

บทสรุปผู้บริหาร

ข้าวโพด MON87460 เป็นข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมให้ทนแล้ง โดยสามารถเจริญเติบโตได้ในสภาพพื้นที่ปลูกที่มีน้ำจำกัด ลักษณะดังกล่าวถูกควบคุมโดยยีนที่สร้างโปรตีน Cold shock protein B (CSPB) ซึ่งได้รับมาจากแบคทีเรียดิน *Bacillus subtilis* เมื่อข้าวโพดประสบสภาวะแล้ง โปรตีน CSPB จะทำปฏิกิริยาเชื่อมกับอาร์เอ็นเอและสะสมในบริเวณเนื้อเยื่อที่มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วโดยจะทำให้อาร์เอ็นเอในโครงสร้างทุติยภูมิมีการคลายตัว เซลล์สามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติโดยสามารถรักษาระดับการถอดรหัสและการแปลรหัสทางพันธุกรรมให้เป็นไปอย่างสมบูรณ์ ส่งผลให้ข้าวโพดสามารถลดการสูญเสียผลผลิตได้ในสภาพที่มีน้ำจำกัด

ข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม MON87460 ถูกพัฒนาขึ้นโดยการถ่ายยีนด้วยวิธี *Agrobacterium* mediated transformation เข้าสู่เซลล์พืชข้าวโพดที่มีการเจริญเติบโตยังไม่เต็มที่โดยใช้จากไบนารี พลาสมิดดีเอ็นเอ PV-ZMAP595 ที่มีชุดยีน *cspB* และ *nptII* ผลการวิเคราะห์ทางอณูชีวโมเลกุล โดยใช้เทคนิค Southern blot analysis พบว่า MON87460 มีชุดยีน *cspB* และ *nptII* เพียงหนึ่งชุดสอดแทรกเข้าไปในโครโมโซมของข้าวโพดเพียงตำแหน่งเดียว และไม่พบว่ามีส่วนอื่นของพลาสมิด PV-ZMAP595 สอดแทรกเข้าไปในจีโนมของข้าวโพด ผลจากการวิเคราะห์ลำดับเบสดีเอ็นเอแสดงให้เห็นว่าส่วนของ โปรโมเตอร์ *P-Ract 1* ที่ควบคุมการแสดงออกของชุดยีน *cspB* ใน MON87460 ขาดหายไปจำนวน 733 คู่เบส ผลการวิเคราะห์ยืนยันว่ามีการเรียงตัวของชุดยีน *cspB* และ *nptII* ใน MON87460 เหมือนกับการเรียงตัวในพลาสมิด PV-ZMAP595 จากการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณที่มีการสอดแทรกของ T-DNA บ่งชี้ว่ามีส่วนของจีโนมดีเอ็นเอของข้าวโพดขาดหายไปจำนวน 22 คู่เบส และผลการวิเคราะห์การแปลรหัสของบริเวณที่มีการสอดแทรกและส่วนที่เชื่อมต่อกับดีเอ็นเอของข้าวโพดที่ 5' และ 3' รวมถึงส่วนของชุดยีน *cspB* และ *nptII* ไม่พบโปรตีนที่มีความเหมือน (sequence homology) กับ สารพิษ หรือ สารก่อภูมิแพ้ที่รายงานในฐานข้อมูล ผลการวิเคราะห์ความคงตัวของยีน *cspB* โดย Southern blot fingerprints พบว่า ยีน *cspB* มีความคงตัวในรุ่นลูกทั้ง 7 รุ่นที่ทำการทดสอบ จากการวิเคราะห์การกระจายตัวของยีน พบว่า ยีน *cspB* และ *nptII* มีความคงตัวและมีการถ่ายทอดลักษณะไปยังรุ่นลูกเป็นไปตามกฎเมนเดล โดยยืนยันว่ามีการสอดแทรกของชุดยีนดังกล่าวเพียงหนึ่งตำแหน่ง จากการตรวจสอบโปรตีน CSPB และ NPTII โดย ELISA assay พบโปรตีน CSPB ในเนื้อเยื่อข้าวโพดหลายชนิด โดยพบปริมาณโปรตีน CSPB สูงสุดในละอองเกสรตัวผู้ (สหรัฐอเมริกา 13 ug/g DW, ซิลี 18 ug/g DW well watered และ 17 ug/g DW water limited conditions) รองลงมาได้แก่ ไหม (สหรัฐอเมริกา 1.2 ug/g DW, ซิลี 0.82 ug/g DW well watered และ 1.1 ug/g DW water limited conditions) ใบอ่อน (OSL1; สหรัฐอเมริกา 3.1 ug/g DW, ซิลี 2.8 ug/g DW well watered และ 2.8 ug/g DW water limited conditions) ส่วนของพืชที่ใช้เป็นอาหารสัตว์ (forage, สหรัฐอเมริกา 0.029 ug/g DW, ซิลี 0.11 ug/g DW well watered และ 0.15 ug/g DW water limited conditions) เมล็ด (สหรัฐอเมริกา 0.072 ug/g DW, ซิลี 0.048 ug/g DW well watered และ 0.038 ug/g DW water limited conditions) ชังและตอชัง (stover, สหรัฐอเมริกา 0.042 ug/g DW, ซิลี 0.033 ug/g DW well watered และ 0.072 ug/g DW water limited conditions) รากแก่ (senescent root, สหรัฐอเมริกา 0.041 ug/g DW, ซิลี 0.031 ug/g DW well watered และ 0.052 ug/g DW water limited conditions) และ ส่วนรากที่ใช้เป็นอาหารสัตว์ (forage root, สหรัฐอเมริกา 0.029 ug/g DW, ซิลี 0.039 ug/g DW well watered และ 0.076 ug/g DW water limited conditions) ตามลำดับ และพบโปรตีน NPTII ในเนื้อเยื่อที่ตรวจสอบ 3 ใน 4 ชนิด โดยพบมากที่สุดใใบอ่อน (OSL1; สหรัฐอเมริกา 2.6 ug/g DW, ซิลี 2.4 ug/g DW well watered

และ 2.6 ug/g DW water limited conditions) รองลงมา ได้แก่ ราก (สหรัฐอเมริกา 0.47 ug/g DW, ซิลี 0.51 ug/g DW well watered และ 0.48 ug/g DW water limited conditions) และส่วนของพืชที่ใช้เป็นอาหารสัตว์ (สหรัฐอเมริกา 0.13 ug/g DW, ซิลี 0.16 ug/g DW well watered และ 0.17 ug/g DW water limited conditions) ส่วนในเมล็ดนั้นพบปริมาณโปรตีน NPTII ต่ำกว่าระดับ LOQ (ต่ำกว่า 0.0047µg/g FW)

การประเมินด้านโภชนาการของข้าวโพดตัดแปลงพันธุกรรมทนแล้ง MON87460 โดยการวิเคราะห์หาปริมาณองค์ประกอบหลัก (Proximate analysis), แร่ธาตุอาหาร กรดอะมิโน กรดไขมัน วิตามิน สารต้านโภชนาการ และ สาร เมตาโบไลต์ เปรียบเทียบกับพันธุ์ลูกผสมตรวจสอบที่มีลักษณะทางพันธุกรรมเทียบเคียง (counterpart) กับข้าวโพดตัดแปลงพันธุกรรมทนแล้ง MON87460 และพันธุ์ลูกผสมอ้างอิงที่มีการปลูกในเชิงพาณิชย์ โดยทำการทดลองปลูกปี 2006 ในประเทศสหรัฐอเมริกาและทดลองปลูกในประเทศชิลี ปี 2006-2007 ในสภาวะการให้น้ำปกติและการจำกัดการให้น้ำกับพืชทดลอง ผลการวิเคราะห์พบว่าข้าวโพดตัดแปลงพันธุกรรมทนแล้ง MON87460 มีองค์ประกอบทางโภชนาการเทียบเท่าโดยสาระสำคัญ (substantial equivalent) กับพันธุ์ตรวจสอบและพันธุ์อ้างอิงเชิงพาณิชย์ ส่วนการวิเคราะห์สารเมตาโบไลต์ furfural, ferulic acid และ p-coumaric acid พบว่าปริมาณ สารเมตาโบไลต์ในข้าวโพดตัดแปลงพันธุกรรมทนแล้ง MON87460 และพันธุ์ลูกผสมตรวจสอบไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) จากข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์สามารถสรุปได้ว่าข้าวโพดตัดแปลงพันธุกรรมทนแล้ง MON87460 มีองค์ประกอบของสารทางโภชนาการ สารต้านโภชนาการ และ สารเมตาโบไลต์ เทียบเท่าโดยสาระสำคัญกับพันธุ์ลูกผสมคู่เปรียบเทียบ และพันธุ์ลูกผสมอ้างอิงเชิงพาณิชย์

การประเมินด้านพิษวิทยาของข้าวโพดตัดแปลงพันธุกรรม MON87460 ทำการทดสอบโดยการประเมินคุณสมบัติของโปรตีน cold shock protein B (CSPB) ซึ่งเป็นการประเมินจากโปรตีนบริสุทธิ์ที่เตรียมจาก *E. coli* (*E. coli*-produced CSPB) และนำไปทดสอบด้วยกระบวนการต่างๆ ทางห้องปฏิบัติการ ประกอบด้วย การทดสอบความเหมือนกันของโปรตีนที่อาจมีคุณสมบัติเป็นสารพิษที่ทราบแล้วหรือสารต้านโภชนาการ การทดสอบความเสถียรต่อความร้อนและน้ำย่อยในทางเดินอาหาร และการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันในสัตว์ทดลอง จากข้อมูลที่น่าเสนอเพื่อประเมินด้านพิษวิทยาพบว่าโปรตีน CSPB เป็นโปรตีนที่มีความปลอดภัยสำหรับการบริโภคโดยจากการประเมิน ข้อมูลแสดงว่าทั้งโปรตีน CSPB รวมทั้งโปรตีน NPTII ไม่มีความเหมือนกับโปรตีนที่เป็นสารพิษหรืออาจก่อให้เกิดพิษกับสิ่งมีชีวิตโดยการเปรียบเทียบความเหมือนกับโปรตีนที่มีในฐานข้อมูล นอกจากนี้โปรตีน CSPB ถูกย่อยสลายได้ในน้ำย่อยเทียมในกระเพาะอาหารและลำไส้ภายในเวลา 30 วินาทีและ 5 นาทีตามลำดับ แสดงถึงการมีโอกาสน้อยมากหรือไม่มีโอกาสที่โปรตีนนี้จะผ่านกระบวนการย่อยและทำให้เกิดปฏิกิริยาความเป็นพิษใดๆ ต่อร่างกาย การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันในสัตว์ทดลองโดยการป้อนโปรตีน CSPB บริสุทธิ์แก่หนู ไม่ปรากฏอัตราการตายของหนูทดลองที่ให้โปรตีน CSPB ในปริมาณสูงและไม่พบความแตกต่างในเรื่องของน้ำหนักตัวเมื่อเทียบกับหนูทดลองควบคุมที่ได้รับโปรตีนอื่น (ใช้ BSA)

การประเมินด้านการก่อภูมิแพ้ของข้าวโพดทนแล้ง MON87460 ทำการทดสอบโดยการประเมินคุณสมบัติของโปรตีน cold shock protein B (CSPB) ซึ่งเตรียมจาก *E. coli* (*E. coli*-produced CSPB) การดูปริมาณของโปรตีนในข้าวโพดสด ตลอดจนการนำไปทดสอบด้วยกระบวนการต่างๆ ทางห้องปฏิบัติการ ประกอบด้วย การทดสอบความเหมือนกันของโปรตีนกับสารก่อภูมิแพ้ที่ทราบแล้ว การทดสอบความเสถียรต่อความร้อนและน้ำย่อยในทางเดินอาหารทั้งในกระเพาะอาหารและลำไส้ จากข้อมูลที่น่าเสนอพบว่า มีความเสี่ยงต่ำที่โปรตีน CSPB จะเป็นสารก่อภูมิแพ้ และไม่มีความเหมือนกับโปรตีนที่เป็นสารก่อภูมิแพ้ในฐานข้อมูล นอกจากนี้โปรตีน CSPB ถูกย่อยสลายได้ในน้ำย่อยเทียมในกระเพาะอาหารและลำไส้ภายในเวลา 30 วินาที

และ 5 นาทีตามลำดับ แสดงถึงการมีโอกาสน้อยมากที่โปรตีนนี้จะผ่านกระบวนการย่อยและทำให้เกิดปฏิกิริยาก่อภูมิแพ้แก่ร่างกาย

การประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพของข้าวโพดทนแล้ง MON87460 โดยอาศัยข้อมูลที่น่าเสนอจาก บริษัทฯ สามารถสรุปได้ว่าข้าวโพด MON87460 มีองค์ประกอบทางโภชนาการเทียบเท่าโดยสาระสำคัญกับสายพันธุ์ควบคุมปกติ มีความปลอดภัยในการเป็นอาหารจากการประเมินข้อมูลด้านพิษวิทยาและด้านการก่อภูมิแพ้ ยังไม่พบข้อบ่งชี้ที่แสดงว่าโปรตีนที่สร้างขึ้นจากผลของการดัดแปลงพันธุกรรมเป็นสารพิษ หรือ สารที่ก่อให้เกิดภูมิแพ้

Executive summary

MON87460 corn has been genetically modified to tolerate cultivation under water-limited conditions. The drought tolerant trait is conferred by expression of a gene encoding cold shock protein B (CSPB) from the soil bacterium *Bacillus subtilis*. Under drought condition, the CSPB protein in MON87460 interacts with RNA and accumulates in rapidly growing tissues, unfold RNA secondary structures caused by environmental stress, thereby, helping to maintain normal cellular function of transcription and translation in those tissues critical to yields.

MON87460 was developed through *Agrobacterium* mediated transformation of immature corn embryo using binary plasmid vector, PV-ZMAP595, containing *cspB* and *nptII* expression cassettes. Molecular characterization of the inserted genetic material in MON87460 using Southern blot analysis demonstrated that one intact copy of the *cspB* and *nptII* expression cassette was integrated at a single chromosomal locus without additional elements from the transformation vector PV-ZMAP595. In addition, DNA sequencing analyses revealed that there were 733 base pairs of the *P-Ract 1* element of PV-ZMAP595 absent in the MON87460 insert. The results confirmed the organization of the genetic elements within the *cspB* and *nptII* cassettes of MON87460 which was identical to that in plasmid PV-ZMAP595. Analysis of the T-DNA insertion site indicated that there was a 22 base pair deletion of the corn genomic DNA at the insert-to plant DNA junction. Furthermore, open reading frame bioinformatic analyses were performed on the 5' and 3' junctions and on the *cspB* and *nptII* coding sequences and results demonstrated that none of the proteins represented by these putative open reading frames (ORFs) has significant homology with known toxin or allergens. Generation stability analysis revealed that the expected Southern blot fingerprint has been maintained across seven generations of breeding, thereby, confirming the stability of DNA insert over multiple generations. Segregation analyses show heritability and stability of the *cspB* and *nptII* genes occurred as expected Mendelian inheritance across multiple generations, confirmed that the DNA insert is present at a single chromosomal locus. The level of CSPB and NPTII protein was estimated using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The CSPB protein was detected in all tissue types with highest level of expression in pollen (USA 13 ug/g DW, Chile 18 ug/g DW well watered and 17 ug/g DW water limited conditions) followed by silk (USA 1.2 ug/g DW, Chile 0.82 ug/g DW well watered and 1.1 ug/g DW water limited conditions) young leaf (OSL1; USA 3.1 ug/g DW, Chile 2.8 ug/g DW well watered and 2.8 ug/g DW water limited conditions) forage (USA 0.029 ug/g DW, Chile 0.11 ug/g DW well watered and 0.15 ug/g DW water limited conditions) grain (USA 0.072 ug/g DW, Chile 0.048 ug/g DW well watered and 0.038 ug/g DW water limited conditions) stover (USA 0.042 ug/g DW, Chile 0.033 ug/g DW well watered and 0.072 ug/g DW water limited conditions), senescent root (USA 0.041 ug/g DW, Chile 0.031 ug/g DW well

watered and 0.052 ug/g DW water limited conditions) and forage root (USA 0.029 ug/g DW, Chile 0.039 ug/g DW well watered and 0.076 ug/g DW water limited conditions) The NPTII protein was detected in three out of four analyzed tissues types with the highest level determined in young leaf (OSL1; USA 2.6 ug/g DW, Chile 2.4 ug/g DW well watered and 2.6 ug/g DW water limited conditions) followed by root (USA 0.47 ug/g DW, Chile 0.51 ug/g DW well watered and 0.48 ug/g DW water limited conditions) and forage (USA 0.13 ug/g DW, Chile 0.16 ug/g DW well watered and 0.17 ug/g DW water limited conditions). The level of NPTII protein in grain was below the LOQ of the method which was 0.0047µg/g FW for grain.

Nutritional value of genetically modified corn MON87460 was evaluated by the analysis of the proximate compositions, minerals, amino acids, fatty acids, vitamins, anti-nutrients and secondary metabolites compared with control (conventional corn hybrid genetic background similar to MON87460) and conventional commercial hybrid corn which were cultured during year of 2006 in US and in Chile during year of 2006-2007 that were in well-water and limited-water conditions. Data of analysis presented that the nutritional value of the genetically modified corn MON87460 was substantial equivalent to the control and conventional commercial hybrid corn. Furthermore, the average of secondary metabolites (furfural, ferulic acid and p-coumaric acid) of genetically modified corn MON87460 and control were not significantly different ($p>0.05$) and the secondary metabolites of genetically modified corn MON87460 were lower than those in the control. From the data, it can be concluded that the nutritional value, anti-nutrients and secondary metabolites of the genetically modified corn MON87460 presented substantial equivalent to the control and conventional commercial hybrid corn.

Assessment of toxicity of the genetically modified corn MON87460 was evaluated by using pure CSPB which prepared from the fermentation and purification from *E. coli* (*E. coli*-produced CSPB). Pure CSPB was tested for its safety through various laboratory processes including the similarity of the protein to known toxins or anti-nutrients, stability to heat and digestibility by gastrointestinal fluids, and acute oral toxicity in animals. Data provided from the company showed an acceptable level of safety of CSPB. Results from bioinformatic evaluation of both CSPB and NPTII proteins showed no sequence similarities to known toxins or any proteins that might adversely affect human and animal health. CSPB protein was rapidly digested in simulated gastric (SGF) and simulated intestinal fluids (SIF) as early as 30 seconds and 5 minutes, respectively. Results implied low possibility of the protein to survive the digestive fluids to cause any effects to human. Acute oral toxicity test of CSPB proteins showed no mortality in CSPB-treated animals which fed with high dose of purified protein. No differences in body weights, food consumption in treated animals was observed when compared to control animals (bovine serum albumin serve as protein control).

Allergenicity assessment of the genetically modified corn MON87460 was evaluated by using pure CSPB which prepared from the fermentation and purification from *E. coli* (*E. coli*-

produced CSPB). Quantity evaluation was assessed in fresh corn. Various laboratory investigations were done such as sequencing the protein homology with known allergens, heat tolerance and digestibility tolerance in both the simulated gastric and intestinal fluid. Data provided from the company showed a low risk to be as an allergen of CSPB protein. Results from bioinformatic evaluation of CSPB proteins showed no sequence similarities to known allergens. Digestibility test of CSPB protein in SGF and SIF, shows rapidly digested in SGF and SIF as early as 30 seconds and 5 minutes, respectively. Results implied low possibility of the protein to survive the digestive fluids to cause any allergic effects to human.

According to the scientific data and information provided by the company, it can be concluded that MON87460 corn is substantially equivalent to its counterpart and safe to use as food refer toxicity and allergenicity assessment. There is no indication that protein derived from MON87460 corn are toxins and can be allergen.