elicitation to peanut. *Food and Agricultural Immunology*, **19**, DOI 10.1080/09540100802495651PII 09540100906477739.

ILSI (2008). ILSI Crop Composition Database (2008) International Life Science Institute, Washington, DC. Accessible at: <http://www.cropcomposition.org/>.

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.

Moreno-Fierros, L., Ruiz-Medina, E.J., 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.

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*tanpII*) 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

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)

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.

Soyahybrid MON 87701 x MON 89788

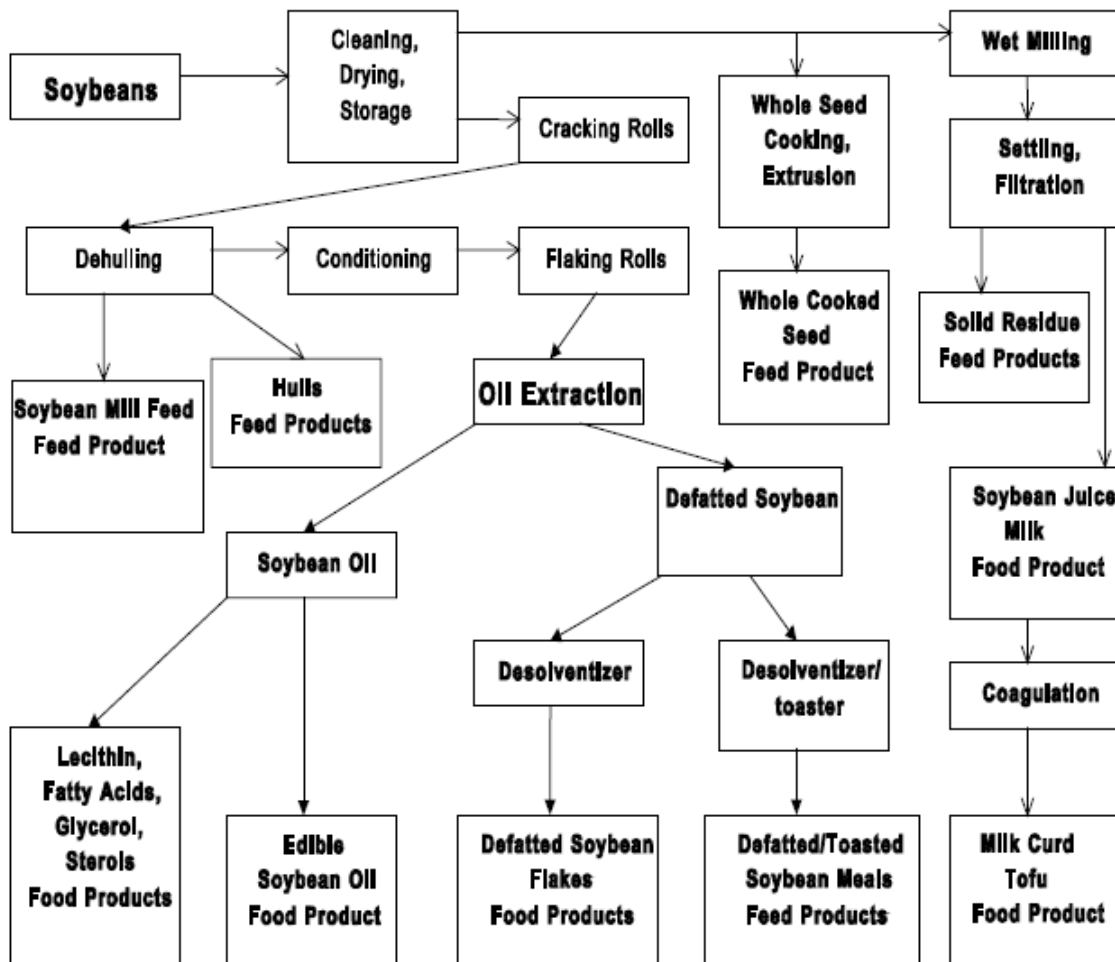
- Ramazzoti, M., Mulinacci, N., Pazzagli, L., Moriondo, M., Manao, G., Vincieri, F.F., & Degl' Innocenti, D. (2008). Analytic Investigations on Protein Content in Refined Seed Oils: Implications in Food Allergy. *Food Chem. Toxicol.* **46** (11), 3383-3388.
- Rojas-Hernández, S., Rodríguez-Monroy, M.A., López-Revilla, R., Reséndiz-Albor, A.A., Moreno-Fierros, L. (2004). Intranasal coadministration of the Cry1Ac protoxin with amoebal lysates increases protection against *Naegleria fowleri* meningoencephalitis. *Infect. Immun.*, **72**, 4368-4375.
- Schubbert, 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.
- van Wijk, F. & Knippels, L. (2007). Initiating mechanisms of food allergy: oral tolerance versus allergic sensitization. *Biomed. Pharmacother.*, **61**, 8–20.
- Vazquez-Padron, R.I., Martinez-Gil, A.F., Ayra-Pardo, C., Gonzalez-Cabrera, J., Prieto-Samsonov, D.L., De la Riva, G.A. (1998). Biochemical characterization of the third domain from *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins. *Biochem. Mol. Biol Int.*, **45**(5), 1011-20.
- Vazquez, R.I., 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, R.I., Gonzales-Cabrera, J. Garcia-Tovar, C., Neri-Bazan, L., Lopez-Revilla, R., Hernandez, M., Moreno-Fierro, L., De la Riva, G.A. (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, R.I., Moreno-Fierros, L., Neri-Bazan, L., Martinez-Gil, A.F., De La-Riva, G.A., 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.
- 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.
http://www.vkm.no/eway/default.aspx?pid=277&trg=Content_6508&Main_6177=6504:0:31,2365&Content_6504=6508:0:31,2625:1:0:0:::0:0&Content_6508=6187:1668119:::1:6335:10:::0:0

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.

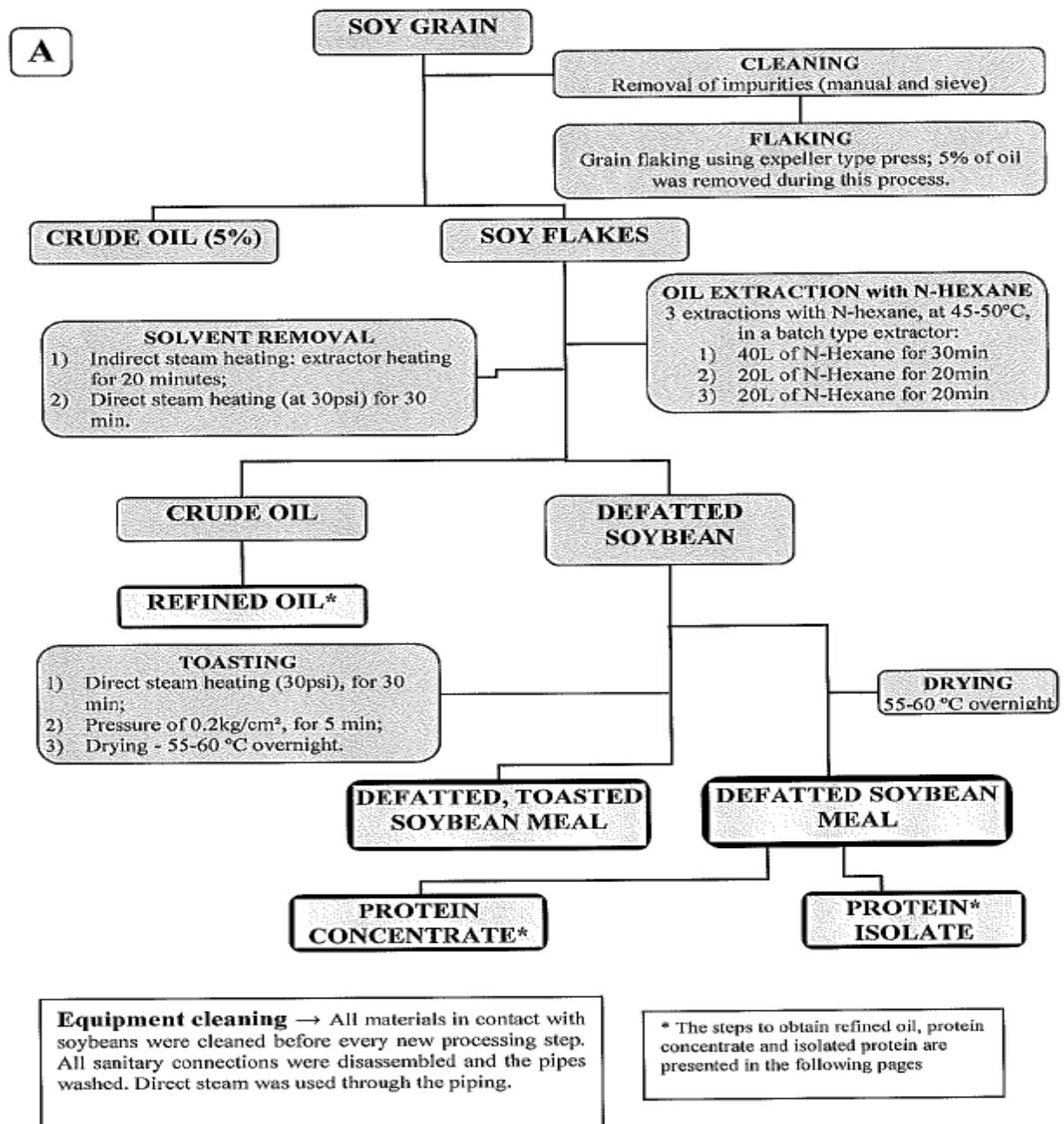
WHOLE SOYBEAN PROCESSING



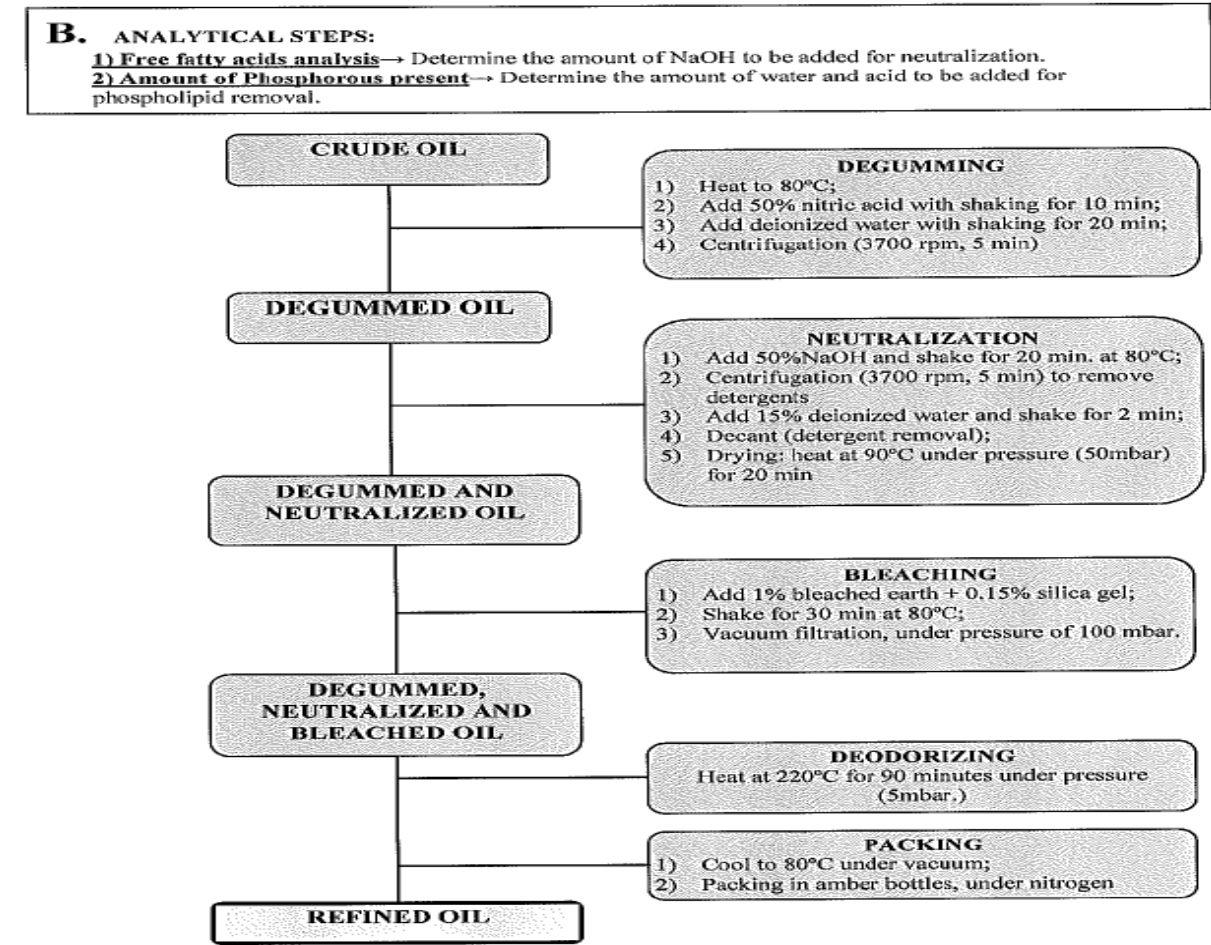
Soyahybrid MON 87701 x MON 89788

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

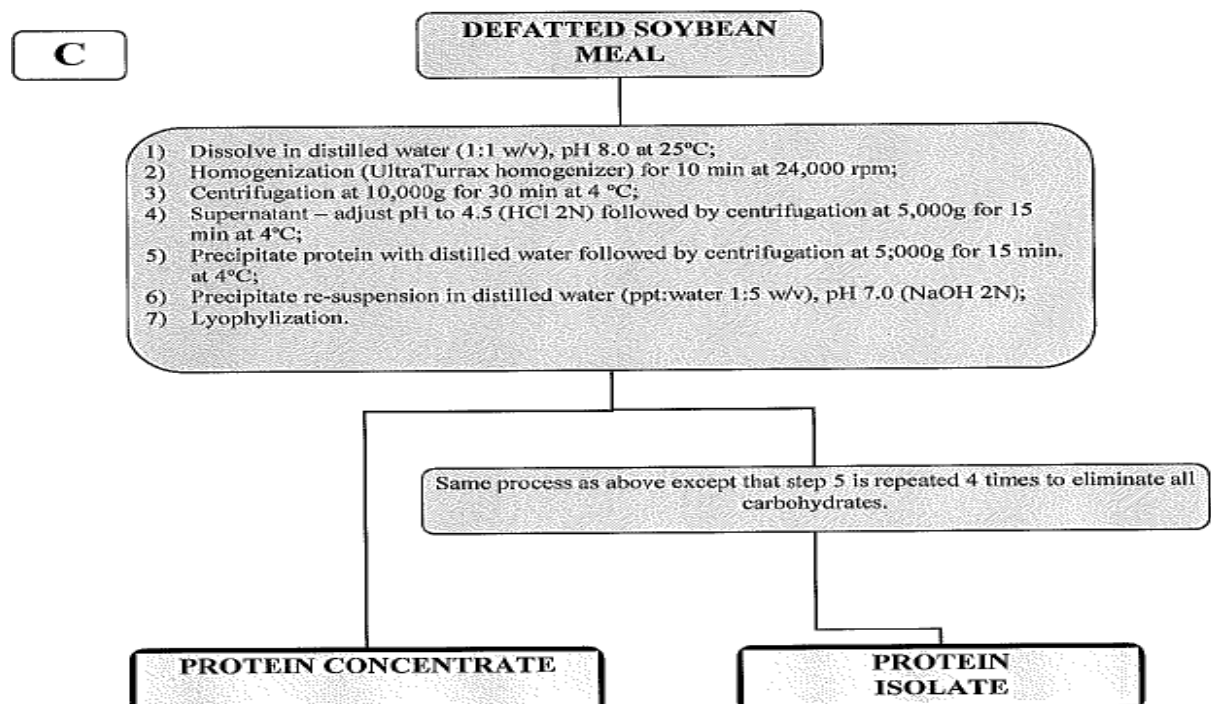
Figur A. Prosessering av soyabønne



Figur B: Prosessering av råolje til raffinert soyaolje



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



VEDLEGG 2

CP4 EPSPS enzymets funksjon

Cp4 epsps genet som koder for enzymet CP4 EPSPS (5-enol-pyruvylsukinat-3-fosfat syntetase) er isolert fra bakterien *Agrobacterium* sp stamme CP4. CP4 EPSPS enzymet er et medlem av EPSPS-enzymfamilien, og er et av enzymene i den aromatiske aminosyrebiosynteseveien. Enzymet er essensielt i syntese av proteiner som inneholder aromatiske aminosyrer. Alle planter, bakterier og sopp inneholder enzymet EPSPS. CP4 EPSPS er ikke nært beslektet i aminosyrehomologi til andre beskrevne EPSPS enzymer. CP4 EPSPS er ikke mer enn 51.1 % lik og 26.0 % identisk med EPSPS i planter, 59.3 % lik og 41.1 % identisk med EPSPS i andre bakterier og 53,50 % lik og 29,9 % identisk til EPSPS i gjær. Den unike karakteren til CP4 EPSPS er dets evne til å funksjonere under tilstedeværelse med glyfosat. Glyfosat er en kompetitiv hemmer for fosfoenolpyruvat på det aktive setet til andre EPSPS enzymer. EPSPS er det eneste målproteinene for glyfosat i planter, og glyfosat hemmer dette enzymet slik at planten ikke kan danne aromatiske aminosyrer

Metabolisme av glyfosat i planter

For ugrasbekjempelse med Roundup kreves det i henhold til foreslått god jordbrukspraksis (GAP= good agricultural practices) i følge Monsanto en enkel sprøyting med 0,54 til 0,84 kg glyfosat/ha i plantenes tidlige vegetative fase. Dersom det er nødvendig sprøytes plantene med ytterligere 0,54 til 0,84 kg glyfosat/ha i sen vegetativ fase. I metabolismestudiene ble planter i feltforsøk sprøytet med 0,84 kg radioaktivt glyfosat/ha i første vegetativ fase og 1,68 kg radioaktivt glyfosat/ha i siste vegetativ fase. Studier viser at glyfosatmetabolismen er den samme i glyfosattolerante- og nontolerante planter. Glyfosat (N-fosfonometyl-glycin) metaboliseres i planter til aminometyl-fosforsyre (AMPA) og glycylysyre. Glycylysyre er en vanlig plantemetabolitt. Mengde av AMPA i planter er fra 7-50 % av glyfosatmengden. Mengde AMPA er avhengig av plantevevet. AMPA konjugeres til lave, men sporbare mengder N-acetyl-AMPA, N-glyceryl-AMPA, N-metyl-AMPA og N-malonyl-AMPA. Disse konjugantene er ikke kjent for å være giftige. Ingen av disse metabolittene kan påvises i større mengder enn 2 %. Studier viser at et karbonfragment som inneholder ett karbon, inkorporeres i naturlige bestanddeler i planten, som aminosyrer, organiske syrer etc.

Undersøkelser av olje fra både soyabønne og raps viser at verken glyfosat, AMPA eller dets konjugater kan påvises i oljen. ¹⁴C-merket glyfosat viser at et karbonfragment som inneholder ett karbon, inkorporeres i palmitin-, linol-, linolen- og oljesyre. Det antas at metabolitter av glyfosat omdannes videre til acetyl-CoA, som derved bygges inn i plantens byggesteiner.