

## Vurdering av genmodifisert insekts- og herbicidtolerant mais (C/ES/01/01) til bruk som fôrvare

Vitenskapskomiteen for mattrygghet (VKM) viser til forespørsel fra Mattilsynet datert 28.04.2004 vedrørende risikovurdering av den genmodifiserte maislinjen 1507 (C/ES/01/01) under direktiv 2001/18/EF. Notifiseringen av den genmodifiserte insekts- og herbicidtolerante maislinjen 1507 er en felles notifisering for Pioneer Hi-Bred International, Inc. og Mycogen Seeds, c/o Dow AgroSciences LLC.

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

Ifølge dokumentasjon fra Pioneer Hi-Bred International, Inc. og Mycogen Seeds, c/o Dow AgroSciences LLC uttrykker den genmodifisert maisen glufosinat- (*pat* gen) og insektstoleranse (*cryIF* gen).

Maisen vil bli vurdert som kategori a) Næringsmidler og næringsmiddelingsredienser som består av eller inneholder genmodifiserte organismer og b) Næringsmidler og næringsmiddelingsredienser som er fremstilt på grunnlag av, men som ikke inneholder reproduksjonsdyktige genmodifiserte organismer. Maisen vil komme i kategori b.

Vurderingen av maisen vil bli gjort ut fra gruppe 3, fullstendig helserisikovurdering.

### Dokumentasjon.

Bakgrunnsinformasjon som administrative data, tekniske opplysninger etc. er tilfredsstillende.

Beskrivelse av verten, vektoren og den genmodifiserte maisen er tilfredsstillende. Det innsatte DNA-fragmentet inneholder ikke antibiotikaresistensgener.

#### ▪ Genmodifisering

Den genmodifiserte maislinjen 1507 uttrykker glufosinat- og insektstoleranse ved at et lineært DNA fragment på 6235 basepar (1507 transkript) ved hjelp av partikkel akselerasjonsmetoden er ført inn i maisceller. Dette DNA fragmentet inneholder følgende gener og DNA elementer:

- a) *pat* genet fra jordbakterien *Streptomyces viridochromogenes*. *Pat* genet uttrykker enzymet fosfotricin acetyltransferase (PAT, phosphinotricin acetyl transferase) som har høy spesifisitet overfor fosfotricin, som er den aktive komponenten i herbicider av glufosinat-typen. PAT inaktiverer fosfotricin ved N-acetylering og beskytter derved planten i et fosfotricinmiljø. Basesekvensene i genet er endret slik at genet kan uttrykkes

i planter. PAT proteinets aminosyre-sekvens i planten er lik bakterieproteinets aminosyresekvens.

- b) Promoteren CaMV 35S og terminatoren CaMV 35S kommer fra agurk mosaikkvirus. Promoteren styrer uttrykket av *pat*. Termineringen av uttrykket styres av terminatoren CaMV 35S.
- c) *CryIF* genet kommer fra *Bacillus thuringiensis* (*B.t.*) sbsp. *aizawai*, som er en vanlig jordbakterie. Bakterien danner det intracellulære proteinkrystallet CRYIF som har entomopatogen effekt. Basesekvensene i genet er endret slik at genet kan uttrykkes i planter. CRYIF proteinets aminosyresekvens i planten er lik bakterieproteinets aminosyresekvens.
- d) Ekspressjonen av *CryIF* reguleres av promoteren *ubiZM1(2)* som kommer fra mais. Termineringen av ekspressjonen styres av terminatoren *mas1* fra *Agrobacterium tumefaciens*.

#### *Karakterisering av geninnsettingen*

Southern blot - og sekvensanalyse viser at et nesten fullengde kopi av 1507 DNA fragmentet (6186 bp fra 6235 bp fragmentet) er satt inn i maisens genom. Et ca. 11 kbp genomisk DNA fragment fra mais hvor 1507 fragmentet ligger på, er sekvensert. Dette DNA fragmentet inneholder begge genene og de respektive regulatoriske sekvensene til 1507 fragmentet. I tillegg inneholder dette fragmentet 6 ikke-funksjonelle DNA-fragmenter som stammer fra 6235 bp 1507 fragmentet. Disse 6 DNA fragmentene befinner seg enten ved 5' eller 3' endene til 6186 bp fragmentet.

Western blot og påvisning med polyklonale antistoffer viser at både Cry1F og PAT proteinene har den forventede molekylvekt. Cry1F forelå som dublett, henholdsvis med 65 og 68 kD. Årsaken oppgis å være at plante proteaser spalter av et N-terminalt fragment, siden trypsinbehandling av CRY1F proteinet gir et protein på 65 kD. Det er ingen indikasjoner på fusjonsproteiner. Cry1F ble påvist i blad, pollen, korn og hel plante. PAT ble kun påvist i blad.

Det er ikke undersøkt for endring i det generelle proteinmønsteret som følge av transformasjonen. Undersøkelse av proteinmønster med elektroforese og isoelektrofokusering er heller ikke foretatt.

#### *Påvisning av åpne leserammer (ORF)*

Det gjort en detaljert studie for å påvise åpne leserammer. Det er påvist 5 åpne leserammer, ORF1, ORF2, ORF3, ORF4 og ORF25PolyA. ORF25PolyA er deler av CaMV 35S promoter og terminator. ORF4 ligger inne i ORF25PolyA. ORF1 og 2 er deler av 1507 transkriptet, og de kommer fra maisgenomet. Disse to ORFene ble også påvist i umodifisert mais, men har ikke noen homologi til beskrevne sekvenser i maisgenomet. De har ikke regulatoriske elementer som kan føre til transkripsjon. ORF3 og ORF4 ligger henholdsvis på grensen av og inne i 1507 fragmentet. Det er ikke påvist ORF3 transkript ved Northern eller RT-PCR. Northern og RT-PCR analyser for påvisning av ORF4 transkript indikerer at heller ikke denne åpne leserammen er i stand til å føre til transkripsjon selv om den ligger inne i ORF25PolyA.

Det er ikke funnet beskrivelser over hvilke kromosom 1507 DNA fragmentet ligger på.

Den genmodifiserte maisen er selvpollinert 2 ganger og tilbakekrysset fire ganger med den opprinnelige maisplanten, slik at GM-maisen er tilnærmet 100% lik den opprinnelige

maisplanten. Analyser viser at 1507 DNA fragmentet er stabilt inkorporert i maisgenomet i minst 6 generasjoner.

Det er vist at de innsatte genene er stabilt inkorporert i maisgenomet ved dyrking i forskjellige lokaliteter over to år. Feltforsøkene er fra 4 forskjellige land, og over minst 2 år.

Analyser over stabiliteten av det innsatte 1507 fragmentet synes å være tilstrekkelig.

- **Analyser av næringsstoffer, kritiske toksiner, allergener og antinæringsstoffer.**

Analyser av næringsstoffer etc. er foretatt fra mais som er dyrket i Chile (1998-1999), Bulgaria (2000), Frankrike (1999 og 2000) og Italia (1999 og 2000) fra henholdsvis 4, 1, 3 og 3 lokaliteter. For analyse er det tatt ut fra tre – til seks replikater av umodifisert -, sprøytet og usprøytet genmodifisert mais fra hver lokalitet. De statistiske analysene er vanskelig tilgjengelig fordi det synes som det er forskjeller på hvordan utregningene er utført fra de forskjellige land og år. Det synes som om utregningene av de estimerte gjennomsnittsverdiene, for eksempel for protein er utført ved å slå sammen alle prøvene fra lokalitetene i Frankrike og Italia.

Målte komponenter:

*Hovedkomponenter:* Protein, fett, aske, vann, cellulose, fiber er analysert. Vitaminene E, folsyre, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> er undersøkt. Mineralene Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Zn er analysert. Fettsyrene palmitin, stearin, olje, linol og linolen er målt. 18 aminosyrer er målt.

*Allergener:* For Btk-toksin og PAT-enzymet er det foretatt sammenligning med allergene aminosyreepitoper i forskjellige databaser. Det er ikke funnet epitopligheter til allergener. Sammenligning av andre karakteristika for allergener som molekylvekt, glykosilering, stabilitet overfor varme, fordøyelse etc. viser at disse to proteinene ikke ligner allergener i så henseende.

*Toksiner:* DIMBOA og MBOA er ikke målt. Btk-toksinmengde er målt med ELISA i forskjellige plantedeler.

*Anti-næringsstoffer og sekundære metabolitter:* Trypsinhemmer, fytinsyre, inositol, raffinose, p-coumarinsyre, furfural og ferulsyre er målt.

OECDs konsensusdokument for mais spesifiserer hvilke komponenter som anbefales analysert for mat og fôr. Analysene av de forskjellige komponentene i maislinjen 1507 er henhold til spesifikasjonene for fôr, men ikke for mat.

- **Fôringsstudier**

- PAT-protein

- Fôringsstudie med PAT-protein er beskrevet. PAT-proteinet er tidligere vurdert av gruppa for ny mat i Statens næringsmiddeltilsyns vitenskapelige komité. De konkluderte med at proteinet ikke utgjør noe helsefare.

- CRY1F toksinet

- Akutt oral toksisitetstest på mus*

- Studien er kun beskrevet summarisk hvor største CRY1F toksindose var 576 mg/kg kroppsvekt. Det ble undersøkt for mortalitet, kroppsvekt, klinisk patologi, adferd og

undersøkelser av organer. Resultatene viste ingen døde mus og ingen påviselige kliniske tegn som resultat av eksponeringen.

#### Sub-kroniske tester på broilere og rotter

Umodifisert og modifisert mais er fôret til broilere og rotter.

##### *Broilere*

245 hann broilere ble delt i 8 grupper á 35 i hver gruppe. To av gruppene ble fôret med modifisert mais og de andre med umodifisert mais. Mengde mais i fôret var henholdsvis 54,21% fra 0-20 dager og 57,03% fra 21-42 dager. Mengde toksin i fôret er det ikke gitt opplysninger om, men anslås å være ca. 2 µg/g fôr ut fra opplysninger gitt i et svar på tyske myndigheters etterspørsel av tilleggsinformasjon. Fôrinntak per dag per dyr er ikke dokumentert. Det ble ikke funnet noen forskjeller i fôrinntak, fôromdannings effektivitet, vektøkning, slaktekvalitet, bryst-muskelmasse etc. mellom de to gruppene. Det ble undersøkt for postmortem mikroskopiske abnormiteter. De mikroskopiske funnene var typisk for broilerproduksjon. Det ble ikke funnet noen signifikante forskjeller mellom gruppene.

##### *Rotter*

Subkronisk 13 ukers oral toksisitetstest ble utført på rotter. Testen ble utført i henhold til OECDs retningslinje nr. 408, subkronisk 13 ukers oral toksisitetstest. Rotter, startvekt på ca. 10-15g, ble delt i 5 hann- og 5 hunddyrgrupper, á 12 dyr i hver gruppe. Mengde mais i fôret er henholdsvis 11% og 33%. Maissorter som ble benyttet er genmodifisert, isogenetisk umodifisert og kommersiell umodifisert. Fôrinntaket for hann- og hannrotter var henholdsvis ca. 20 g og 25 g per dag. Mengde CRY1F toksin i 33% GM-fôr er estimert til 1 µg/g fôr. Inntak av toksin er da anslagsvis 20 og 25 µg per dag for hun- og hanrotter. Det ble undersøkt for alle de parametrene som er listet opp OECDs retningslinje nr. 408. Resultatene viser ingen statistiske forskjeller mellom dyrene som resultat av eksponeringen.

#### ▪ **”Substantial equivalence”**

Nesten all konvensjonell planteforedling har et potensiale til å skape uventede effekter innbefattet såkalt pleiotrofe effekter. Pleiotrofe effekter vil si at en enkel genetisk forandring fører til flere utilsiktede andre genetiske effekter. For eksempel er inkorporeringsbegivenheten av det genetiske materiale tilfeldig, dvs. det er ikke bestemt på forhånd hvor i genomet innsetningen har skjedd. Det nye DNAet kan bli satt inn på et sted som er transkripsjonelt aktivt og derved inaktivere et vertsgen eller forandre kontrollen av et vertsgens ekspresjon. Det innsatte genets produkt eller et metabolsk produkt som kan påvirkes av den genetiske forandringen kan virke på andre cellulære produkter og produsere en skadelig effekt.

Slike effekter i planten kan for mennesker være skadelig ved at det skjer en vesentlig forandring i viktige næringskomponenter, f.eks. vitaminer, dannelse av naturlig forekommende planteproteiner, eller innhold av naturlige plantetoksiner.

I Nordisk ministerråds rapport "Safety Assessment of Novel Food Plants: Chemical Analytical Approaches to the Determination of Substantial Equivalence", 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 ± 20%.

I våre nasjonale Retningslinjer for helserisikovurdering av ny mat fremheves det at kjemisk sammensetning, næringsverdi, stoffomsetning og bruksmåte for den genmodifiserte maisen ikke skal skille seg i vesentlig grad fra en sammenlignbar tradisjonell mais, dvs. i dette tilfelle med kontrollmais

Det er foretatt en rekke analyser av kontroll- og genmodifisert mais av forskjellige komponenter, se ovenfor. Analysene er presentert som gjennomsnittsverdier i flere tabeller. Gjennomsnittverdiene består imidlertid av verdier fra en til seks lokaliteter i Amerika og Europa. Det er ingen sammenligninger mellom kontroll og genmodifisert mais innenfor hver lokalitet. Spredningen i enkelte komponenter er i noen tabeller oppgitt som p-verdier mens i andre tabeller som  $\pm$ SE, og en finner slik fremstilling utilfredsstillende.

Vi mener at analyser fra hver av de enkelte lokalitetene og spredningen i analysene for alle de ovenfor nevnte komponenter for kontroll- og genmodifisert mais innenfor hver lokalitet skulle vært presentert.

Vårt krav til disse analysene begrunnes ut fra at det er utført for få analyser og utilstrekkelig statistisk sammenligning for fastsetting av "substantial equivalence".

## ▪ **Konklusjon**

Det har vært svært knapp tid til å kunne vurdere dokumentasjonen tilfredsstillende.

På bakgrunn av ovenstående gjennomgang av medfølgende og tidligere innsendt dokumentasjon finner vi det lite sannsynlig at eksponering for PAT proteinet i seg selv og i de mengder som tilføres via genmodifisert mais er helsemessig betenkelig. Lengden på fôringsforsøket på rotte er som anbefalt av FAO/WHO for å avdekke helsemessige forskjeller som følge av fôring med modifisert og umodifisert organisme. Fôringsforsøkene på broilere og rotte viser at henholdsvis 42 og 90 dagers fôring gir ingen forskjeller mellom kontroll- og modifisert mais. Notifikasjonen inneholder tilstrekkelig dokumentasjon til å vise at fôring med 25  $\mu$ g CRY1F toksin fra bakterie per dag i 90 dager ikke fører til påvisbar helseskade hos rotter.

De statistiske analysene som er foretatt på hoved- og næringskomponenter synes ikke å være i henhold til Retningslinjer for risikovurdering av ny mat, og det kan derfor ikke konkluderes med at modifisert og umodifisert mais er vesentlig like. Noen av analysene som retningslinjene mener bør utføres for mat er ikke utført, men analysene er i henhold til OECDs konsensusdokument for mais når det gjelder fôr.

Den genmodifiserte maisen synes ikke å være forskjellig fra umodifisert mais med hensyn på fôr kvalitet.