



Uttalelse fra Faggruppe for genmodifiserte organismer i Vitenskapskomiteen for mattrygghet

27.02.08

Helse- og miljørisikovurdering av genmodifisert hagenellik- linje Moonlite 123.2.38 fra Florigene Ltd. (C/NL/04/02)

SAMMENDRAG

Helse- og miljørisikovurderingen av den genmodifiserte nelliklinjen Moonlite 123.2.38 fra Florigene Ltd. (C/NL/04/02) er utført av Faggruppe for genmodifiserte organismer under Vitenskapskomiteen for mattrygghet. I forbindelse med slutføring av saksbehandling av søknad om godkjenning av nelliklinjen for import og salg som annen nellik (utelukkende avskårne blomster) i Norge, er Vitenskapskomiteen for mattrygghet blitt bedt av Direktoratet for naturforvaltning (DN) og Mattilsynet om å foreta en vitenskapelig risikovurdering av Moonlite 123.2.38 med hensyn på eventuelle effekter på helse og miljø. Florigene Moonlite (C/NL/04/02) ble etter oppdrag fra DN vurdert av Faggruppe for genmodifiserte organismer i 2005.

Vurderingen av genmodifisert hagenellik, linje Moonlite 123.2.38 er basert på dokumentasjon som er gjort tilgjengelig fra DN, EFSA og Folkehelseinstituttet. I tillegg er det benyttet informasjon fra uavhengige vitenskapelige publikasjoner i vurderingen. Moonlite er vurdert i henhold til tiltenkt bruk, og i overensstemmelse med kravene i genteknologiloven og forskrift om konsekvensutredning etter genteknologiloven. Videre er kravene i EUs utsettingsdirektiv 2001/18/EF med annekser, og EFSA's retningslinjer for risikovurdering av genmodifiserte planter (EFSA 2006a) lagt til grunn for vurderingen. Den vitenskapelige vurderingen omfatter transformeringsprosess og vektorkonstruksjon, karakterisering og nedarving av det rekombinante DNA-fragmentet, toksiner, metabolitter, allergener, proteiner, morfologiske egenskaper, potensiale for genoverføring og ikke-intenderte effekter på fitness.

Moonlite er fremkommet ved at jordbakterien *Agrobacterium tumefaciens* (stamme AGL0), som inneholder plasmidvektoren pCGP1470, ble dyrket sammen med planteceller fra den umodifiserte nelliksorten 'White Unesco'. Det rekombinante DNA-fragmentet, som er satt inn

i vektoren pCGP1470, inneholder pigmentgenene *hfl* (syntetisk flavonol 3' 5' hydroksylasegen) og *dfr* (dihydroksyflavonol-reduktasegen), begge fra petunia (*Petunia x hybrida*). Transformasjonen har ført til endringer i produksjonen av antocyanin-pigmenter i kronbladene, med det resultat at blomsterfargen er endret fra hvit til lilla/blå. I tillegg inneholder Moonlite 123.2.38 *surβ*-genet, et acetolaktatsyntase gen, som uttrykker et mutert acetolactatsyntase (ALS)-enzym. Genet gir nelliklinjen økt toleranse mot herbicider med virkestoff sulfonylurea. Moonlite er genmodifisert med samme genetiske materiale som ble brukt for konstruksjon av nelliklinjen Florigene Moondust (C/NL/96/14). Florigene Moondust ble vurdert av Folkehelseinstituttet i september 1997, og godkjent for import og omsetning av norske myndigheter i 2000.

Utenfor EU/EØS-området er Moonlite godkjent for dyrking i Ecuador, Colombia, Japan og Australia, og for import og videresalg som snittblomst i Canada, USA og Japan.

Søknaden gjelder godkjenning av Moonlite for import og salg av avskårne blomster til prydføremål. Faggruppen har derfor ikke vurdert mulige miljøeffekter knyttet til dyrking av den transgene nelliklinjen. Potensialet for spredning av transgener fra hagenellik beregnet på snittproduksjon vurderes til å være marginalt. Vegetativ spredning skjer ikke spontant hos nellik, og snittplanter har begrenset levetid, liten pollenproduksjon, lav fertilitet og vanskelig tilgjengelig pollen. Risiko for utkryssing med andre dyrkede nelliksorter vurderes derfor til å være ubetydelig. Det er ikke rapportert om spontan hybridisering mellom hagenellik og andre viltvoksende *Dianthus*-arter

Faggruppen finner det lite trolig at avskårne blomster fra nelliken Moonlite vil medføre endret risiko for helse og miljø i forhold til avskårne blomster fra umodifisert nellik.

NØKKELOD

Hagenellik, *Dianthus caryophyllus* L., genmodifisert linje Moonlite 123.2.38, herbicidtoleranse, *hfl*- og *dfr*-gen, *surβ*-gen, SuRB-protein (ALS protein), acetolactatsyntase (ALS), sulfonylureaherbicider, helsemessig trygghet, helse, miljørisiko

INNHOLDSFORTEGNELSE

SAMMENDRAG	1
BAKGRUNN	4
OPPDRAK FRA DIREKTORATET FOR NATURFORVALTING OG MATTILSYNET	4
RISIKOVURDERING	6
KONKLUSJON	14
VURDERT AV (MEDLEMMER AV FAGGRUPPE GENMODIFISERTE ORGANISMER)	14
REFERANSER	15

VURDERT AV

Faggruppe for genmodifiserte organismer:

Knut Berdal (leder), Jihong Liu Clarke, Sonja Klemsdal, Helge Klungland, Casper Linnestad, Anne I. Myhr, Audun Nerland, Ingolf Nes, Kåre M. Nielsen, Hilde-Gunn Opsahl Sorteberg, Odd E. Stabbetorp, Vibeke Thrane,

Koordinatorer fra sekretariatet: Arne Mikalsen, Merethe Aasmo Finne

BAKGRUNN

Faggruppe for genmodifiserte organismer under Vitenskapskomiteen for mattrygghet er blitt bedt av Direktoratet for naturforvaltning og Mattilsynet om å foreta en vitenskaplig vurdering av helse- og miljørisiko i forbindelse med nasjonal sluttbehandling av søknad om godkjenning av den genmodifiserte nelliklinjen Moonlite 123.2.38 fra Florigene Ltd., Melbourne, Australia (C/NL/04/02). Nelliklinjen er godkjent for omsetning i EU/EØS-området under direktiv 2001/18/EF, artikkel 13. Godkjenningen omfatter bruksområdene import og videresalg, og gjelder ikke utsetting/dyrking, eller bruk av nelliklinjen som mat og fôr. Produktet skal omsettes som snittblomst under handelsnavnet Florigene Moonlite™. Notifiseringen C/NL/04/02 omfatter nellikplanter som er produsert ved vegetativ formering (stiklinger), og omfatter ikke avledete sorter fra konvensjonelle kryssinger med Moonlite 123.2.38.

Søknad om markedsføring av den genmodifiserte nelliken fra Florigene Ltd. ble forelagt nederlandske myndigheter i september 2004, som kom med sin anbefaling i desember 2005. Etter en 60-dagers høringsperiode til EU/EØS-landene, leverte EUs vitenskapskomité (EFSA) sin uttalelse i mai 2006 (EFSA 2006b). Endelig godkjenning av søknaden ble gitt i form av Kommisjonsbeslutning 2007/364/EF 23.mai 2007.

Utenfor EU/EØS-området er Moonlite 123.2.38 godkjent for produksjon i Ecuador, Colombia, Japan og Australia, og for import og omsetning som snittblomst i Canada, USA og Japan (Agbios 2008).

Pr. i dag er det godkjent 3 transgene linjer av hagenellik for omsetning som snittblomst på det norske markedet. I tillegg til økt resistens mot sulfonylurea-herbicider, er linjene modifiserte med hensyn på endret blomsterfarge (C/NL/96/14 og C/NL/97/13) og forlenget holdbarhet (C/NL/97/12). Moonlite er genmodifisert med samme genetiske materiale som ble brukt for konstruksjon av nelliklinjen Florigene Moondust (C/NL/96/14). Florigene Moondust ble vurdert av Folkehelseinstituttet i september 1997 (deres ref.: 97/01659, MINT/JAL/AMI/607.1), og godkjent for import og omsetning på det norske markedet i 2000.

OPPDRAK FRA DIREKTORATET FOR NATURFORVALTING OG MATTILSYNET

I forbindelse med slutføring av saksbehandling av søknad C/NL/04/02, genmodifisert hagenellik - linje 123.2.38 Moonlite fra Florigene Ltd., har Direktoratet for naturforvaltning og Mattilsynet i brev datert henholdsvis 22.11.2007 (ref. 2005/3295 ART-BM-EBI) og 4.2.2008 (ref. 2008/13804) bedt Vitenskapskomiteen for mattrygghet om å foreta en vitenskapelig risikovurdering av nelliklinjen med hensyn på eventuelle effekter på helse og miljø. Søknaden omfatter bruksområdene import og salg som annen nellik (avskårne blomster). Florigene Moonlite (C/NL/04/02) ble etter oppdrag fra DN vurdert av Faggruppe for genmodifiserte organismer i 2005.

Faggruppe for genmodifiserte organismer skal vurdere søknaden om markedsføring av genmodifisert nellik til bruk som avskårne blomster under direktiv 2001/18/EF artikkel 13. Oppdraget omfatter forhold knyttet til miljørisiko som gjelder for alle land som omfattes av godkjenningen (EØS-området), og på miljørisiko som vil være spesielt viktige for Norge. Det

skal også gis en samlet konklusjon om miljørisiko i tråd med kravene i forskrift om konsekvensutredning etter genteknologiloven, vedlegg 2C.

Produktet som ønskes vurdert

Genmodifisert hagenellik, linje Moonlite123.2.38. fra Florigene Ltd., Australia

Unik kode: FLO-40644-4.

Notifikasjonsnummer i EU: C/NL/04/02

Status i EU: Godkjent under direktiv 2001/18/EF i 2007.

Svarfrist til DN: 5. februar 2008.

RISIKOVURDERING

1. Innledning

Risikovurderingen av den transgene hagenelliken Moonlite 123.2.38 er i hovedsak basert på dokumentasjon som er gjort tilgjengelig fra EFSA, samt uavhengige vitenskapelige publikasjoner. Vurderingen er gjort i henhold til tiltenkt bruk, og i overensstemmelse med kravene i genteknologiloven og forskrift om konsekvensutredning etter genteknologiloven, samt kravene i direktiv 2001/18/EF med annekser.

Faggruppe for genmodifiserte organismer har på faggruppemøtet 02.02.05 vedtatt å bruke EFSAAs retningslinjer som gruppens retningslinjer for vurdering av genmodifiserte planter. Prinsippene som er lagt til grunn for vurderingen, er derfor hentet fra EFSAAs dokument "Guidance document of the scientific panel on genetically organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed" (EFSA 2006a).

I henhold til Vitenskapskomiteen for mattrygghets uttalelse på møtet 23. april 2004 har Faggruppe for genmodifiserte organismer vedtatt at i de sakene hvor EFSA har kommet med sine uttalelser før Faggruppe for genmodifiserte organismer får sakene til behandling, skal søknadene behandles på samme måte som i EU-landene, dvs. ved en noe forenklet risikovurdering. EFSA har 17. mai 2006 avgitt en vitenskapelig vurdering av nellik Moonlite 123.2.38 (EFSA 2006b).

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

1.1. Beskrivelse av egenskaper og virkningsmekanismer

Moonlite er fremkommet ved at jordbakterien *Agrobacterium tumefaciens* (stamme AGL0), som inneholder plasmidvektoren pCGP1470, ble dyrket sammen med planteceller fra den umodifiserte nelliksorten 'White Unesco'. Et rekombinant DNA-fragment som er satt inn i vektoren pCGP1470 inneholder pigmentgenene *hfl* (syntetisk flavonol 3' 5' hydroksylase gen) og *dfr* (dihydroksyflavonolreduktase gen), begge fra petunia (*Petunia x hybrida*). Dette rekombinante DNA-fragmentet ble overført (transformert) til nellikens planteceller. Genene på DNA-fragmentet fører til endringer i produksjonen av antocyaninpigmenter i kronbladene, med det resultat at blomsterfargen endres fra hvit til blå/fiolett. I tillegg er linje 123.2.38 modifisert med genet *surβ* fra tobakk, et acetolaktat-syntase gen, som uttrykker et mutert acetolactatsyntase(ALS)-enzym. Genet gir nelliklinjen økt toleranse mot herbicider med virkestoff sulfonyleurea. Moonlite er genmodifisert med samme genetiske materiale som ble brukt for konstruksjon av linjen 'Florigene Moondust' (C/NL/96/14).

2. Molekylær karakterisering

2.1. Transformasjonssystem og vektorkonstruksjon

Til transformasjon er brukt *Agrobacterium tumefaciens* stamme AGL0 som inneholder vektoren pCGP1470 til transformering av celler fra den konvensjonelle nelliksorten 'White

Unesco'. Det rekombinante DNA fragmentet inneholder tre ekspresjonskassetter. En ekspresjonskasset for *surβ* -, en for *dfr* - og en for *hfl* genet.

2.2. Karakterisering av geninnsettingen og det rekombinante DNA-fragmentet

Transformasjonssystemet/konstruksjon

Transformasjonssystemet som er benyttet er Ti-plasmidet pCGP1470 fra *Agrobacterium tumefaciens*. Tetracyclinresistensgenet (*tet(A)*gen) er benyttet til oppformering av plasmidet i *E. coli*. Det er vist ved analyse at fullengde *tet(A)* genet ikke er til stede i nelliken.

Southern blot og PCR har blitt brukt for å karakterisere det rekombinante DNA-fragmentet i planten. Molekylærbiologisk karakterisering viser at det er satt inn bare en fullengde kopi av rekombinant DNA-fragment i nellikens genom. Dette fragmentet inneholder:

LB	venstre grense fra Ti-plasmid <i>A. tumefaciens</i> , overfører DNA til planten
35S <i>surβ</i>	blomkål mosaikk virus (CaMV) promoter, mutert acetolactatsyntasegen (<i>als</i> -gen); sulfonyltoleransegen fra tobakk (<i>Nicotiana tabacum</i>)
<i>surβ</i> 3'	terminatorområde for <i>surβ</i> genet
P-CHS-A	kronbladspesifikk promoter, dirigerer fargeuttrykket til kronblad fra løvemunn (<i>Antirrhinum majus</i>)
<i>hfl</i>	flavonoid-3'5'-hydroksylase fra petunia (<i>Petunia x hybrida</i>), danner delfinidin avledet pigmenter
TD8 3'	DNA terminator fra petunia (<i>Petunia x hybrida</i>)
P-Mac-1	konstitutiv promoter dannet ved fusjon av sekvenser fra CaMV og Mas promotere
<i>dfr</i>	dihydroflavonol reduktase, nøkkelenzym i antocyanin biosynteseveien fra petunia (<i>Petunia x hybrida</i>)
Tmas	mannopinsyntetase genet, blir ikke translatert, men terminerer transkriptet fra <i>A. tumefaciens</i>
RB	høyre grense, overfører DNA til planten, fra <i>A. tumefaciens</i>

2.3. Beskrivelse av innskutte gener i fargeendrede transformanter

Dfr- og *hfl*-genene stammer fra petunia (*Petunia x hybrida*), en vanlig dyrket ettårig plante av slekten *Petunia* fra søtvierfamilien (*Solanaceae*). *Dfr*- og *hfl*-genes enzymer danner antocyaner. Morplanten, cv. 'White Unesco', til den fargeendrede nelliken har et mutert *drf*-gen og danner ikke pigmenter. *Hfl*-genet er under regulering av en stedbunden promoter, og genet danner delfinidinpigmenter fra forløpermolekyler som produseres fra antocyanidin biosynteseveien. Delfinidin- og cyanidinpigmenter er blå eller fiolette, og finnes i for eksempel blåbær, solbær og blå druer. Enkelte antocyaner benyttes til farge av næringsmidler, og står oppført i Forskrift om tilsetningsstoffer til næringsmidler under sekkebetegnelsen antocyaner (E163).

Surβ er et mutert *als*-gen som finnes i tobakk, sukkerbete og vårskrinneblom (*Arabidopsis thaliana*). *Surβ*-genet koder for et mutert acetolactatsyntase enzym som ikke er sensitiv for sulfonylureaherbicider. Acetolactatenzymet er et viktig enzym i dannelsen av aminosyrer som

leucin, isoleucin og valin. *Als*-genet er til stede i alle planter. Sulfonylurea-herbicider er ikke vanlig å bruke ved produksjon av snittnellik i veksthus, og *suRF*-genet er ifølge søker introdusert for *in vitro*-seleksjon av transformerte celler. Det muterte *als*-genet er i 1995 vurdert av Arbeidsgruppe for næringsmiddeltoksikologi og risikovurdering under Nordisk Ministerråds Embetsmanns-komite for livsmedel (TemaNord 1996). Konklusjonen fra denne rapporten er at det muterte genet, som har en basepar substitusjon, koder for proteiner som normalt er til stede i planter. Det muterte enzymet opprettholder normal fysiologisk funksjon i plantens aminosyresyntese, men har endret affinitet til herbicidet. Mutanten kan derfor anses som lik villtypegenet, og som sådan ikke er noen ny komponent i matplanter.

Andre innskutte gener

P-CHS-A-, Pmac-1- og 35S- promoterene er regulatoriske elementer for uttrykket av *hfl*-, *dfr*- og *surβ*-genene. Promotorer binder RNA polymerase, men uttrykkes ikke som RNA og heller ikke som protein. *Tmas*- og *TD8-3'*-genene er utranslaterte gener som terminerer de forskjellige gentranskriptene. De uttrykkes ikke som RNA og derfor ikke som protein.

Molekylærbiologiske analyser

Molekylærbiologiske analyser viser at nelliklinjen Moonlite 123.2.38 inneholder to transgene loki, et lokus (lokus 1) som inneholder det rekombinante DNAet som ligger mellom høyre og venstre grense til plasmidet, samt < 20 % av *tet(A)* genet. Denne *tet(A)*-sekvensen består av ca. 190 basepar fra genets 3'-ende. Det andre lokuset (lokus 2) inneholder sannsynligvis et trunkert *dfr* gen, *mas* terminatoren og to kopier av høyre grense. Det er også påvist plasmidsekvenser på 528 bp i 5' enden av lokus 1, og 425 bp i 3'-enden av lokus 2.

PCR-analyser av det rekombinante DNA fragmentet i Moonlite viser at flankesekvensene til fragmentet er genomisk DNA fra nellik. Flankerende sekvenser til dette rekombinante DNA-fragmentet er sekvensert, 150 bp oppstrøms (5'-flankesekvens) og 150 bp nedstrøms (3'-flankesekvens). Både 5'- og 3'-flankesekvenser ble undersøkt med BLAST analyse for å undersøke egenskapen(e) og eventuelle funksjoner til flankesekvensene. Det er påvist to åpne leserammer (ORF) i 3'-fankerende området ved lokus 1. Det ble ikke påvist ORF ved lokus 2.

2.4. Informasjon vedr. uttrykk av introduserte gener og åpne leserammer (ORF)

Teoretiske analyser av mulige polypeptider fra hver leseramme v.h.a. allergen (BLAST2.2.13)- og toksin (GenBank, SWISS-PROT)-databaser viser ingen biologisk relevante strukturelle likheter til allergener og toksiner. ORF 2 viser stor likhet til *tet(A)* protein fra forskjellige kloningsvektorer. Størrelsen på peptidet er 69 aminosyrer.

Resultatene fra disse teoretiske analysene viser at det er lite sannsynlig at det dersom noen av disse leserammene skulle bli transkribert vil resultere i polypeptider som medfører potensielle toksiske eller allergene konsekvenser.

2.5. Nedarving og stabilitet av innsatt DNA

Hagenellik formeres utelukkende vegetativt, og spaltingsdata er følgelig ikke tilgjengelig. Det er ikke rapportert om instabilitet i introduserte egenskaper i den kommersielle produksjonen av Florigene MoonliteTM siden 1999. Søker opplyser at data fra produsenter og egne inspeksjoner viser at frekvensen av avvikende fenotyper mhp blomsterfarge, som resultat av somatiske mutasjoner, er svært lav (ikke kvantifisert).

2.6. Delkonklusjon

Faggruppen har vurdert de fysiske, kjemiske og funksjonelle karakteriseringene av proteinene og finner at informasjonen er tilstrekkelig. Faggruppen konkluderer at karakteriseringen av det rekombinante innskuddet i Moonlite er tilfredsstillende.

3. Komparative analyser

Valg av komparator og forsøksdesign

Nellik Moonlite 123.2.38 er sammenlignet med den ikke-transgene nelliklinjen 123. Kontrollinjen produserer ikke antocyaniner og har hvite kronblad.

3.1. Analyser av komponenter

Det er foretatt analyser av delfinidin, cyanidin og petunidin. Petunidin ble ikke påvist i kronblad. Mengdene av delfinidin og cyanidin i kronblad er henholdsvis 0,093 mg/g og 0,031 mg/g ferskvekt. Andre analyser er ikke aktuelt da avskåren nellik ikke benyttes til føde for mennesker eller dyr.

3.2. Morfologiske karakterer

Nelliklinjen Moonlite 123.2.38 og kontrollsorten 123 ble dyrket i feltforsøk og sammenlignet med hensyn på morfologiske karakterer som stilkengde, bladlengde og – bredde, knoppform, blomsterdiameter, antall grifler, samt lengde av kron- og begerblad. Med unntak av de introduserte egenskapene og kronbladlengde, ble det ikke funnet signifikante forskjeller mellom linjene. Gjennomsnittlig lengde på kronblad av Moonlite 123.2.38 var 3,5 cm sammenlignet med 2,7 cm hos kontrollsorten.

3.3. Delkonklusjon

Resultatene fra undersøkelsene av morfologiske karakterer viser at med unntak av herbicidresistens, er det ingen eller små forskjeller mellom nellik Moonlite og kontrollsorten.

4. Dokumentasjon av toksisitet og allergisitet

4.1. Toksisitet

Hensikten med akutt toksisitetsstudie er å klarlegge om tilfeldig eksponering av Moonlite kan påvirke helsen til dyr og mennesker.

Akutt oral fôringsstudie på mus

Florigene har utført 14-dagers oral fôringsstudier på mus med ekstrakter av frosne kronblad (2 gram kronblad/kg kroppsvekt) fra Moonlite 123.2.38, samt vannuttrekk fra den umodifiserte varieteten 123. Siden antocyaniner er vannløslige vil ekstrakter fra Moonlite 123.2.38 inneholde delfinidin og cyanidin. Studiene er utført i henhold til retningslinjene fra OECD (akutt toksisitetstest nr. 401). Etter 14 dagers observasjonsperiode ble alle dyrene avlivet. Det

er utført patologiske undersøkelser. Det er ikke påvist testrelaterte skader på dyrene. Det ble påvist ca. 4 % vektøkning hos de dyrene som ble føret med vannuttrekk fra Moonlite.

Ames test

Et Ames testsystem ved bruk av fire forskjellige stammer fra *Salmonella typhimurium* ble benyttet for å evaluere det mutagene potensialet til bladekstrakt fra nelliken. Ingen signifikant mutagen effekt ble påvist, sammenlignet med ekstrakt fra umodifisert nellik.

In vitro cytotoxissitets-test

Florigene har laget egen prosedyre for denne testen. Bladekstrakter, fra enten Moonlite eller umodifisert foreldresort, ble testet på vekst av humane tarmceller i kultur. Det ble ikke påvist noen forskjeller på celleveksten i forhold til ekstrakt fra umodifisert nellik.

Teoretisk studie av toksisitet av antocyaninene delfinidin og cyanidin

Antocyaniner er naturlige pigmenter som finnes i bær, frukt, grønnsaker og i kronblad hos blomster. Mengde antocyaniner i blåbær er ca. 1,5 mg/g, solbær 3 mg/g og krekling ca. 7 mg/g ferskvekt.

De naturlige forekommende antocyaniner kan avledes av et lite antall antocyanidiner. De viktigste antocyaninene er delfinidin og cyanidin, som uttrykkes i denne nelliken, samt pelargonidin. En antocyanin inneholder en fargekomponent, f.eks delfinidin, og et eller to glykosider, dvs. sukkerrester. Florigene har utført teoretiske studier av potensiell toksisitet av delfinidin og cyanidin.

Cyanidin

Cyanidin finnes naturlig i umodifisert nellik som har røde, rosa og lilla farger. Mengde cyanidin i Moonlite er ca. 20-150 ganger lavere enn de umodifiserte nellikvarietetene Florigene har brukt til sammenligning. Cyanidinmengden som finnes i kronblad i nelliken Moonlite anses ikke å utgjøre endret risiko for helse i forhold til cyanidinmengden i kronblad fra umodifisert nellik.

Delfinidin

I kronblad er det påvist 0,09 mg delfinidin/g. Mengde delfinidin i for eksempel blåbær er ca. 0,3 mg/g ferskvekt. Den akutte toksisiteten til antocyaniner er lav i gnagere. Delfinidin er ikke kjent for å være toksisk. Delfinidin og en delfinidin/cyanidin polymer var inaktiv i en rekke gentoksiske screening tester, men ga kromosomskade i pattedyrceller i kultur. I andre studier hemmet delfinidin den mutagene aktiviteten til benz(α)pyren. Den er også vist å være et fremragende anti-inflammatorisk middel. Delfinidin og dets glykosider er vist å være sterke antioksidanter og å hemme lipidperoksidering av UVB lys. Det estimerte akseptable daglige inntaket for mennesker er av IPCS satt til 2,5 mg/kg kroppsvekt (IPCS 2003). Delfinidinmengden som finnes i kronblad i nelliken Moonlite anses ikke å utgjøre endret risiko for helse i forhold til de mengdene som er påvist i bær.

4.2. Allergenitet

For å undersøke om transformasjonsprosessen kan ha ført til økning av endogene allergener i Moonlite nellik i forholdt til umodifiserte nellik ble det utført søk i databaser. Det er ikke påvist allergener fra slike baser. I henhold til EFSA er det påvist at arbeidere som har arbeidet med nellik i flere år har blitt allergiske mot nellik (Sanchez-Guerrero et al 1999; Sanchez-

Fernandez et al 2004). Denne allergien kan skyldes enten nellik eller midd (*Tetranychus urticae*), eller begge samtidig.

4.3. Delkonklusjon

Nelliklinjen skal benyttes som avskårne prydblomster. I enkelte tilfeller benyttes kronblad som garnityr. Ingen av proteinene betraktes som potensielle toksiske proteiner da de er til stede i de fleste planter og er ikke vist å være helseskadelige. Ingen av proteinene er kjent for å være allergener. Delfinidin og dets pigmenter er ikke å betrakte som toksiner. Sulfonylureaherbicider utgjør, etter Faggruppens syn, ikke noe problem da denne planten kun benyttes som prydblomst og det er ikke meningen at disse herbicidene skal benyttes på planten. Resultater fra toksisitetstester viser at bladedstrakter fra Moonlite linje 123.2.38 ikke er akutt toksisk eller inneholder mutagener.

Faggruppen finner det lite trolig at bruk av Moonlite linje 123.2.38 som avskårne blomster samt som garnityr, vil medføre endret risiko for helse i forhold til umodifisert nellik.

5. Miljørisikovurdering

Godkjenningen/notifiseringen av den transgene nelliklinjen Moonlite 123.2.38 fra Florigene Ltd. under direktiv 2001/18/EF omfatter bruksområdene import og videresalg, og gjelder ikke utsetting/dyrking, eller bruk av nelliklinjen som mat eller fôr. Siden produktet som skal importeres og omsettes er snittblomster, vil det være en svært begrenset eksponering av levende plantedeler til miljøet.

5.1. Innledning

Nellikslekten (*Dianthus* L.) er en svært heterogen planteslekt med om lag 300 ett-, to- og flerårige arter, med opprinnelse i sørlige deler av Russland og sørlige og sentrale deler av Europa (OGTR 2006). *Dianthus*-artene er adapterte til alpine regioner i Europa og Asia, samt kystområder rundt Middelhavet. Slekten inneholder flere svært gamle kulturplanter med røtter tilbake i antikken. Hagenellik (*D. caryophyllus* L.) har trolig vært dyrket som prydblomst i Skandinavia siden middelalderen (<http://www.plantearven.no>). Viltvoksende populasjoner av hagenellik er bare kjent fra Hellas, Italia, Sicilia og Sardinia (Tutin *et al* 1993).

I dag dyrkes hagenellik som en ettårig utplantingsplante i Norge. Tilgjengelig sortsmateriale har dårlig overvintringsevne, og planten kan ikke dyrkes som staude i områder med temperaturer under -5 °C. Det er ingen dyrking av hagenellik beregnet på snittproduksjon her i landet. Det foreligger ingen samlet statistikk over import av snittnellik til Norge.

Villformer av *D. caryophyllus* L. har enkle, åpne blomster med 5 kronblad. Som et resultat av langvarig vegetativ formering og seleksjon for blomsterkarakterer, har det skjedd betydelige morfologiske endringer av nellikplanten (ref. OGTR 2006). Hos sorter som benyttes til snittproduksjon har det blitt selektert for karakterer knyttet til økt blomstestørrelse og økt antall kronblad over mange generasjoner. De fleste pollenbærere er omdannet til kronblad, og hos dagens sortsmateriale varierer antall kronblad mellom 30 og 100. Dette medfører at plantenes reproduksjonsorganer er fullstendig omsluttet av kronblad.

Hagenellik, som nyttes til produksjon av snittblomster, blir utelukkende oppformert ved stiklingsformering eller ulike typer vevskultur. Plantene viser innavlsdepresjon allerede etter tre generasjoner med selvbestøvning, og produksjon av F₁-hybrider er ikke aktuelt (Sato et al 2000). Nellik danner ikke vegetative formeringsorganer som stoloner, rhizomer eller yngleknopper, og vegetativ spredning skjer ikke spontant. Under oppformering tas stiklinger fra spesielle morplanter, som beskjæres kontinuerlig for å danne maksimalt antall vegetative skudd fra sideknopper. Etter behandling med plantehormoner som auxin (indoleddiksyre (IAA)), blir stiklingene satt til roting under betingelser med høy fuktighet.

Majoriteten av artene i slekten *Dianthus* er selvsterile. Nellikplantene er protandriske, dvs. at pollenet utvikles og spres før de hunnlige gametene er modne. Arret er ikke mottagelig for pollen før en til to uker etter pollespredning, og dyrkede former av nellik krever handpollinering for å sette frø (Bird 1994).

Dyrkede sorter av hagenellik produserer generelt lite pollen ofte med dårlig spireevne, og har følgelig dårlig eller manglende frøsetting (Galbally & Galbally 1997). Mengde og kvalitet av pollen kan imidlertid variere mellom sorter. Pollenkornene hos nellikplantene er tunge og klebrige og er ofte lite levedyktige. Vind spiller liten rolle i pollenspredningen, og under naturlige betingelser skjer krysspollineringen ved hjelp av insekter som vektorer. Blomsterformen til nellik, med lang avstand til nektarier ved basis av blomsten, gjør også at pollenet er vanskelig tilgjengelig for insektene.

Det er ikke kjent hvilke arter som primært pollinerer *D. caryophyllus*, men en antar at ulike *Lepidoptera*-arter, som er kjent fra andre *Dianthus*-arter, er involvert (OGTR 2006). I forbindelse med kommersiell snittproduksjon av hagenellik og videre handtering av avskårne blomster er det imidlertid ikke rapportert om insektpollinering.

5.2. Potensiale for ikke intenderte effekter på fitness relatert til genmodifiseringen

Nelliklinjen Moonlite 123.2.38 inneholder et rekombinant DNA-fragment med pigmentgenene *hfl* (syntetisk flavonol 3' 5' hydroksylase gen) og *dfr* (dihydroksoflavonol-reduktase gen), begge fra petunia (*Petunia x hybrida*). Transformasjonen har ført til endringer i produksjonen av antocyanin-pigmenter, med det resultat at fargen på kronbladene er endret fra hvit til blåfiolett. Antocyaniner er utbredt hos arter i planteslektene *Petunia*, *Rosa* og *Chrysantemum*. Det er ingen grunn til å anta at tilstedeværelse av pigmentene delfinidin og cyanidin vil medføre endret fitness utenfor dyrkingsmiljø sammenlignet med konvensjonelle nelliklinjer.

Nelliklinjen har også fått satt inn *surβ*-genet, et mutert *als*-gen fra tobakk. *Surβ*-genet koder for et mutert acetolactatsyntase-enzym, som gir nelliklinjen økt toleranse mot herbicider med virkestoff sulfonylurea. Acetolactatenzymet er et viktig enzym i dannelsen av aminosyrer som leucin, isoleucin og valin. I følge dokumentasjon fra søker benyttes ikke sulfonylurea herbicider ved produksjon av snittnellik, men *surβ*-genet er introdusert for *in vitro*-seleksjon av transformerte celler. I Norge brukes herbicider med virkestoff sulfonylurea i stor utstrekning mot frøgras i korn (<http://www.plantevernguiden.no>). Toleranse mot ALS-hemmende herbicider er utbredt i ugraspopulasjoner, hovedsakelig relatert til et mutert *surβ* (*als*)-gen (Tranel & Wright 2002). Det er også påvist resistens mot sulfonylurea i norske populasjoner av vassarve (Fykse 2004). Med bakgrunn i tiltenkt bruk av nelliklinjen er det ingen grunn til å anta at tilstedeværelse av *surβ*-genet vil ha noen økologisk betydning. Det

kreves optimale forhold for roting av stiklinger, og sannsynligheten for at kasserte planter eller avskårne blomster skal rote seg, og etablere nye planter og er derfor neglisjerbar. Til tross for omfattende dyrking av hagenellik i Europa over flere hundre år, er det ikke etablert naturaliserte populasjoner utenfor dyrkingsområder.

5.3. 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 kan skje under nedbryting av vegetativt plantemateriale og/eller pollen.

5.3.1. 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; VKM 2005).

Ut fra dagens vitenskapelig innsikt mht barrierer for genoverføring mellom ubeslektede arter og flere års forskning for om mulig å framprovosere tilfeldig overføring av genetisk materiale fra planter til mikroorganismer, dyr eller mennesker gjennom inntak eller eksponering, er det ingenting som tyder på at transgenene i nelliklinjen skal kunne overføres til andre enn naturens kryssingspartnere, dvs. annen dyrket nellik. Nielsen et al. (2000) og De Vries og Wackernagel (2002) har undersøkt persistens av DNA og opptak av GM DNA i jord. I disse laboratorieforsøkene ble det detektert svært små mengder DNA som var overført fra planter til bakterier. Forutsetningen for at dette kunne skje var sekvenshomologi mellom plantetransgenet og mottagerbakterien.

Med bakgrunn i opprinnelse og karakter/egenskaper av de innsatte genene og mangel på seleksjonspress i 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 Moonlite 123.2.38 vil etableres stabilt i genomet til mikroorganismer i miljøet. Ut fra tilgjengelig kunnskap er det ikke grunn til å forvente at det vil skje horisontal genoverføring av DNA-materiale fra den transgene nelliklinjen.

5.3.2. Vertikal genoverføring

Dianthus-artenes reproduksjonsbiologi, inkludert marginal pollenproduksjon og dårlig fertilitet hos moderne sorter av hagenellik, indikerer at potensialet for genoverføring til viltvoksende populasjoner eller andre dyrkede nelliksorter via pollen er svært begrenset. I tillegg kommer at i forbindelse med produksjon av snittblomster blir nellikplantene høstet før de når pollenmodning. Frøutviklingen hos nellik tar fem til åtte uker (OGTR 2006), og ved en eventuell vellykket pollinering vil dette overstige forventet levetid som snittblomst.

Hagenellik er viltvoksende i kystområder rundt Middelhavet, nærmere bestemt i Hellas, Italia, Sicilia og Sardinia (Tutin *et al* 1993). Det er funnet forvillede planter av hagenellik på et fåtall lokaliteter i Norge, men arten etablerer ikke populasjoner utenfor dyrkingsområder (Lid og Lid 2005).

I Norge er *Dianthus*-artene engnellik (*D. deltoides* L.), saronnellik (*D. armeria* L.), busknellik (*D. barbatus* L.) og silkenellik (*D. superbus* L.) viltvoksende (Lid & Lid 2005). I tillegg er forvillede planter av kartunianernellik (*D. carthusianorum* L.), kinanelik (*D. chinensis* L.) og fjærnellik (*D. plumarius* L.) registrert, hovedsaklig rundt Oslofjorden. Det er laget hybrider mellom *D. caryophyllus* L. og henholdsvis busknellik og engnellik ved kontrollerte kryssinger (Umiel et al 1987). Det er imidlertid ikke rapportert om spontan hybridisering i felt mellom hagenellik og viltvoksende *Dianthus*-arter (OGTR 2006).

5.4. Delkonklusjon

Potensialet for spredning av transgener fra hagenellik beregnet på snittproduksjon vurderes til å være marginalt. Vegetativ spredning skjer ikke spontant hos nellik, og snittplanter har begrenset levetid, liten pollenproduksjon, lav fertilitet og vanskelig tilgjengelig pollen. Risiko for utkryssing med andre dyrkede nelliksorter vurderes derfor til å være ubetydelig. Det er ikke rapportert om spontan hybridisering mellom hagenellik og andre viltvoksende *Dianthus*-arter.

KONKLUSJON

Søknaden gjelder godkjenning av nelliklinjen Moonlite 123.2.38 for import og omsetning som snittplanter til pryddformål. Kronblader fra nellik har også vært benyttet som garnityr i matretter. Cyanidin og delfinidin er vanlige pigmenter i mange pryddplanter og bær, som blåbær, krekling og solbær. Faggruppen vurderer at tilfeldig inntak av kronblad fra Moonlite er lavt, og at mengde delfinidin som inntas fra slike kronblad ubetydelig, sett i forhold til inntaket fra bær, frukt og vin. Ingen av proteinene betraktes som potensielle toksiske eller allergene. Faggruppen konkluderer med at avskårne blomster fra den genmodifiserte nelliken Moonlite ikke utgjør noen endret risiko for helse sammenlignet med umodifisert nellik.

Potensialet for spredning av transgener fra hagenellik beregnet på snittproduksjon vurderes til å være marginalt. Vegetativ spredning skjer ikke spontant hos nellik, og snittplanter har begrenset levetid, liten pollenproduksjon, lav fertilitet og vanskelig tilgjengelig pollen. Risiko for utkryssing med andre dyrkede nelliksorter vurderes derfor til å være ubetydelig. Det er ikke rapportert om spontan hybridisering mellom hagenellik og andre viltvoksende *Dianthus*-arter

Faggruppen finner det derfor lite trolig at bruk av nelliken Moonlite vil medføre endret risiko for helse og miljø i forhold til annen nellik.

REFERANSER

- Agbios (2008) Agbios GM Database. Information on GM Approved Products. <http://www.agbios.com/dbase.php>
- Bird (1994) Border Pinks. Timber Press, Portland. Pp 1-174.
- 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 (2006a) Guidance document of the scientific panel on genetically organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed. 100 p. http://www.efsa.europa.eu/en/science/gmo/gmo_guidance/660.html
- EFSA (2006b) Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on a request from the Commission related to the notification (Reference C/NL/04/02) for the placing on the market of the genetically modified carnation Moonlite 123.2.38 with a modified colour, for import of cut flowers for ornamental use, under Part C of Directive 2001/18/EC from Florigene1. (Question No EFSA-Q-2005-282). The EFSA Journal 362: 1-19.
- Fykse, H (2004) Resistens mot herbicid. Grønn kunnskap 8:347-357.
- Galbally, J & Galbally E (1997) Garnations and Pinks. Timber Press Inc, Portland.
- Guoboa, W, Jingping Y, Gongcheng, F, Dawei, L & Zhen Y (1995) Studies on carnation (*Dianthus caryophyllus*) species hybridization. Acta Horticulturae 404: 82-90.
- IPCS (2003). International Programme on Chemical Safety. Chemical Safety Information from Intergovernmental Organizations. <http://www.inchem.org/> (date accessed 11/2/03). Anthocyanins (WHO Food Additives Series 17).
- Lid J & Lid DT (2005) Norsk flora. Det Norske Samlaget, Oslo. 7. utgave. 1230s.
- Nielsen KM (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 KM., van Elsas JD & Smalla K (2000). Transformation of *Acinetobacter* sp. 13(pFG4deltanptII) with transgenic plant DNA in soil microcosms and effects of kanamycin on selection of transformants. Appl Environ Microbiol 66: 1237-42.
- OGTR (2006) Office of the Gene Technology Regulator, Department of Health and Ageing, Austrian Government. The Biology and Ecology of *Dianthus caryophyllus* L. (Carnation). 18 p, <http://www.ogtr.gov.au/rtf/ir/bioeco-carnation.rtf>

- Sanchez-Fernandez, C, Gonzalez-Gutierrez, ML, Esteban-Lopez, MI, Martinez, A & Lombardero M, (2004) Occupational asthma caused by carnation (*Dianthus caryophyllus*) with simultaneous IgE-mediated sensitization to *Tetranychus urticae*. *Allergy*, 59, 114–119.
- Sanchez-Guerrero, IM, Escudero, AI, Bartolome, B & Palacios, R (1999) Occupational allergy caused by carnation (*Dianthus caryophyllus*). *J Allergy Clin Immunol*, 104, 181–185.
- Sato, S, Katoh, N, Yoshida, H, Iwai, S & Hagimori M (2000) Production of doubled haploid plants of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) by pseudofertilized ovule culture. *Scientia Horticulturae* 83: 301-310.
- TemaNord 530 (1996) Health Effects of Marker Genes in Genetically Engineered Food Plants. TemaNord 1996:530. ISBN 92-912-0845-0.
- Tranel, PJ & Wright, TR (2002) Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: What have we learned? *Weed Science* 50: 700-712.
- Tutin, TG, Burges, NA, Chater, AO, Edmondson, JR, Heywood, VH, Moore, DM, Valentine DH, Walters, SM & Webb, DA (1993) *Flora Europea*. Cambridge University Press, Cambridge. Pp 227-246.
- Umiel, N, Behjan, K & Kagan, S (1987) Genetic variation in carnation: colour patterns of petals, number of buds and arrangements of flower buds on the stems. *Acta Horticult* 216:355-358.
- 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. 62 s