

GENTEKNIKNÄMNDEN

Vårt datum

2004-02-12

Vårt Dnr

016/2004

Ert datum

2004-01-22

Ert Dnr

22-3501/96

Jordbruksverket
551 82 Jönköping

Angående utsläppande på marknaden av genetiskt modifierad stärkelsepotatis

Gentekniknämnden har tidigare yttrat sig över i princip samma ärende som den dåvarande sökanden, Amylogene HB, inlämnade till Jordbruksverket 1996. Nämndens yttrande över detta ärende bifogas (bilaga 1). Nämnden har därefter utarbetat en policy angående antibiotikaresistensgener i växtmaterial (bilaga 2).

Det nu aktuella ärendet, som är en version av den tidigare ansökan, överlämnades den 17 januari 2003 av den nuvarande sökanden, Plant Science Sweden AB (PSS), till Jordbruksverket som därefter har begärt in kompletterande information i ärendet.. Jämfört med den tidigare ansökan från Amylogene HB har den nya ansökan uppdaterats enligt direktiv 2001/18/EG.

Ansökan från PSS gäller linje EH92-527-1 som modifierats i syfte att öka amylopektinhalten i potatisknölnarna. Ansökan omfattar utprovning, sättpotatisproduktion och kontraktsodling inom EU för användning som stärkelsråvara. Ansökan har bilagts med en övervakningsplan och en riskbedömning (ERA) enligt artikel 35 direktiv 2001/18/EG.

Solanum tuberosum L. (Prevalent) modifierades genom att en bit DNA fördes över till potatis. Denna bit DNA innehöll DNA av flera ursprung. Den funktion som dessa olika DNA förmedlar genom sin närvaro i potatis är grunden för riskbedömningen. Det överförda DNA:t har visats varit stabilt integrerat (studerat under 9 år).

Enligt ansökan och ERA fördes följande DNA över till potatis

En bakvänd kopia av GBSS genen (granule bound starch synthase), vilket lett till att amylopektinhalten ökat kraftigt i linje EH92-527-1 jämfört med omodifierad Prevalent. Amylos och amylopektin finns naturligt i Prevalent och i annan potatis. Endast förhållandet mellan naturligt förekommande amylopektin och amylos har förändrats.

En kopia av nptII. Sökanden har visat att genprodukten från nptII genen (enzymet APH(3')II) är aktivt i linje EH92-527-1.

En bit av bleomycingenen och regioner mellan de införda generna. Sökanden redovisar att DNA mellan gener inte rearrangerats under odling av linjen samt att DNA utanför T-DNA inte alls förts över. Dessutom redovisas att en del av en bleomycingen (ORF4) finns kopplad direkt efter nptII genen – men ”ur fas”.

Följande övriga karaktärer har beaktats i ERA

Kemisk sammansättning. Linje EH92-527-1 har följt under 9 år i olika fältförsök. Små men statistiskt säkerställda skillnader mellan Prevalent och EH92-527-1 knölar har identifierats. Detta gäller mängden av mono- och disackarider (högre i EH92-527-1), mängden C-vitamin (högre i EH92-527-1) samt mängden glykoalkaloider (mindre i EH92-527-1). Dessa tre karaktärer varierar normalt i olika stärkelsepotatislinjer.

Produktions och tillväxtegenskaper. Tester inom företaget så väl som de som gjorts i Statens frösörtnämnds regi visar att EH92-527-1 är oskiljbar från Prevalent samt uniform och stabil i tillväxtkaraktärer.

Konkurrensförmåga. Inga förändringar har observerats i EH92-527-1 jämfört med Prevalent. EH92-527-1 är fortsatt känslig för växtsjukdomar, insekter och frost. Möjligheten att knölar blir kvar efter skörd gör att övervakning av fält kommer bli nödvändigt. Ett förtydligande angående vilka egenskaper och under vilka förhållanden som konkurrensförmågan testats saknas dock.

Sökanden föreslår att det faktum att potatislinjen har ökad amylopektinhalt samt är kanamycinrestent inte bör föranleda någon extra åtgärd relativt omodifierad potatis annat än normal särhållning. Amylopektin i sig innebär heller ingen risk för människors hälsa eller miljö. Proteinet som medger kanamycinresistens har tidigare visats vara ofarligt ur allergi och toxikologisk synvinkel. Det föreligger ej kända risker för människors och djurs hälsa eller för miljön med användandet av nptII som en markörgan inom växtförädlingen. Detta överensstämmer med de slutsatser som har dragits av WHO (1993), FDA (1998), Nordiska Ministerrådet (1997). Nordiska Ministerrådet har dessutom fört upp nptII genen på den s.k. positiva listan för acceptabla markörganer inom växtförädling för livsmedelsproduktion. Den sökande bedömer att den del av bleomycingenen som finns med i den genförändrade potatisen normalt inte skall kunna avläsas till fungerande enzym (eftersom genen inte är komplett) men föreslår att avsaknad av bleomycinenzym fortsättningsvis skall säkerställas efter en kommersiell introduktion. Det faktum att potatislinjens kemiska sammansättning avviker endast marginellt från omodifierad Prevalent bör inte föranleda någon extra åtgärd relativt normal odling av stärkelsepotatis. Det faktum att EH92-527-1 är oskiljbar från Prevalent samt uniform och stabil i tillväxtkaraktärer innebär att EH92-527-1 inte kan antas vara vare sig mindre eller mer stabil som linje än normal stärkelsepotatis. I det fall mutation skulle uppstå så skulle spridningsproblematiken inte vara större eller mindre för Prevalent än för annan omodifierad stärkelsepotatis. Övervakningsplanen är omfattande och föreslås sträcka sig över 5 år. Planen omfattar (a) en sammanfattning av ERA, (b) en strategi, (c) en metoddel och sist (d) en plan för analys och sammanställning av inhämtad information.

Gentekniknämndens konstaterar att APH(3')II enzymet åstadkommer resistens mot kanamycin och neomycin och vissa andra aminoglykosider (butirosin m fl.). Inget av dessa preparat används numera inom humanmedicin. Produkten av genen nptII har ingen aktivitet mot de aminoglykosider som används för närvarande (gentamicin, tobramycin och netilmicin). I Sverige används inte kanamycin eller neomycin som läkemedel p.g.a. deras humantoxiska egenskaper. I Sverige utsätts inte bakterier som är kanamycin- eller neomycinresistenta för annat kanamycin än det som förekommer i naturen. Skulle vi i framtiden börja använda kanamycin eller neomycin som läkemedel eller i djurfoder så skulle

antalet kanamycin-/neomycinresistenta bakterier komma att öka via tillväxt av redan förekommande naturligt resistenta bakterier och eventuell horisontell överföring från andra bakterier. Ett bidrag från genmodifierade växter i föda och foder som innehåller nptII genen får - i den mån det överhuvud taget förekommer genöverföring från växter till tarmbakterier - förväntas vara ytterst marginellt (*se*: Gentekniknämndens policy angående antibiotika-resistensgener i växtmaterial, bilaga 2). Ytterligare kommentarer av teknisk natur ang. nptII genen återfinns i bilaga 3. Sökanden har vidare redovisat att bleomycinpeptid inte har kunnat spåras trots extensiv försöksodling och att uttryck av den ofullständiga genbiten är osannolik även om det inte helt kan uteslutas.

Gentekniknämnden finner att den sökandens slutsatser och förslag till åtgärder är rimliga. Mot bakgrund av detta, nämndens tidigare yttrande samt nämndens policy angående antibiotikaresistensgener i växtmaterial gör Gentekniknämnden – med beaktande av samliga omständigheter – den bedömningen att den aktuella potatisen bör kunna marknadsföras.

Beslut i detta ärende har efter föredragning av kanslichef G. Brunius fattats av ledamöterna G. Björne, P. Bergman, P. Bill, A. Eriksson, J. Jansson, A. Lundén, S. Lundin, L. Nilsson Hedström (skiljaktlig), S. G. Persson (skiljaktlig), N. Uddenberg, G. Wahlén (skiljaktlig), B. Wahren samt tjänstgörande ersättaren L. Kollmats.

Reservation avgiven i enlighet med bilaga 4.

För Gentekniknämnden

Gunnar Björne
Ordförande

Gustaf Brunius
Kanslichef

Gentekniknämndens policy angående antibiotikaresistensgener i växtmaterial

Gentekniknämndens policy

Gentekniknämnden har den principiella uppfattningen att markörgener som åstadkommer resistens mot antibiotika som används som läkemedel inte ska tillåtas i genmodifierade växter som ska släppas ut på marknaden. Detta gäller även om riskerna för överföring till bakterier är ytterst små. Det innebär att nämnden kommer att inta en mycket restriktiv hållning till ansökningar avseende fältförsök med växter som innehåller resistensgener mot antibiotika som används som läkemedel inom human- och/eller veterinärmedicin. Markörgener (i växter) som medför resistens mot antibiotika som inte används som läkemedel och ej har visats vara toxiska eller allergena är enligt nämndens mening godtagbara under en övergångsperiod. EU-kommissionen har tillsatt en expertgrupp som skall ge förslag på vilka antibiotikaresistensmarkörgener som ej bör användas i genmodifierade växter som ska släppas ut på marknaden eller användas i fältförsök. Nämnden förutsätter att växtförädlingsföretagen utvecklar metoder som gör det möjligt att ta bort markörgenerna från de förädlade växtsortimenten bland annat för att underlätta en fortsatt förädling av produkterna.

Bakgrund

Introduktion, några definitioner

Antibiotika. Ämnen som dödar celler eller hämmar celltillväxt. Sådana ämnen isolerades ursprungligen från mikroorganismer, oftast från jordmikroorganismer. Idag tillverkas många syntetiskt. Resistens mot ett visst antibiotikum kan orsakas av olika faktorer, t.ex att cellen har ytegenskaper som gör att detta antibiotikum inte tas upp, att målproteinet i cellen har sådana egenskaper att ett antibiotikum inte tas upp, att målproteinet i cellen har sådana egenskaper att ett antibiotikum inte kan binda till det och inaktivera det, att cellen pumpar ut antibiotikum eller att cellen bryter ner aktuellt antibiotikum till ett icke toxiskt ämne. Huruvida antibiotika kan användas som läkemedel beror på hur toxiska de är för människan jämfört med den sjukdomsorsakande bakterien.

Markörgener i växtförädlingen. Med de nya teknikerna kan man idag överföra enstaka gener från olika organismer in i växtceller, s.k.målgener. För att kunna identifiera och isolera en cell som har tagit upp en målgen kopplas denna till en s.k. markör-gen. Som markörgener används ofta gener som åstadkommer resistens mot antibiotika eller ogräsmedel (s.k. herbicider) eftersom man då kan tillsätta kemikalien till tillväxtmediet varvid endast de celler som har tagit upp generna kommer att växa upp till plantor.

Horisontell genöverföring. Detta är ett naturligt förekommande fenomen som innebär att gener under vissa förutsättningar förflyttas mellan olika arter av organismer såsom bakterier, svampar, och växter.

Hur stor är risken för horisontell genöverföring från växter till bakterier?

Genöverföring från bakterier till växtceller. I naturen finns exempel system där en bakterie, *Agrobacterium tumefaciens*, överför gener till växtceller i vilka generna sedan integreras i växtens kromosomer. Det är denna metod som oftast används inom växtförädlingen för att föra målgenerna och markörgenerna in i växtcellens kromosomer.

Genöverföring mellan bakterier. Det finns ett flertal mekanismer i naturen som förmedlar horisontell genöverföring till bakterier (konjugation, transduktion och transformation). Vanligast är horisontell genöverföring mellan bakterier via konjugation och transduktion. Horisontell genöverföring mellan bakterier via konjugation och via bakterievirus s.k. bakteriofager (transduktion) är vanlig, men eftersom bakterier under vissa förutsättningar kan ta upp fritt DNA (transformation) kan överföring från avlägset besläktade arter ske.

Genöverföring från växter till bakterier

För att fritt DNA från växter med dessa gener ska kunna tas upp av en bakterie och komma till uttryck i bakterien måste följande krav uppfyllas:

1. Genen måste vara intakt. DNA bryts normalt ned i naturen av DNA-nedbrytande organismer och i mag-tarmkanalen med hjälp av. surt pH och DNA-nedbrytande enzymer.
2. DNA-fragmenten måste stå emot bakteriens försvar mot inkommande DNA. Bakterier tillverkar speciella enzymer som bryter ned inkommande DNA.
3. Genen måste ha viss likhet (homologi) med bakteriegenomet för att genen ska kunna integreras i bakteriekromosomen via rekombination.
4. För att en integrerad gen ska kunna uttryckas måste den ha hamnat så att de rätta signalerna för genavläsning (s.k.transkription och translation) blir kopplade till genen.

Slutsats: Sannolikheten att en genöverföring kan ske från en växt till en bakterie finns, men är ytterst liten.

Vad blir konsekvensen av en eventuell genöverföring?

Vi kan konstatera att under flera miljarder år har med mycket låg frekvens gener eller bitar av gener flyttats mellan organismer, bland annat mellan växter och bakterier. För att genöverföringar skall få någon bestående effekt måste genen i fråga bidra till bakteriens överlevnadsförmåga. Under evolutionens gång gör bakterier sig av med onödigt genmaterial eftersom det "kostar" att uttrycka gener som kodar för ämnen (*t.ex.* proteiner) som det inte finns användning för. Följaktligen finner man inte heller gener eller delar av gener från växter eller djur som verkar ha överförts horisontellt till tarmbakterien *E.coli*, vars hela kromosom idag är sekvensbestämd. Om en gen som ger resistens mot ett antibiotikum förts över till en bakterie som en fungerande enhet (se ovan) kommer konsekvensen bli att bakterien i fråga kan överleva och dela sig i närvaro av aktuellt antibiotikum.

Vid riskbedömningen av en sådan händelse i mag-tarmkanalen måste man således väga in:

- 1) används aktuellt antibiotikum i medicinskt syfte ?

2) Återfinns resistens mot detta antibiotikum normalt bland jord/tarm bakterier ?

3) Den vanligaste orsaken till resistens mot antibiotika är den breda användningen av antibiotika inom humanmedicinen och veterinärmedicinen.

Är *nptII* genen som åstadkommer kanamycinresistens en bra markör?

Resistensgenens ursprung och förekomst. Inom växtförädlingen används genen *nptII* (eller *aph(3')Iia* - som den också benämns) som en markör. Denna gen är allmänt förekommande i ett stort antal vanliga resistensplasmider hos gramnegativa bakterier (t ex. hos tarmbakterien *E. coli*). I jord som inte har utsatts för selektivt tryck av kanamycin, är ändå 1 bakterie av 1000 naturligt resistent (Smalla et al, 1997). I USA har man visat att 15-20 % av proverna på tarmbakterier från friska och sjuka personer innehöll kanamycinresistenta bakterier (Levy et al., 1988).

Toxicitet. Det protein som *nptII* genen kodar för (neomycin phosphotransferas II) har noga analyserats och befunnits vara varken toxiskt eller allergent (WHO, 1993).

Egenskaper och korsresistens. *NptII* genen åstadkommer resistens mot kanamycin och neomycin och vissa andra aminoglykosider (butirosin m fl.). Inget av dessa preparat används numera som medicin. Produkten av genen *nptII* har ingen aktivitet mot de aminoglykosider som används för närvarande (gentamicin, tobramycin och netilmicin). En viss aktivitet mot amikacin finns beskriven, men den aktiviteten har inte visats vara kliniskt betydelsefull.

Kanamycin och neomycin som läkemedel. I Sverige används inte kanamycin eller neomycin som läkemedel p.g.a. deras toxiska egenskaper. I Sverige utsätts inte bakterier som är kanamycin- eller neomycinresistenta för annat kanamycin än det som förekommer i naturen. I Sverige ges för närvarande inte en selektiv fördel för bakterier som är kanamycin- eller neomycinresistenta. Skulle vi i framtiden börja använda kanamycin eller neomycin som läkemedel, eller i djurfoder i preventivt syfte, skulle antalet kanamycin-/neomycinresistenta bakterier komma att öka via tillväxt av redan resistent bakterier och horisontell överföring från andra bakterier. Ett bidrag från genmodifierade växter i vår föda som innehåller *nptII* genen får - i den mån det överhuvud taget förekommer genöverföring från växter till tarmbakterier – förväntas vara ytterst marginellt.

Slutsatser och framtida utveckling

1. Det föreligger ej synbarliga risker för människors och djurs hälsa eller för miljön med användandet av *nptII* som en markör inom växtförädlingen. Detta överensstämmer med de slutsatser som har dragits av WHO (1993), FDA (1998), Nordiska Ministerrådet (Kärenlampi, 1997). Nordiska Ministerrådet har dessutom fört upp *nptII* genen på den s.k. positiva listan för acceptabla markörgener inom växtförädling för livsmedelsproduktion.

2. Markörgener som åstadkommer resistens mot antibiotika som används som läkemedel skall inte tillåtas i genmodifierade växter som ska släppas ut på marknaden i EU. Ett förslag på vilka antibiotikaresistensmarkörgener som ej bör användas i genmodifierade växter som ska släppas ut på marknaden eller användas i fältförsök skall presenteras av den tidigare nämnda expertgruppen som tillsatts av EU-kommissionen..

3. Tekniker utarbetas nu som framöver kommer att göra det möjligt att efter selektionsfasen (se Introduktion: Markörgener i växtförädlingen) ta bort selektionsmarkörerna. Nya selektionsmarkörer, som inte bygger på resistens mot antibiotika, tas även fram. På så sätt kan man undvika att de växter som odlas innehåller resistensgener mot olika antibiotika.

Litteratur

FDA, US Food and Drug Administration. Guide for Industry: Use of antibiotic resistance marker genes in transgenic plants. Draft Guidance Sept. 4 1998

Kruse & Jansson The use of antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified organisms. Rapport fra Statens forurensingstilsyn 1997 (SFT-report 97:03)

Kärenlampi, Nordiska Ministerrådets rapport, 1996

Levy et al., Antimicrob. Agents Chemother. 32(1988)1801

Smalla et al., The Norwegian Biotechnology Advisory Board, p. 43-57, 1997

WHO. Report of WHO Workshop Health aspects of marker genes in genetically modified plants, WHO, Geneva 1993

Uppdaterad den 17 september 2003

Notification C/SE/96/3501

Placing on the market of the amylopectin potato clone EH92-527-1

Annex III update

Minor comments, mainly dealing with the nptII marker gene, are listed below.

1. It isn't clear if the nptII gene is only controlled by the Nos-promoter, or if it also able to be expressed in bacteria. Assuming that the nptII gene can only be expressed in plant tissue, the risk of expression of the nptII gene in prokaryotes, should transfer occur, would be expected to be negligible, unless the gene was recombined behind a functional prokaryotic promoter. (Page 13)
2. In countries, such as The Netherlands, where kanamycin is still used in veterinary practice, kanamycin can enter the environment via manure (Page 22). When kanamycin is present as a selection pressure, then perhaps the chances of spread of kanamycin resistance should be considered as of greater concern. The problem is therefore, the use and spread of the antibiotic. Whether the transgenic potato in this application could then contribute to increased spread of antibiotic resistance to kanamycin is questionable. This is also discussed on page 33. It is not clear what was shown by Nap et al. (1992) and Bergmans (1993) to be "nearly impossible". Was it the dissemination of the nptII gene to other potato cultivars through sexual reproduction?
3. Page 35, There are of course known mechanisms for transferring of kanamycin resistance to bacteria in the digestion track (transformation, etc), but the consequences should such a transfer occur would be minimal (see first point above).
4. The presence of kanamycin resistance is not risk-free (Page 36), but the risk is minimal.
5. Top of page 38, it is stated that the nptII gene was detected in stored potato pulp from non-modified potatoes and it was assumed that kanamycin resistant bacteria multiplied on the pulp material. This seems very questionable, in the absence of selection pressure for kanamycin resistance. Were bacteria that grew on kanamycin plates confirmed to contain the nptII gene. Kanamycin resistance can occur by a variety of other mechanisms in bacteria, that are not encoded by nptII. The nptII marker is a good selection marker for bacteria and plants because it is generally rare. Therefore, the question arises if the non-modified potatoes tested in that particular experiment might have been contaminated at some point. Has this experiment been repeated?
6. Similar to the statement above, the adequacy of the study on kanamycin resistant bacteria in soil may be questioned. The kanamycin concentration used was very low (25 µg/ml). Low counts were obtained the first day. The second day more colonies were observed. These may have been "satellite" colonies growing near the primary colonies in regions of the agar where the antibiotic had been broken down. This is a common effect observed in the laboratory. Soil bacteria transformed with a single copy of the nptII gene can be tolerant to much higher concentrations of kanamycin (e.g. 200 µg/ml, compared to 25µg/ml used in the present study). It would be of interest to screen for the presence of the nptII gene in soil, not just kanamycin resistance, to be relevant.

Reservation mot beslut angående utsläppande på marknaden av genetiskt modifierad stärkelsepotatis

Gentekniknämnden bör ej tillstyrka ansökan om utsläppande på marknaden av genetiskt modifierad stärkelsepotatis. Skälet för vårt ställningstagande är att vi anser att eventuella risker för djur och människa inte är tillräckligt klarlagda. Vi förordar att försiktighetsprincipen skall tillämpas i detta sammanhang. Vidare bör nya produkter innehållande antibiotikaresistensgener inte tillåtas i avvaktan på beslut om vilka antibiotikaresistensgener som bör vara utfasade för användning i enlighet med kraven i direktiv 2001/18/EEG. Gentekniknämnden har i flera tidigare yttranden uttalat kritik mot användningen av markörgener som ger antibiotikaresistens. Företaget har således haft möjlighet att avlägsna markörgenen vid tidigare steg i utvecklingsprocessen.

Lotta Nilsson Hedström
ledamot (mp)

Gunilla Wahlén
ledamot (v)

Sven Gunnar Persson
ledamot (kd)