

476

OPPDRAKSMELDING

Overvåking av genmodifiserte
planter og dyr

Kirsti Kvaløy



NINA • NIKU

NINA Norsk institutt for naturforskning

Overvåking av genmodifiserte planter og dyr

Kirsti Kvaløy

NINA•NIKUs publikasjoner

NINA•NIKU utgir følgende faste publikasjoner:

NINA Fagrapport

NIKU Fagrapport

Her publiseres resultater av NINAs og NIKUs eget forskningsarbeid, problemoversikter, kartlegging av kunnskapsnivået innen et emne, og litteraturstudier. Rapporter utgis også som et alternativ eller et supplement til internasjonal publisering, der tidsaspekt, materialets art, målgruppe m.m. gjør dette nødvendig.

Opplag: Normalt 300-500

NINA Oppdragsmelding

NIKU Oppdragsmelding

Dette er det minimum av rapportering som NINA og NIKU gir til oppdragsgiver etter fullført forsknings- eller utredningsprosjekt. I tillegg til de emner som dekkes av fagrapportene, vil oppdragsmeldingene også omfatte befariingsrapporter, seminar- og konferanseforedrag, årsrapporter fra overvåkningsprogrammer, o.a. Opplaget er begrenset. (Normalt 50-100)

NINA•NIKU Project Report

Serien presenterer resultater fra begge instituttenes prosjekter når resultatene må gjøres tilgjengelig på engelsk. Serien omfatter original egenforskning, litteraturstudier, analyser av spesielle problemer eller tema, etc. Opplaget varierer avhengig av behov og målgrupper.

Temahefter

Disse behandler spesielle tema og utarbeides etter behov bl.a. for å informere om viktige problemstillinger i samfunnet. Målgruppen er "almenheten" eller særskilte grupper, f.eks. landbruket, fylkesmennenes miljøvern-avdelinger, turist- og friluftlivskretser o.l. De gis derfor en mer populærfaglig form og med mer bruk av illustrasjoner enn ovennevnte publikasjoner.

Opplag: Varierer

Fakta-ark

Hensikten med disse er å gjøre de viktigste resultatene av NINA og NIKUs faglige virksomhet, og som er publisert andre steder, tilgjengelig for et større publikum (presse, ideelle organisasjoner, naturforvaltningen på ulike nivåer, politikere og interesserte enkeltpersoner).

Opplag: 1200-1800

I tillegg publiserer NINA og NIKU-ansatte sine forskningsresultater i internasjonale vitenskapelige journaler, gjennom populærfaglige tidsskrifter og aviser.

Kvaløy, K. 1997. Overvåking av genmodifiserte planter og dyr. - NINA Oppdragsmelding 476: 1-41.

Trondheim, april 1997

ISSN 0802-4103

ISBN 82-426-0805-9

Forvaltningsområde:
Naturovervåking
Environmental monitoring

Rettighetshaver ©:
Stiftelsen for naturforskning og kulturminneforskning
NINA•NIKU

Publikasjonen kan siteres fritt med kildeangivelse

Redaksjon:
Odd Terje Sandlund
NINA•NIKU, Trondheim

Design og layout:
Synnøve Varvik

Sats: NINA•NIKU

Kopiering: Norservice

Opplag: 150

Kontaktadresse:
NINA
Tungasletta 2
7005 Trondheim
Tel: 73 58 05 00
Fax: 73 91 54 33

Tilgjengelighet: Åpen

Prosjekt nr.: 16810 GMO-overvåking

Ansvarlig signatur:

Oppdragsgiver:

Direktoratet for naturforvaltning

Referat

Kvaløy, K. 1997. Overvåking av genmodifiserte planter og dyr. - NINA Oppdragsmelding 476: 1-41.

Denne utredningens mål er å identifisere og evaluere aktuelle overvåkingsmetoder som kan anvendes i forbindelse med genmodifiserte planter og dyr. Utredningen tar utgangspunkt i risikovurdering av tilsiktet og utilsiktet utslipp av organismer og hvilken innvirkning dette vil ha på miljøet som de slippes ut i.

Etter en generell innledning til temaet følger et kapittel om generelle metoder som kunne tenkes brukt i en overvåkingssammenheng. Det er valgt å dele kapittelet inn i økologiske, molekylærbiologiske og populasjonsgenetiske metoder.

Utredningen inneholder deretter et kapittel om genmodifiserte planter og et om dyr. Av disse kapitlene er kapittelet om genmodifiserte planter tillagt størst vekt fordi bruken av genmodifiserte planter globalt sett er mye mer utstrakt enn genmodifiserte dyr. I tillegg er litteraturomfanget i forbindelse med både genmodifiserte og introduserte planter mye større enn for dyr.

Økologiske effekter av utslipp av genmodifiserte planter er belyst i forhold til tre problemstillinger: 1) At transgene planter kan utvikles til ugress eller være invasionsdyktige i naturlige habitater, 2) at deres manipulerede gener vil kunne overføres via pollen til ville slektninger og at hybridavkommet blir mer ugressaktig eller mer invasionsdyktig og 3) at transgene planter vil kunne gi direkte skade på mennesker, husdyr eller andre naturlig forekommende organismer. For å belyse mulige effekter ved utsetting av genmodifiserte planter, er raps (*Brassica napus*) brukt som eksempel.

Overvåking av utsatte genmodifiserte dyr vil bli sterkt influert av hvilke type dyr det er snakk om. Det er antatt at den største risikoen for ukontrollert spredning og etablering av genmodifiserte dyr i naturene vil være knyttet til fisk, insekter og andre invertebrater eller små pattedyr. Vurdering av mulige risikoer ved utsetting av genmodifisert fisk og insekt er vektlagt her.

Overvåking av en genmodifisert organisme omfatter en nøye planlagt overvåkingsstrategi med bakgrunn i kunnskap om den utsatte organismen og miljøet den settes ut i. En slik prosess må være fleksibel for å kunne fange opp uforutsette endringer i miljø, i den transgene organismen eller ved interaksjonen mellom dem. Problemet er at slike uforutsette hendelser ikke kan systematisk overvåkes før de blir oppdaget. Dette er trolig den viktigste årsaken til å innta en føre-var-holdning i forhold til utsetting av GMOer.

Emneord: Genmodifiserte planter og dyr - utsetting - økologiske effekter - spredning - etablering - overvåkingsstrategi - overvåkingsmetoder - overvåking

Kirsti Kvaløy, Norsk institutt for naturforskning, Tungasletta 2, 7005 Trondheim.

Abstract

Kvaløy, K. 1997. Monitoring genetically modified plants and animals. - NINA Oppdragsmelding 476: 1-41.

The aim of this report is to identify and evaluate potential methods for monitoring genetically modified plants and animals. The report is based on risk assessments of intended and unintended release of organisms and what consequences this may have on the environment into which they are released.

The general introduction to the issue is followed by a chapter on possible methods appropriate in relation to a monitoring strategy. The chapter is divided into three parts comprising methods applied in ecology, molecular biology and population genetics.

The report contains one chapter on genetically modified plants and one on genetically modified animals. Main focus is put on plants because the use of genetically modified plants globally far extends the use of genetically modified animals. Furthermore, the access of literature both concerning genetically modified plants and on plant introductions makes this topic more approachable.

Ecological effects of the release of genetically modified plants focus on three topics: 1) That transgenic crop plants will become weeds of agriculture or invasive of natural habitats, 2) that their engineered genes will be transferred by pollen to wild relatives whose offspring will then become more weedy or more invasive or 3) that the engineered plants will be a direct hazard to humans, domestic animals or beneficial wild organisms. Illustration of possible effects of the release of genetically modified plants is done here through the evaluation of transgenic oilseed rape (*Brassica napus*).

Monitoring of released transgenic animals will be strongly influenced by what animal is released. The greatest risk of uncontrolled spread and establishment of genetically modified animals in nature is assumed to be associated with fish, insects, other invertebrates or small mammals. Here, the possible risks of releasing transgenic fish and insects are emphasised.

Monitoring transgenic organisms involves a thoroughly planned monitoring strategy based on knowledge of the released organism and the environment to which it will be released. Such a process must include the potential flexibility to intercept unforeseen changes within the environment, the transgenic organism or the interaction between the two. The problem is that such unforeseen incidences cannot systematically be monitored before they are discovered. This is probably the strongest reason to apply the precautionary principle when the release of genetically modified organisms is concerned.

Key words: Genetically modified plants and animals - release - ecological effects - spread - establishment - monitoring strategy - monitoring methods - monitoring

Kirsti Kvaløy, Norwegian Institute for Nature Research, Tungasletta 2, N-7005 Trondheim, Norway.

Forord

Denne utredningen er laget på oppdrag fra Direktoratet for naturforvaltning (DN-kontrakt nr. 691 04/95) som ledd i forvaltningens behov for kompetanse rundt overvåking av potensielle økologiske effekter ved utsetting av genmodifiserte organismer.

I prosjektet som tar for seg å identifisere og evaluere aktuelle overvåkingsmetoder som kan anvendes i forbindelse med utsetting av genmodifiserte planter og dyr, har Bjørn Åge Tømmerås ved NINA vært prosjektleder. Jeg vil gjerne takke Bjørn Åge Tømmerås, Kjetil Hindar, Jan Husby, Per Arild Aarrestad, Frøydis Kvaløy og Jarle Tufto for nyttige kommentarer og diskusjoner under arbeidet.

Trondheim, april 1997

Kirsti Kvaløy

Innhold

| | |
|--|-----------|
| Referat..... | 3 |
| Abstract | 4 |
| Forord | 5 |
| 1 Innledning | 6 |
| 1.1 Dannelse, bruk og risikovurdering av genmodifiserte organismer (GMO) | 6 |
| 1.2 Overvåking av GMO | 7 |
| 2 Metoder for overvåking av GMO | 9 |
| 2.1 Økologiske metoder..... | 9 |
| 2.2 Molekylærbiologiske metoder..... | 12 |
| 2.3 Populasjonsgenetiske metoder | 14 |
| 2.4 Overvåking av innsatt genetisk materiale og genprodukter | 16 |
| 3 Overvåking av genmodifiserte planter (GMP)..... | 17 |
| 3.1 Genmodifisering av planter..... | 17 |
| 3.2 Mulige økologiske effekter av GMP..... | 18 |
| 3.3 Overvåkingsstrategi for GMP | 20 |
| 3.4 Overvåkingsmetoder for GMP | 21 |
| 3.5 Eksempel på overvåking av en GMP med raps som utgangspunkt | 24 |
| 4 Overvåking av genmodifiserte dyr | 28 |
| 4.1 Genmodifisering av dyr..... | 28 |
| 4.2 Overvåkingsstrategi for genmodifiserte dyr | 29 |
| 4.3 Overvåking av genmodifisert fisk | 29 |
| 4.4 Overvåking av genmodifiserte insekter | 31 |
| 5 Økonomi..... | 33 |
| 6 Konklusjoner | 34 |
| 7 Ordforklaringer | 35 |
| 8 Litteratur..... | 37 |

1 Innledning

Organismer det blir aktuelt å genmodifisere spenner over et bredt felt fra virus, bakterier og enkle eukaryoter til multi-cellulære planter og dyr som både innbefatter kultiverte og ville arter. Ekspertisen som er nødvendig for evaluering av fordeler og risikoer ved slike genmodifiseringer involverer mange forskningsfelt fra molekylærbiologi, genetik, cellebiologi, evolusjonsbiologi, fysiologi, populasjons- og adferdsbiologi og systemøkologi. Risikovurdering ved tilsiktet og utilsiktet utslipp av genmodifiserte organismer (GMOer) omfatter en rekke potensielle temaer; Overlevelse og reproduksjonsevne til den transgene organismen, dennes interaksjon med andre organismer, potensiell spredning utover introduksjonsstedet og organismens effekt på det fysiske miljø. Derfor er kunnskap om biologien til både foreldreorganismen og gendonoren, og karakteristikk av miljøet hvor introduksjonen er tilsiktet eller kan skje ved uhell, en nødvendighet for evaluering av potensielle effekter av en introduksjon.

De fleste utsetninger av GMOer i industrialiserte land i dag må igjennom en risikovurdering foretatt av nasjonale og institusjonelle komiteer og ekspertpanel. Med risikovurdering menes: «Prosessene for å oppnå kvantitative og kvalitative målinger av risikonivåer, hvor «risiko» er potensielle, eller sannsynligheten for en skadelig hendelse» (oversatt fra Kjellson og Simonsen, 1994). Det er gjennom denne risikovurderingen at en overvåkingsstrategi baseres. Overvåkingen skal kunne dekke spredning og etablering av genmodifiserte planter og dyr og deres gener (hybridisering og introgresjon med ville slektninger) i miljøet, samt mulige miljøeffekter. At alle mulige risikoer blir inkludert i et overvåkingsprogram forutsetter imidlertid at de aktuelle risikoer er kjent. Det faktum at kunnskapen om økosystemet fortsatt er liten og at naturlige økosystem er komplekse interaktive miljøer i konstant forandring, medfører at det kan være vanskelig å forutse eventuelle konsekvenser av en utsetting og dermed å bestemme omfanget av en overvåking.

Denne utredningens mål er å identifisere og evaluere aktuelle overvåkingsmetoder som kan anvendes i forbindelse med utsetting av genmodifiserte planter og dyr. Utredningen er delt inn i syv deler. Del 1 tar for seg generelle prinsipper rundt overvåking av GMO. Del 2 tar for seg overvåkingsmetoder for GMO generelt. Del 3 inneholder informasjon om genmodifisering av planter og overvåking av disse hvor genmodifisert raps er vurdert m.h.p. mulige effekter ved utsetting. Del 4 omhandler genmodifiserte dyr med spesiell vektlegging av genmodifiserte fisk og insekter. Del 6 inneholder en kortfattet vurdering av økonomiske kostnader ved en overvåking. Utredningen avsluttes med en kort konklusjon.

1.1 Dannelse, bruk og risikovurdering av genmodifiserte organismer (GMO)

Organismers genetiske sammensetning kan i dag endres i mer utstrakt grad enn før på grunn av økt kunnskap om molekylærgenetiske metoder. Tidligere da kunnskapen omkring disse metodene ikke var så stor som i dag, ble mikroorganismer hyppigst brukt til genetisk manipulering og det eksperimentelle arbeidet ved endring av den genetiske sammensetningen ble utført i laboratorier og i industrielle sammenhenger, dvs. ved innesluttet bruk. (Innesluttet bruk er definert ved Genteknologiloven (Lov nr. 38) som «enhver arbeidsoperasjon hvor genmodifiserte organismer blir framstilt, dyrket, lagret, destruert eller brukt på annen måte, i et lukket system hvor det anvendes fysiske barrierer, eller fysiske barrierer sammen med kjemiske eller biologiske barrierer, for å begrense organismens kontakt med mennesker og miljø»). Senere har GMOer med utgangspunkt i de fleste organismegrupper vært gjenstand for genetisk manipulering. Dette har økt omfanget av GMOer med bruksmåte ute i naturen med det resultat at et mer omfattende overvåkingssystem er nødvendig for å karakterisere GMOens eventuelle spredning og etablering, samt dennes eventuelle interaksjon med omkringliggende miljø.

Hva er en GMO? Ifølge Genteknologiloven er definisjonen av en GMO: «genmodifisert organisme: mikroorganisme, plante og dyr hvor den genetiske sammensetning er endret ved bruk av gen- eller celleteknologi. (genteknologi: teknikk-er som innebærer at arvestoffet isoleres, karakteriseres, modifiseres og innsettes i levende celler eller virus; celleteknologi: teknikker for framstilling av levende celler med nye kombinasjoner av genetisk materiale ved fusjon av to eller flere celler)». Disse teknikkene omfatter ulike måter å skape nye kombinasjoner av genetisk materiale på som ikke kan oppnås ved tradisjonell avl eller ved andre «naturlige» metoder. Metodene inkluderer bruken av rekombinant DNA-teknologi og kunstige cellefusjoner eller hybridiseringer, inkludert protoplastfusjon (til dels begrenset til planter). En transgen organisme eller en GMO er en som bærer det introduserte rekombinante DNAet i sitt eget genom.

Det er uenighet om organismer dannet ved såkalte konvensjonelle avlsmetoder og de dannet ved teknikker benyttet i molekylær genetik, er sammenliknbare. Til forskjell fra organismer framstilt ved konvensjonelle avlsmetoder, kan en i transgene organismer få dannet enkelte genkombinasjoner, enten tilsiktet eller utilsiktet, som ikke kan framstilles ved naturlige reproduksjonsprosesser. Transgene organismer vil imidlertid utsettes for evolusjonskrefter på samme måte som naturlige organismer. Kan vi derfor ta utgangspunkt i det vi vet om adaptasjon og evolusjon hos naturlige arter ved analyse av en transgen organismes skjebne i naturen? I dette meget omdiskuterte temaet ser det ut til at de fleste er enige om at det er selve fenotypen og ikke hvordan organismen ble laget som er det viktige ved en

risikovurdering (Tiedje et al. 1989, Tømmerås et al. 1996). En bedømmelse av en transgen organismes atferdsmønster må ta utgangspunkt i hvilken virkning modifikasjonen i hvert enkelt tilfelle har på fenotypen til den transgene organismen, dvs. ved sammenlikning av den transgene organismen og den ikke-modifiserte foreldreorganismen. Den transgene organismen kan i enkelte tilfeller få tilført enkeltgener som i utgangspunktet ikke vil gi organismen fortrinn sammenliknet med foreldreorganismen i naturlige sammenhenger. GMOen kan i så måte vurderes på bakgrunn av kunnskap om foreldreorganismen og blir som om en ny stamme eller sort skulle introduseres (Woodward et al. 1994). Andre modifikasjoner vil være så omfattende at det ville være naturlig å trekke analogier til introduksjon av en eksotisk art (Drake et al. 1989). Etter en introduksjon av en fremmed organisme i et habitat, bør skjebnen til denne organismen og eventuell spredning av dennes gener i populasjoner av samme eller beslektede arter vurderes nøye. I alle risikovurderinger må utgangspunktet være å estimere betingelser og tiden det tar for etablering eller tap av en fremmed organisme i et naturlig habitat, samt eventuell spredning av modifiserte gener i en naturlig populasjon. Nye gener, og derved nye egenskaper introdusert i en populasjon kan gjøre at populasjonene endrer «fitness», hvilket igjen kan forandre dennes konkurransedyktighet. Spredning av gener kan på denne måten ha konsekvenser for hele økosystemer, og det er derfor viktig å ha en nøye planlagt overvåkingsstrategi. Denne overvåkingsstrategien må bygge på konsekvensutredning som allerede er gjennomført for den aktuelle GMO slik at det foreligger en oversikt over hvilke problemer man ønsker å få belyst ved en overvåking.

Ved dagens mest brukte teknikker for å integrere fremmed DNA i dyr og planter foregår integrasjonen ved «illegitim rekombinasjon», hvilket resulterer i at integreringen skjer på et tilfeldig sted i genomet. Kopitallet på det integrerte DNAet er ved disse metodene vanskelig å kontrollere slik at det innsatte genetiske materiale kan være overrepresentert. I tillegg kan den uspesifikke integrasjonen påvirke genene som eventuelt befinner seg ved integrasjonsstedet ved såkalte pleiotrope eller synergi effekter. Stabiliteten til transgenet påvirkes av både rekombinasjon og mutagene effekter som kan skape deleasjoner, rearrangementer eller sekvensmodifikasjoner. Dette kan resultere i at aktiviteten av det innsatte DNAet endres over tid. Til sammen gjør disse usikkerhetsmomentene at det er viktig å observere eventuelle genetiske og fenotypiske forandringer i den transgene organismen / populasjonen over tid.

Horisontal (lateral) genoverføring er definert som ikke-seksuell overføring av genetisk informasjon mellom genomer (Kidwell, 1993). Muligheten for at genetisk informasjon kan bevege seg mellom ikke beslektede arter er en idé som sterkt har blitt motarbeidet i tradisjonelle biologiske miljø. Dokumentasjon på molekylærgenetisk nivå har imidlertid bevist at overføring kan skje på tvers av artsbarrierer. I det senere har mulighetene for overføring av DNA fra genmodifiserte planter til plante-assosierte mikroorganismer vært gjenstand for diskusjon i forbindelse med potensiell risiko ved utsetting av genmodifiserte planter. Til nå har

svært få studier vært utført for å belyse forholdene eksperimentelt og i de få som har vært foretatt, har ofte enkle oppsett med få organismer vært utgangspunktet. I flere dokumenterte tilfeller er det påvist plante-DNA i jorda selv etter ett år, men ifølge Schlüter og kollegaer (1995) er det bare dokumentert ett tilfelle av mulig horisontal genoverføring fra en transgen *Brassica*-plante til soppen *Aspergillus niger* (Hoffman et al. 1994). Er det så grunn til bekymring? Hvis en tar i betraktning at bare 1-5 % av alle antatte bakteriearter er «studerbare» med de metoder som eksisterer i dag (Goksøyr & Sørheim, 1991), og at de fleste forsøk hvor en har prøvd å påvise potensiell overføring bare har tatt for seg noen få mikroorganismer, er det for tidlig å uttale seg for skråsikkert.

I denne utredningen er det ikke i detalj gått inn på overvåkingsmetoder for overføring av transgent materiale fra planter eller dyr til mikroorganismer i miljøet, fordi problemstillingen da ville blitt for omfattende. Rammene for en slik overvåking ville i tillegg bli usikre med bakgrunn i manglende kunnskap om blant annet generell mikrobiell økologi og deteksjonsmetoder for påvisning av spesifikke mikroorganismer og deres gener. Imidlertid er det økt interesse for temaet og relevant kunnskap antas å øke raskt i nær framtid.

1.2 Overvåking av GMO

Overvåking er å observere eller følge med på en eller flere hendelser som er forventet, eller ikke forventet, å inntreffe. Overvåking relatert til GMOer kan skje på forskjellige nivåer fra langsiktige natur- eller miljøovervåkinger, ved mer kort-siktig overvåking av miljøeffekter direkte relatert til forsøksutsettingen til overvåking knyttet til GMOens nye egenskaper og som utsatt. Tendensene rundt vurdering av GMOer går i retning av oppbygging av generelle protokoller som kan gjøre vurderingsprosessen enklere. Vurdering ved hjelp av «flyt»-diagrammer er et typisk eksempel på en slik forenkling.

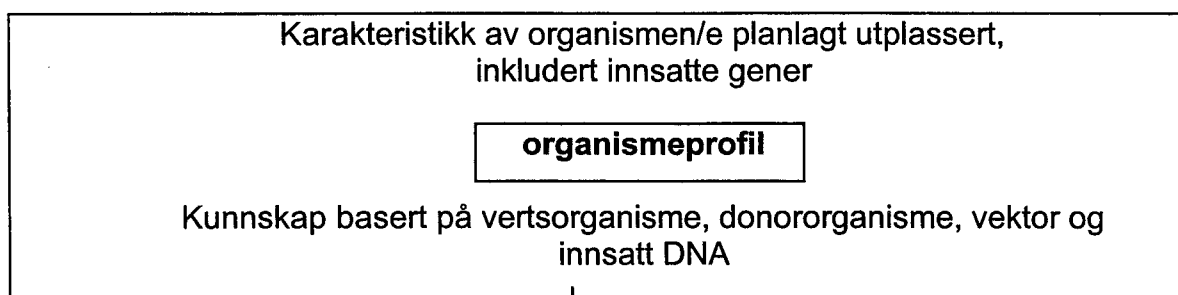
Overvåking kan detektere miljøpåvirkning som kan være fordelaktig, nøytral eller skadelig. Om overvåking vil være av nytte for vurdering av miljøpåvirkning eller for vurdering av risiko, vil avhenge av informasjon som allerede eksisterer rundt GMOen og miljøet den settes ut i. Den eventuelle innvirkningen GMOer har på miljøet er en konsekvens av tilsiktede og utilsiktede effekter hvor de tilsiktede effektene bestemmes ved den planlagte bruken av organismen. Disse relativt forutsigbare effektene er skissert i stadium 1 i figur 1. Uforutsigbare miljøpåvirkninger kan imidlertid også oppstå, men siden disse innvirkningene ikke er forutsett, kan de ikke bli systematisk overvåket før de er oppdaget. Dette er trolig det viktigste argumentet for en føre-var-holdning.

I løpet av de siste års erfaring og diskusjoner har prinsipper for risikovurdering og overvåkingsstrategier relatert til GMOer blitt utviklet. De kan summeres i følgende tre punkter (Kjellson og Simonsen, 1994):

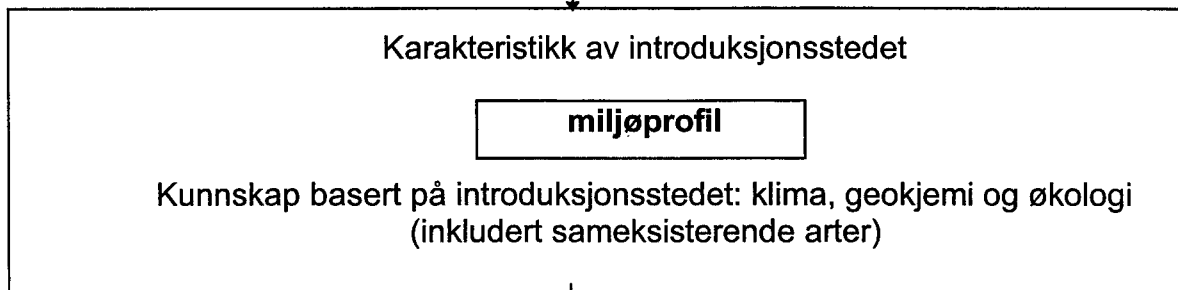
- 1 **Sak-for-sak** prosedyre, hvor hver sak relatert til transgen modifisering blir testet og vurdert separat. Dette prinsippet er fremdeles gjeldende i EU-land, men trenden synes å gå mot forenklet generalisering med bakgrunn i økt erfaring spesielt når det gjelder planter.
- 2 **Ved sak-for-sak** prosedyren, utføres testing og overvåking på forskjellige stadier i en såkalt **trinn-for-trinn** prosess fra innesluttete eksperimenter i laboratorier og drivhus, via **småskala** avgrensede feltforsøk, til **storskala** utsetninger og til slutt en mulig kommersiell utsetting. På hvert stadium blir mulige skadelige effekter på miljøet vurdert før neste stadium blir påbegynt. Hvis bestemte krav ikke blir tilfredsstillt, kan prosedyren stanses på et hvilket som helst stadium.
- 3 En profilbestemmelse, som kan innbefatte: en **organismeprofil** med karakteristikk av den genmodifiserte organismen, inkludert innsatte gener; en **miljøprofil** bestående av klimatiske, geologiske og økologiske data fra utsettingsstedet; og en **introduksjonsprofil** med prosedyrene for den eksperimentelle utføringen (Morgenroth, 1991; figur 1).

Det ideelle er at hvert av trinnene i figuren nøye blir gjennomarbeidet og at det på hvert trinn foretas en vurdering som bestemmer det videre forløpet av overvåkingen. I praksis blir imidlertid miljøprofilen i stadium 2, og spesielt økologidelen som behandles i stadium 3 i alt for liten grad undersøkt.

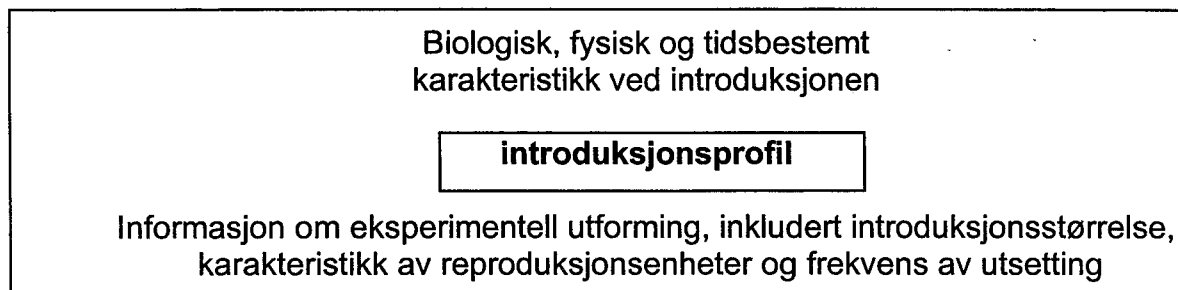
STADIUM 1



STADIUM 2



STADIUM 3



Figur 1. Profilbestemmelse (modifisert fra OECD, 1992a) Data oppnådd på stadium 1 kan inkluderes ved evaluering av alle komponentene som berører de ulike profilene og kan brukes til å konstruere et «stor»-skala overvåkningsprogram for stadium 2. Når en profil er analysert, vil en i teorien kunne forutse hvordan organismen potensielt vil oppføre seg ved et feltforsøk. Stadium 3 er utviklingsstadiet. Dette stadiet kan inneholde mer langvarig testing på flere steder, og skjer rett før kommersialisering av den introduserte organismen. Det vil ikke være noen klar overgang mellom de forskjellige stadiene, men avhengig av målet for en spesiell test, kan det i enkelte tilfeller være mulig å stå over enkelte trinn. Det bør legges vekt på dynamiske og fleksible interaksjoner mellom de ulike stadiene.

2 Metoder for overvåking av GMO

Overvåking av en GMO innebærer en prosess hvor målet er å følge effekter av en utsetting over tid ved bruk av kjente metoder. Et program med lange, uavbrutte dataserier med jevn frekvens fra bestemte områder, bør være rammen for et overvåkingssystem. Samtidig må en slik prosess være fleksibel hvis en ny, uforutsett situasjon skulle dukke opp. Et mål her vil være at en ved overvåkingen klarer å påvise effekter av en utsatt GMO så tidlig som mulig slik at rammene for overvåkingen eventuelt kan forandres undervegs. For at en slik påvisning skal være mulig, forutsettes det at en vet hvor, når og hvordan en må ta prøver. Ut ifra type GMO og kunnskapen som eksisterer rundt denne, vil målet være å kunne forutse hvilke parametre en er nødt til å undersøke. Her kan det antas at praktiske og økonomiske begrensninger i stor grad vil legge rammen rundt overvåkingen.

Overvåking av en GMO bør bygge på både økologiske, molekylærbiologiske og populasjonsgenetiske metoder. Metodevalget må i stor grad baseres på hvilken type GMO en har som utgangspunkt. Bestemmelse av hva en skal ta prøver av, hvor mange prøver som er nødvendig for å oppnå tilfredsstillende sannsynlighetsnivå for påvisning av endringer over tid og hvilke metoder en skal bruke for innsamling av materiale, bør bygge på økologisk metodologi. Selve den detaljerte analysen av innsamlet materiale må i stor grad foregå ved hjelp av molekylærbiologiske og populasjonsgenetiske metoder. Her kan generelle metoder for påvisning av genetisk materiale og genprodukt benyttes for alle typer GMO. Som regel vil det på forhånd foreligge god kunnskap om det innsatte genetiske materialet. Dette gjør at sannsynligheten for påvisning av eventuell spredning av GMOen eller transgener er stor idet det genetisk modifiserte DNAet selv kan egne seg som målsekvens for deteksjon ved genteknologiske teknikker. Dette betyr at hovedbegrensningene i en overvåkingsprosedyre i stor grad avhenger av følsomheten til prøvetakingsprosessen.

Økologer samler data for å teste framsatte hypoteser. Disse hypotesene er ofte like viktige som dataene. I mange økologiske studier stilles spørsmål relatert til populasjonsdynamikk; Hvor mange individer finnes i populasjonen? Endres dette antallet over tid? Hvilke faktorer har innflytelse på den observerte variasjonen? Dette er spørsmål som også er viktige ved overvåking av genmodifiserte organismer. Estimering av populasjonstetthet og populasjonsstørrelse spiller en sentral rolle i slike studier. Metodene som benyttes er ofte forskjellige for dyr og planter. Dette skyldes ofte at dyr er mobile, mens planter er mer begrenset i sin bevegelse.

Et sentralt spørsmål i overvåkingsprosedyren er hvor stort antall prøver en må ta for å oppnå at de innsamlede data i størst mulig grad representerer virkeligheten. Dette be-

regnes ved statistisk analyse som baseres på enkelte kjente faktorer og godkjente feilmarginer (se f.eks. Krebs, 1989). For estimering av populasjonsstørrelse ut ifra telling-er foretatt ved ruteanalyse (oftest benyttet for planter), må den statistiske fordelingen i populasjonen være kjent før antall prøver kan bestemmes. Estimering av populasjonsstørrelse og tetthet fra «fangst-merking-gjenfangst» metoden (ofte benyttet for dyr, Krebs, 1989) kan utføres til et spesifikt presisjonsnivå ved bruk av populasjonsmodeller.

Flere ulike typer prøvetakingsstrategier benyttes innenfor økologiske studier. Eksperimentell design er det første som bør vurderes før innsamling av data påbegynnes. Det første trinnet i prosessen er å definere den eksperimentelle enheten. Deretter følger bestemmelse av hvordan tilfeldig prøvetaking kan gjennomføres. Gjentatte uavhengige prøvetakinger, helst adskilt i tid og rom, er nødvendige for å estimere feilmargin og signifikans (Krebs, 1989). En av de beste verktøyene brukt innen økologisk forskning er å dele målpopulasjonen inn i mindre enheter eller strata for å kunne estimere størrelsen. I denne såkalte «stratifiserte prøvetakingen» deles den statistiske populasjonen bestående av N enheter inn i subpopulasjoner som ikke er overlappende og som til sammen omfatter hele populasjonen (Krebs, 1989), dvs.

$$N = N_1 + N_2 + N_3 + \dots + N_L$$

hvor L = Totalt antall subpopulasjoner

Organismesamfunn kan være mer eller mindre like hverandre. Sammenlikning av to samfunn kan være et aktuelt mål for potensiell forandring over tid, noe en ønsker å måle ved utsetting av en GMO. Likheter mellom to samfunn kan baseres på om individer er tilstede eller ikke, og/eller baseres på målinger av populasjonsstørrelse, biomasse, dekke eller produktivitet. Det finnes en rekke metoder som tar for seg slike målinger hvor noen legger størst vekt på sjeldne arter, mens andre på vanlige arter (se Krebs, 1989, eller annen generell litteratur om økologisk metode). Bestemmelse av hvilken type data som er best for videre analyse vurderes på bakgrunn av hvilke spørsmål som ønskes belyst.

Nedenfor følger et utvalg av ulike metoder som kan tenkes å egne seg ved overvåking av GMOer. Enkelte av metodene vil bli omtalt og henvist til under egne kapitler for planter og dyr. Det er her valgt en inndeling i økologiske, molekylærbiologiske og populasjonsgenetiske metoder.

2.1 Økologiske metoder

A. Morfologiske markører

Morfologiske markører brukes til å identifisere en spesifikk genotype ved direkte observasjon. Slike markører er hovedsakelig resultatet av at en eller flere gener er under potensiell innflytelse fra miljøet. Eksempel på morfologiske markører innbefatter: form, farge, mønster osv.

Ulempen med å bruke fenotypiske karakteristika er at bruken krever en synbar variasjon. Variasjoner i et enkelt gen er ofte ikke direkte synbar hvilket innebærer at det ofte er vanskelig å si hvor mye av variasjonen som er et resultat av genotype og hvor mye som skyldes miljø.

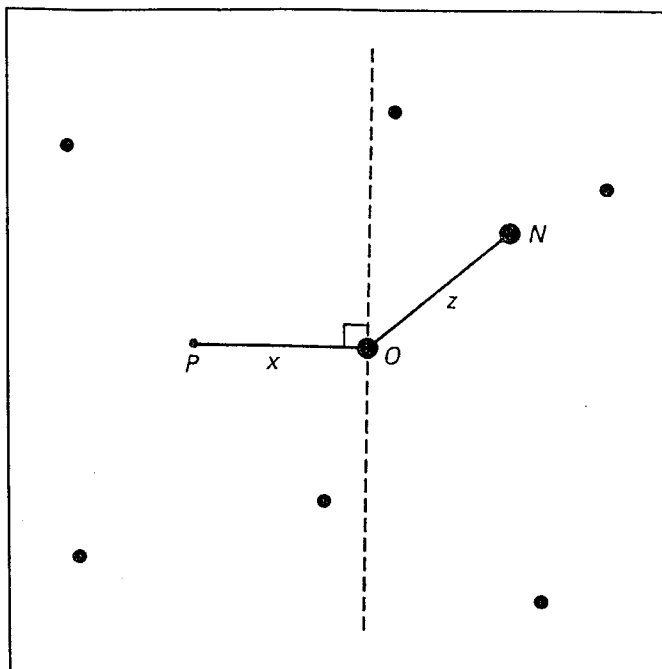
Ved hybridavkom framkommet av krysning mellom to arter, f.eks. mellom en GMP og en vill plante, kan en som Metz og kollegaer (1995) gjorde ved analyse av reddik-oljeraps hybrider; analysere farge og form på ulike plantedeler og sammenlikne disse morfologiske trekkene med de funnet i foreldreplanten.

B. Ruteanalyse (gjelder planter eller dyr med lav mobilitet)
 Demografiske prosesser i en stasjonær populasjon i felt studeres best ved bruk av permanente ruter. Disse rutene dannes i utsettingsområdet vanligvis som tilfeldige oppmålte ruter. Rutestørrelsen kan variere, men er i botaniske undersøkelser (og av jordbunnsfauna) normalt 50 x 50 cm (eller 50 x 100 cm). Det er fordelaktig å ha en buffersone (ca. 10-20 cm) rundt hver rute som er utsatt for samme betingelser som kvadratet selv. Dette vil redusere usikre målinger langs kanten av kvadratet. Individuer merkes, eller en kvadratramme kan brukes til å analysere posisjonen til ulike individer og vegetasjonsdekke innen kvadratet. Skjebnen til hvert enkelt individ kan så følges i flere år hvis nødvendig (dette gjelder flerårige planter).

Valg av størrelse på ruten avhenger av at informasjon om spredningsmønster foreligger. Det må også foretas foranstaltninger mot ødeleggelse av rutene av dyr eller menneskelig aktivitet. Metoden er en av de beste for å følge utviklingen til en nylig etablert eller introdusert populasjon i felt.

C. «Nærmest-nabo»-måling (gjelder planter eller dyr med lav mobilitet)
 Metoden brukes for å detektere og teste distribusjonsmønsteret til en organisme innen en populasjon i felt og kan gjennom beregning av populasjonstettheten brukes til overvåking av endringer i populasjonen over tid. Metoden er best egnet for organismer som har spredt fordelingsmønster, som f.eks. trær hvor det er arbeidskrevende å legge ut ruter og telle alle individer. Den generelle ideen er å plukke ut n individer tilfeldig og så måle distansen til nærmeste nabo (ved «nærmest-nabo»-målinger) eller å velge ut n tilfeldige punkt og så måle distansen til nærmeste individ av en gitt organisme (ved «punkt-til-objekt»-målinger). Hvis individene er tilfeldig plukket ut, vil tettheten i en populasjon kunne beregnes.

Ulempen ved metoden er at den ofte blir tendensiøs fordi dyr og planter sjelden er tilfeldig fordelt. Hvis individene er klumpvis fordelt, blir tettheten ved «nærmest-nabo»-måling overestimert, mens tettheten ved «punkt-til-objekt»-måling ofte underestimerer tettheten. Dette gjør at «T-square sampling» (illustrert i figur 2 og i påfølgende eksempel) som kombinerer begge målingene, egner seg ved behandling av data.



Figur 2. Figuren illustrerer «T-square» metoden (fra Sutherland, 1996). De svarte punktene representerer individer av arten som studeres. O er det nærmeste individet til et tilfeldig punkt P; N er O's nærmeste nabo på motsatt side av den stiplede linjen (som er perpendikulær på linjen OP). Prosedyre: Punktet P plukkes tilfeldig; Distansen (x) måles fra punktet til nærmeste individ av interesse (O); En rett linje legges ned rett vinkel på linjen mellom O og P; distansen (z) måles fra O til nærmeste individ (N) på motsatt side av linjen til P. Flere tilsvarende målinger gjøres - 10 er anbefalt minimum - hvor hver er basert på et tilfeldig punkt.

Eksempel

Japansk svart furu *Pinus thunbergii* innen en kjerne på 4 x 4 m rute, innen en 5.7 x 5.7 m rute (Numata 1961). Ti (= m) par målinger ble utført (x_i = «punkt-objekt» distanse, z_i = «nærmest-nabo»-distanse, alt i meter). Beregnet verdi i tredje kolonne brukes til å teste tilfeldighet i distribusjonen.

| x_i | z_i | $x_i^2/(x_i^2+z_i^2)/2$ |
|-------|-------|-------------------------|
| 0.1 | 0.3 | 0.1818 |
| 0.3 | 0.2 | 0.8182 |
| 0.1 | 0.4 | 0.1111 |
| 0.8 | 0.5 | 0.8366 |
| 0.3 | 0.1 | 0.9474 |
| 0.7 | 0.7 | 0.6667 |
| 0.6 | 0.7 | 0.5950 |
| 0.9 | 0.7 | 0.7678 |
| 0.7 | 0.3 | 0.9159 |
| 0.5 | 0.3 | 0.8475 |
| 5.0 | 4.2 | 6.6880 |

Estimering av tetthet:

$$D = m^2 / (2.828 \sum x_i \sum y_i) \\ = 10^2 / [2.828(5.0)(4.2)] = 1.68 \text{ trær} / m^2$$

Test av tilfeldig fordeling:

$$t' = \{ \sum [x_i^2 + z_i^2 / 2] - m / 2 \} \sqrt{(12 / m)} \\ = \{ 6.6880 - 10 / 2 \} \sqrt{12 / 10} = 1.85$$

Hvis t' er større enn +1.96, er fordelingen i signifikansen mer regelmessig enn en tilfeldig fordeling; hvis den er lavere enn -1.96, er den signifikant klumpvis. I begge tilfellene blir D tendensiøs.

Fordelen ved metoden er at den kan brukes til å vurdere ulike typer problemer i både småskala og storskala forsøk.

D. Vegetasjonsanalyse (brukes for planter, men kan bli aktuelt ved undersøkelse av et dyrs potensielle påvirkning på vegetasjon)

Vegetasjonsanalyse representerer en rekke metoder brukt i felt for å analysere vegetasjon og eventuelle forandringer i sammensetning, plantefrekvens, tetthet og vegetasjonsdekke. Det finnes ulike metoder for vegetasjonsanalyse, hvorav følgende metoder omtales nedenfor: frekvensanalyse, tetthetsanalyse, dekning. Transektanalyse er omtalt i et eget punkt (E).

En *frekvensanalyse* utføres ved å vise forekomst av en plantart i flere ruter (vanligvis fra 20 til 100) som er jevnt fordelt i undersøkelsesfeltet. Metoden brukes som oftest ved sammenlikning av vegetasjonssammensetning i ulike lokaliteter og habitater. Hvor viktig en spesiell art er i et samfunn kan også avdekkes. For urtevegetasjon er ofte rutestørrelse på 50 x 50 cm passende hvis et minimum av 20 prøver undersøkes. I en frekvensanalyse bestemmer størrelsen på ruta sannsynligheten for å detektere en spesiell art, og denne skulle derfor overveies nøye spesielt m.h.p. sjeldne arter. Om nødvendig antall arter blir tatt med, avhenger også av størrelsen på ruta. Frekvensdata er ikke lett å omgjøre til estimater relatert til plantetetthet.

Det er vanlig å inndele en rute i mindre ruter for så å foreta en *smårutefrekvensanalyse*. Forekomst av en plante fastslås i hver subrute og uttrykkes som frekvens.

En *tetthetsanalyse* kan utføres ved å telle antall planteindivider innenfor et område. Analysen kan brukes til å estimere overlevelse og etablering av en plante og egner seg til å utarbeide modeller for populasjonsvekst i ulike økosystemer. Plantetetthet kan estimeres som forklart ovenfor ved ruteanalyse. Til forskjell fra frekvensanalyse, kan det ved tetthetsanalyse produseres data som kan brukes i en

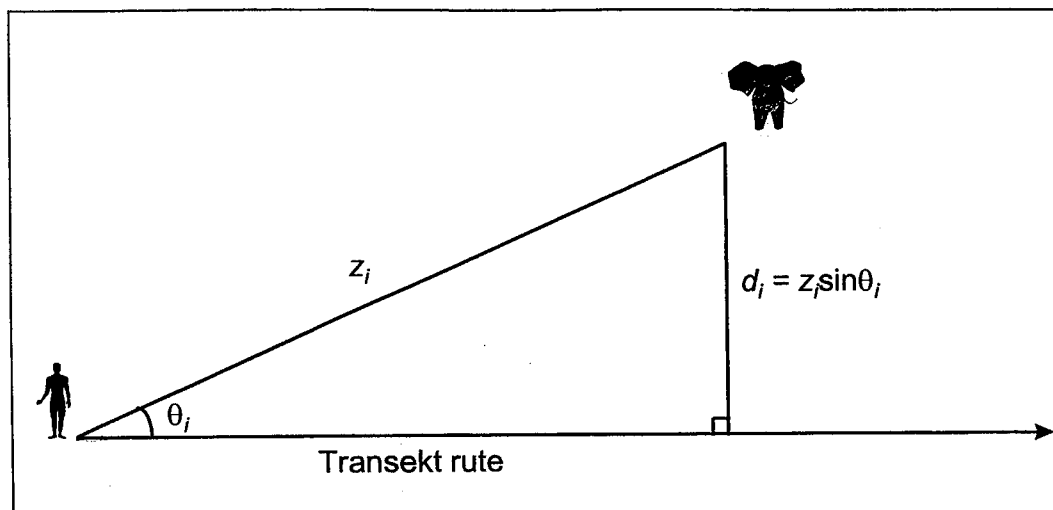
videre sammenheng. Metoden er imidlertid problematisk for bestemmelse av planter med sterk lateral vekst. Istedenfor kan individuelle spirer registreres. Det romlige arrangementet av prøver er viktig spesielt hvis vegetasjonsgradienter analyseres.

Dekning presenteres ofte som prosentantall enten estimert ved observasjon eller målt ved «punktfrekvens». I begge tilfeller er målet å fastslå graden av dekning. Subjektiv vurdering av en arts dekning i prosent ved direkte observasjon er mest vanlig. En «punktfrekvens»-anretning brukes av og til og metoden utføres ved at plantedeler som berører pinnen på «punktfrekvens»-anretningen når rammen senkes, artsbestemmes. Estimering av vegetasjonsdekke ved denne type observasjon er bare mulig til nærmeste 10 %. Punktfrekvensanalysen er en veldig tidkrevende metode hvis detaljert artsbestemmelse skal utføres. Den krever også svært solid taksonomisk bakgrunn. Analyse av plantevegetasjonsdekke er et nyttig redskap for å indikere invasjonspotensialet i et habitat og til å estimere konkurranse-dyktigheten til en genmodifisert plante. Plantedekke verdier kan også brukes til å sammenlikne strukturelle forskjeller i ulike økosystemer, og deres sårbarhet overfor mulige invasjoner. Metoden er for øvrig lite brukt i Norge.

E. Transektanalyse

Transektanalyse kan brukes både for planter og dyr. Metoden brukes for planter i tilfeller hvor økologiske gradienter er tilstede i prøvefeltet. Den benyttes da til studier av forandringer i vegetasjon innen et område. Lengden av transektet i slike studier kan være flere cm eller flere hundre km avhengig av målet for studiet. Ved gitte punkt langs transektet blir enkelte av metodene beskrevet over, brukt til analyse av vegetasjonen. Dette kalles systematisk transektanalyse. I tillegg kan en velge ut et areal subjektivt innen transektet for å få med den viktigste variasjonen i vegetasjonen og innenfor disse feltene legge ut analyseruter systematisk eller tilfeldig.

For dyr kan punkt- og linjetransekt benyttes f.eks. ved observasjon av dyr fra fly; hval fra båt eller fugler fra en posisjon midt i skogen. Hvis metoden brukes på denne måten, kreves det at distansen fra observasjonspunktet eller linjen til hvert dyr fastslås, kjent som «prøvetakingsdistanse». Beste måte å estimere helhetlig presisjon på er å foreta flere transekt innen studieområdet og estimere middelveidi og standardavvik på vanlig måte. Punkttransekt er illustrert ved eksempelet nedenfor. Linjetransekt er illustrert ved **figur 3**, men bare prinsipielle poeng ved metoden er skissert. Det er uvisst hvor relevant det er med utsetting av genmodifiserte dyr av størrelse egnet for lufttelling. For videre eksemplifisering se generell litteratur innen økologisk metodikk (f.eks. Krebs 1989 eller Sutherland 1996).



Figur 3. Illustrasjon av metoden for transektlinje prøvetaking (Sutherland, 1996).

Punkttransekt med bare en nedtegningszone (Sutherland, 1996)

Grunnlag

- r = radius i første sone (den andre strekker seg fra r til uendelig)
- n₁ = antall dyr telt innen r
- n₂ = antall dyr telt utover r
- m = antall replikative punkt innen settet

Eksempel

326 replikative tellinger på 5 minutter hver i barskog i Wales ga 421 av fuglearten *Phylloscopus trochilus* innen 30 meter og 504 utover den distansen (Bibby et al. 1985).

Beregning

$$\text{Tetthet} = \frac{n_1 + n_2}{\pi r^2 m} \log e \left(\frac{n_1 + n_2}{n_2} \right) = \frac{925}{\pi (30^2) 326} \log e \left(\frac{925}{504} \right) = 6.09 \times 10^{-4} \text{ fugler / m}^2 = 6.09 \text{ fugler / ha}$$

Linjetransekt

Bakgrunn

Tellinger fra luften er bare en spesialisert form for utføring av ruteanalyse hvor dyr lokaliseres innen rømser i et kjent område. Tre målinger blir tatt for hver dyr som observeres:

- Distansen fra den som observerer til dyret (z_i)
- Vinkelen mellom den som observerer og dyret (θ_i)
- Perpendikulærdistansen (d_i)

Populasjonstettheten kan estimeres hvis følgende antakelser blir foretatt:

- 1) Dyr direkte på transektlinjen blir tatt med i beregningen (dvs at deteksjonssansynligheten = 1)
- 2) Dyr er ubevegelige hvor de først ble observert; de rører seg ikke før de blir detektert og ingen telles mer enn én gang
- 3) Distansene og vinklene måles nøyte uten måle- og avrundingsfeil
- 4) Observasjon av individuelle dyr er uavhengige hendelser

F. «Fangst-merking-gjenfangst»metoden

Denne metoden er en mye brukt metode for beregning av antall dyr i en populasjon. Ideen bak metoden er å fange et visst antall dyr fra en populasjon, merke dem for så å slippe dem ut igjen. De merkede dyrene blander seg så med populasjonen hvor de hører til, til neste runde med innfangning av dyr blir foretatt. Det antas at det på bakgrunn av andelen merkede dyr som fanges andre gang vil kunne estimeres det totale antall dyr i populasjonen. Matematisk kan dette uttrykkes; Hvis n_1 er antall dyr fanget første gang og sluppet ut igjen, n_2 er størrelsen på gjenfangst, m_2 antall merkede individer og N er den totale populasjonsstørrelsen, kan N beregnes: $m_2/n_2 = n_1/N$

Fleire «fangst-merking-gjenfangst»metoder er brukbare hvor hver tar for seg ulike antagelser eller ulike statistiske metoder for estimering av populasjonsstørrelsen. Petersenmetoden (eller Lincoln indeks) er den mest grunnleggende metoden (se f.eks. Sutherland, 1996) hvor følgende formel taes i bruk:

$$N = (n_1 + 1)(n_2 + 1) / (m_2 + 1) - 1$$

2.2 Molekylærbiologiske metoder

Denne delen av kapittelet omfatter beskrivelse av molekylære metoder som både omfatter analyse av genetisk struktur og deteksjonsmetoder for gener og genprodukter.

G. PCR - Polymerase chain reaction (Sambrook et al. 1989)

Ved metoden amplifiseres en del av DNA som så kan belyse komposisjonen av et spesifikt gen eller et område av genomet. I metoden brukes syntetiske primere (korte nukleotidsekvenser, ofte på 10-25 nukleotider) som under bestemte betingelser bindes til homologe DNA-sekvenser på en komplementær DNA-tråd. Prosedyren er en trinnvis prosess som omfatter denaturering av den dobbelte DNA-tråden, festing av primere og syntese av DNA. Trinnene gjentas og resultatet er amplifisering av spesifikke DNA-fragmenter som kan analyseres ved gelelektroforese og visualiseres ved etidium bromid. Det amplifiserte DNA-fragmentet kan analyseres videre ved f.eks. sekvensering og kan brukes ved *in situ* hybridisering av kromosomer for bruk i koblingsanalyse (Davies, 1988), for analyse av restriksjonssteder eller ved identifikasjon av innsatt DNA i en genmodifisert organisme.

Ulemper ved metoden er at kjennskap til deler av nukleinsyresekvensen er nødvendig for konstruksjon av primere, og dette er den mest tidkrevende delen av prosedyren. For å oppnå spesifikk binding av primere må ofte reaksjonen optimaliseres på forhånd. Fordeler ved prosedyren er at veldig små mengder DNA kreves og at spesifikke områder av det genetiske materialet kan analyseres. I tillegg kan den utstrakte automatikken i amplifikasjonsprosedyren gjøre at mange prøver kan analyseres på kort tid.

H. Pulsfelt gelelektroforese (Southern et al. 1987; Zhang et al. 1991)

Pulsfelt gelelektroforese brukes blant annet ved strukturelle studier av genomorganisering, men kan også brukes ved populasjonsgenetiske studier av f.eks. bakterier. Teknikken brukes til separasjon av DNA-fragmenter opp til 10 Mb ved at DNA-molekylene utsettes for elektriske pulser med forskjellig orientering.

Fordelen med metoden er at større strukturelle endringer av kromosomet kan detekteres, slik som store delesjoner, insersjoner og inversjoner (Smith et al. 1986) og gener kan lokaliseres. Begrensningene ved metoden er at den er tidkrevende og at store enzymmengder må brukes. I tillegg egner metoden seg ikke så bra ved analyse av metylerte DNA-sekvenser. Dette kommer av at restriksjonsenzymene som benyttes ofte er metyleringssensitive og at sekvensene som gjenkjennes (CpG) ofte er metylerte.

I. Dot-blot analyse (Sambrook et al. 1989)

Dot-blot analyse brukes ofte til å bestemme antall kopier av transgenet som er integrert i genomet, men kan også brukes for deteksjon av tilstedeværelse av en spesifikk DNA (eller RNA)-sekvens. Det førstnevnte gjøres ved at genomisk DNA denatureres og blottes over på en membran. DNA kan så hybridiseres til en probe som representerer det innsatte DNAet eller deler av dette. Intensiteten av hybridiseringen korreleres med antall kopier (ved bruk av en kontroll med kjent DNA-konsentrasjon) og denne kan måles hvis radioaktivitet er brukt ved scintillasjonsteller eller ved annen apparatur som kan kvantifisere signaler.

Fordelen med metoden er at den er enkel å utføre. Ulempen er at den bare gir et kvantitativt mål på antall kopier av det innsatte DNAet. Metoden gir heller ikke data som kan si noe om hvor i genomet integrasjonen har foregått og om eventuelle endringer av det innsatte DNAet.

J. Immunoassay (Sambrook et al. 1989)

Immunoassay er basert på interaksjonen mellom et spesifikt antigen med en spesifikk motpart, antistoff. Metoden kan her brukes til rask deteksjon av stedfremmede produkter i arten som studeres, noe som kan brukes som genetisk markør for innsatte DNA-sekvenser. Immunoassayet kan utføres på to måter. Enten kan antistoffet merkes med et enzym (ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay) eller med en radioisotop (RIA = radioimmunoassay). I ELISA-metoden kreves det relevant substrat for enzymet slik at fargeproduksjon kan oppnås. Konsentrasjonen av fargeproduktet er en indikasjon på antigen-antistoff interaksjon. Radioaktiviteten som måles ved RIA-assayet relateres til mengde antistoff i antigen-antistoff komplekset.

Fordelen ved metoden er at reaksjonen mellom antigen og antistoff er svært spesifikk og rask. Mellom 200 og 300 prøver kan analyseres på en dag avhengig av graden av automatikk. Ulempen er at det kreves produksjon av antistoff som bare må gjenkjenne det spesifikke antigenet, dvs. at antistoffet bør være monoklonalt. Prosedyren for produksjon av antistoff krever tilgjengelige forsøksdyr og cellekulturer, dvs. meget gode laboratoriefasiliteter.

K. Immunoblot (Western blot) (Sambrook et al. 1989)

Metoden er en kombinasjon av elektroforese, separasjon av proteiner på en gel, og overføring av proteinene fra gel til en membran. Overføringen fra gel til membran er en elektroforetisk overføringsprosess som tvinger proteinene ut av gelen og over på membranen. Spesifikke antistoff blir så tilført membranen og antigen-antistoff kompleks visualisert enten ved å tilføre spesifikk antistoff bundet til konjugative enzymer som utvikler farge etter tilføring av enzymspesifikt substrat, eller ved tilsetning av radioaktive proteiner med høy affinitet mot antistoff-antigen komplekset.

Som for immunoassay er metoden spesifikk dersom spesifikt antistoff er tilgjengelig, men ulikt immunoassay-metoden, gir denne metoden også mulighet for gjenkjenning av ulike allele former av antigenet. Flere prøver kan analyseres per dag. Ulempene er de samme som ved immunoassay, som f.eks. at spesifikt antistoff må lages på forhånd.

L. Immunodiffusjon (Sambrook et al. 1989)

Metoden er basert på en utfellingsreaksjon mellom antigen og det tilhørende antistoff. Reaksjonen utføres i en gel enten ved enkel diffusjon eller i et elektroforetisk felt. Flere prøver inneholdende et mulig antigen plasseres på en gel og antistoffet i en bestemt brønn på denne gelen. Linjer av utfelling indikerer om prøvene inneholder det spesifikke antigenet.

Immunodiffusjon kan være enklere å utføre enn immunoassay som ELISA eller RIA. Ellers har den samme begrensning med hensyn til antistoff som de andre immunologiske metodene nevnt ovenfor.

M. Northern hybridisering (Sambrook et al. 1989)

Northern hybridisering eller RNA-blotting er en metode hvor størrelse og mengde av en spesifikk mRNA bestemmes. Prinsippet for metoden er at RNA størrelsessepareres ved gelelektroforese og overføres til en membran hvor mRNA av interesse lokaliseres ved bruk av DNA- eller RNA-prober.

Metoden er forholdsvis grei, men forhåndsregler må tas for å forhindre degradering av RNA. Ellers er prosessen tidkrevende, slik at for kvantitative studier kan andre metoder (som dot-blot eller slot blot) være bedre egnet.

N. «Primer forlenging» (Sambrook et al. 1989)

«Primer forlenging» er en metode hvor prinsippet er at et lite radioaktivt merket DNA-fragment eller en oligonukleotid hybridiseres til mRNA som ønskes påvist. Deretter syntetiseres en DNA-tråd med den ønskede mRNA som templat ved bruk av enzymet revers transkriptase. Mengden av DNA som syntetiseres er omtrent proporsjonalt med konsentrasjonen av målsekvens, derfor kan metoden brukes til kvantifisering av mRNA såvel som kartlegging.

Fordelen med metoden er at den er ganske rask å utføre. Ulempen er at et negativt resultat kan bety at mRNAet ikke er tilstede eller at betingelsene for reaksjonen med den reverse transkriptasen ikke er optimale.

O. Væskehybridisering (Sambrook et al. 1989)

I denne metoden kvantifiseres den absolutte konsentrasjonen av mRNA ved beregning fra hybridiseringsrate mellom en liten mengde spesifikk radioaktiv probe med en bestemt mengde av rensed cellulært RNA. Alternativt kan et overskudd av radioaktiv probe inkuberes med en kjent konsentrasjon av RNA. Konsentrasjonen av RNA beregnes så fra mengde radioaktivitet som blir resistent overfor nuklease S1 (et enzym som spesifikt degraderer enkelt-trådig DNA og RNA).

2.3 Populasjonsgenetiske metoder

P. Heterozygositet

Heterozygositet (H) er et mål på observert eller forventet genetisk variasjon innen en populasjon og betyr frekvens av heterozygote individer per locus. Den kan brukes for sammenlikning av den genetiske variasjonen i ulike populasjoner eller mellom arter. Lav heterozygositet kan indikere et lavt nivå av genetisk variasjon og derfor muligheten for høyere sårbarhet overfor miljøforandringer. Denne beregnes ved først å bestemme frekvens av heterozygote individer per locus for så å beregne gjennomsnittet av disse frekvensene over alle loci. Hvis vi f.eks. studerer fire loci i en

populasjon og finner at frekvensen av heterozygote i dette loci er 0.25, 0.42, 0.09 og 0 blir heterozygositeten basert på disse fire loci $(0.25 + 0.42 + 0.09 + 0) / 4 = 0.19$, dvs. heterozygositeten i populasjonen er 19 %.

Forventet heterozygositet beregnes fra allelfrekvensen ved å anta at individer i en populasjon krysses tilfeldig. Hvis en antar at det i homozygote individer er fire alleler i et loci med frekvenser f_1 , f_2 , f_3 og f_4 kan en anta at frekvensen av de fire homozygotene vil være f_1^2 , f_2^2 , f_3^2 og f_4^2 . Forventet heterozygositet vil være

$$H_{\text{forventet}} = 1 - (f_1^2 + f_2^2 + f_3^2 + f_4^2)$$

F.eks. hvis allelfrekvens i et gitt locus er 0.50, 0.30, 0.10 og 0.10 er

$$H_{\text{forventet}} = 1 - (0.50^2 + 0.30^2 + 0.10^2 + 0.10^2) = 0.64$$

Denne måleenheten kan brukes i et hvilket som helst studium hvor genetiske markører taes i bruk. Et krav ved metoden er at det trenges minst en polymorf markør og markøren må inneha Mendelsk nedarving. Den forventede heterozygositeten er generelt lik den observerte heterozygositeten dersom forventningene til Hardy-Weinberg's proporsjoner er oppfylt.

Q. Isozymelektroforese (Edwards et al. 1987)

Elektroforese av isozymer tar utgangspunkt i at proteiner, inkludert enzymer, har en elektrisk ladning og derved kan separeres i et elektrisk felt. Enzymets katalytiske evne kan så visualiseres f.eks. ved fargingsmetoder. Isozymer er enzymer med samme katalytiske egenskap, men med ulik elektrisk ladning som følge av allelvariasjon.

Mulige ulemper ved metoden er at en forutsetning for metodens virkemåte er at enzymene nedarves etter Mendelske prinsipper. Det vil si at en bør utføre nedarvingsstudier før GMOen settes ut. Antall fargeprosedyrer er begrenset til omtrent 100. Ellers er det kjent at bare 1/3 av den totale genetiske variasjonen kan undersøkes ved metoden fordi bare 1/3 av aminosyresubstitusjonene vil gi en forandring i proteinets elektriske ladning. Det er også viktig å ta i betraktning at variasjonen basert på fenotype generelt bare representerer en liten andel av den totale genetiske variasjonen i en populasjon. Fordelen ved metoden er at den er lett å utføre og at 200 individuelle prøver kan analyseres for 10-12 enzymer per dag (Kjetil Hindar, pers. medd.).

R. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) (Welsh & McClelland, 1990; Williams et al. 1990)

Ved metoden amplifiseres tilfeldige deler av genomet til en organisme. Prinsippet for metoden er at primere med ukjent spesifisitet kan feste seg til delvis komplementære DNA-sekvenser ved lav stringens. De amplifiserte DNA-fragmentene analyseres ved elektroforese og visualiseres ved etidium bromid.

En forutsetning for metoden er at bindingssetet for primerne er det samme for alle individene i en populasjon. En ulempe ved metoden er at det ved mutasjoner i bindingssekvensen ikke vil dannes PCR-produkt, hvilket innebærer at et individ heterozygot for den amplifiserte DNA-sekvensen (her kalt allelen) kan mistas for en homozygot. Dette kalles en «null»-allel (Lynch & Milligan, 1994). På grunn av at metoden er veldig sensitiv m.h.t. renhet, konstant kjemiske sammensetning og temperaturbetingelser, kan reproduktibilitet av resultater være vanskelig å oppnå. For å motvirke dette problemet, har bioteknologiske firmaer (deriblant Pharmacia Biotech) bl.a. utviklet perler inneholdende de fleste reaksjonsingrediensene slik at usikkerhet ved pipettering begrenses. Metodens funksjonalitet er avhengig av egnede primere og optimalisering av disse kan være et tidkrevende trinn i prosedyren. At bare én av DNA-trådene amplifiseres, betyr i tillegg at kodominante alleler ikke kan detekteres.

Fordelene ved metoden er at den er raskere å utføre enn RFLP og har vist seg å være brukbar i enkelte populasjonsgenetiske sammenhenger. Metoden er nesten så rask som isozyme elektroforese, forutsatt at DNA-rensning og amplifikasjonen er utført. Metoden kan gi mer informasjon enn isozymer, avhengig av antall alleler for spesifikke områder av genomet. I tillegg kan det genetiske materialet analyseres direkte i motsetning til immunologiske metoder og isozyme elektroforese hvor bare produktene fra det genetiske materialet analyseres. Med andre ord gir metoden også informasjon m.h.t. genetisk variasjon innen ikke-kodende områder av genomet. Bare ørsmå mengder DNA (ng fra ferske prøver, µg fra vev preservert i etanol, Taberlet & Bouvet, 1991) fra organismen kreves for amplifikasjon.

S. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) (Davies, 1988)

RFLP brukes til analyse av struktur og komposisjon av DNA i organismer. Metoden baseres på ekstrahert DNA som er kuttet av basespesifikke restriksjonsendonukleaser. DNA-fragmentene separeres i et elektrisk felt og gjenkjennes, etter overføring til membran, ved bruk av spesifikke DNA- eller RNA-prober; i dette tilfelle kalles prosedyren Southern blotting. Hvis RNA-fragmenter separeres og visualiseres ved bruk av DNA- eller RNA- prober, kalles prosedyren Northern blotting. Et DNA- eller RNA- «fingerprint» er den visualiserte DNA- eller RNA-profilen dokumentert ved fotografisk film. Metoden kan brukes i kombinasjon med PCR.

Ulempen ved metoden er at ganske store mengder DNA kreves (5-10 µg for hver prøve for hver restriksjonsendonuklease) En annen ulempe ved metoden er at restriksjonsenzymet som gjenkjenner polymorfisme, er begrenset og at variasjon bare detekteres ved disse restriksjonssetene. Fordelene ved metoden er at det genetiske materialet analyseres direkte i motsetning til enkelte av metodene nevnt ovenfor hvor bare genproduktet analyseres. Metoden kan brukes for detektering av innsatt DNA i genmodifiserte organismer og ellers studier av eventuelle strukturelle endringer av genetisk organisering over tid.

T. MtDNA analyse (Avise et al. 1987; Harrison, 1991)

Mitokondrielt DNA (mtDNA) har blitt en av de mest brukte markørene for bestemmelse av genetiske relasjoner mellom individer og arter. MtDNA har generelt maternell nedarving, enkel struktur, ingen rekombinasjon, liten størrelse og rask evolusjon. MtDNA er videre enkelt å isolere. Prinsippet for populasjonsgenetisk analyse av mtDNA er flere; 1) Isolere totalt DNA (inkludert mitokondrielt DNA) fra individet en ønsker å studere, kutte DNAet med restriksjonsenzymet, overføre DNAet til en membran for så å hybridisere med mtDNA. Resultatet blir et båndmønster tilsvarende restriksjonsmønsteret i mtDNAet. 2) Detektere sekvensvariasjon i et genetisk variabelt område av mtDNA ved bruk av PCR og sekvensering (lengde på området i gjennomsnitt 2-500 bp) og 3) liknende som i punkt 2, men bruk av RFLP istedenfor sekvensering.

Fordelen med metoden er at mtDNA er enkelt å arbeide med i tillegg til at evolusjonsmessig konservering medfører at det ikke er nødvendig å opparbeide informasjon om sekvensen på forhånd. Ulempe ved bruk av mtDNA er at det pga. molekylets maternelle opprinnelse ikke gir noen informasjon om genstrøm via hanner i populasjonen. Analyse av mtDNA gir heller ingen opplysning om kjerne-DNAet, som vi må anta er viktigere for organismen enn mtDNAet.

U. Minisatelitter (Jeffreys et al. 1985)

Minisatelitter er hypervariable tandem repeterte sekvenser på 10-100 bp per enhet hvor antallet enheter varierer individuelt og derved kan brukes som polymorfe markører i en «fingerprint» strategi. Jeffreys og kollegaer var de første som oppdaget at det var mulig å bruke en konsensusdel av den repeterte enheten ved lavstringente betingelser for å detektere mange minisatelitter samtidig som til sammen ga et «DNA-fingerprint»-mønster. Minisatellittmarkøren ble opprinnelig funnet i mennesket og ble fortrinnsvis brukt i rettsmedisinske problemstillinger. Bruken ble imidlertid raskt utvidet ved at markøren også kunne detektere liknende sekvenser i andre organismer og er i dag svært nyttig i økologiske studier (Burke et al. 1989). Multilocus DNA-fingerprinting er en forholdsvis rask metode for bl.a. testing av reproduktiv suksess og avlssstrategi.

Minisatellitter detekteres vanligvis ved bruk av tradisjonelle metoder som kutting ved restriksjonsenzymet og Southern blot av agarosegeler, slik at alleler i størrelsesorden 1000-20000 bp kan detekteres. Variasjonen kan også studeres ved bruk av PCR, men metoden er ikke så velegnet pga. minisatellittenes størrelse. Et problem ved minisatellittmetoden er at det finnes minisatellitt alleler som skiller i størrelse på bare én repetert enhet. Dette kan være for liten forskjell til å være synlig i en agarosegel og medfører at ikke alle variasjoner detekteres.

Fordelen ved bruk av minisatellittmarkører er at de har vist seg å være svært polymorfe, f.eks. er det funnet polymorfisme i vågehval på 0.98, med opp til 50 identifiserte alleler i 87 individer (Van Pijlen et al. 1995).

V. Mikrosatellitter (Litt & Luty, 1989; Weber & May, 1989) Mikrosatellitter er som minisatellitter hypervariable og består av tandemrepeterte sekvensenheter vanligvis på 10-50 bp av en mye kortere repetert enhet (1-10 bp, vanligvis 2-5 bp). Disse er vidt fordelt i det eukaryote genomet og er ofte sterkt polymorfe på grunn av varierende antall repeterte enheter. De kan av den grunn brukes i populasjons-genetiske studier (Tautz, 1989). Mikrosatellitter er små nok til å kunne undersøkes ved PCR. Den alleliske variabiliteten som tilsvarende forskjellige lengder på PCR-produkt, identifiseres ved gelelektroforese.

Fordelen ved å bruke mikrosatellitter i populasjons-genetiske studier er at de er svært polymorfe. Når først primerene er konstruert kan mange mikrosatellitter lett og raskt undersøkes ved PCR. Ulempen ved metoden er at sekvensene rundt mikrosatellitten må være kjent før primerene kan konstrueres. Dette krever ofte at mikrosatellittene og områdene rundt først studeres og at området så blir klonet og sekvensert. Primere utviklet for en organisme kan også ofte brukes i beslektede taxa (Bruford & Wayne, 1993). Etter hvert som store genomer blir bedre kjent kan imidlertid opplysninger om mikrosatellitter og omkringliggende sekvenser hentes fram fra databaser. En ulempe ved metoden kan også være som ved RAPD-metoden, tilstedeværelse av såkalte «null» alleler (Callen et al. 1993) som framkommer da gjenkjenningssettet for primeren er deletert bort slik at primeren ikke kan feste seg. Resultatet av dette er at heterozygote individer kan feilkarakteriseres som homozygote.

2.4 Overvåking av innsatt genetisk materiale og genprodukt

Det er her valgt å behandle temaet stabilitet i genetisk materiale, knyttet til transgent materiale integrert i genomet i levende organismer. En annen aktuell problemstilling kunne være relatert til det nakne DNAet som etterlevninger etter genmodifiserte planter og dyr. Denne problemstillingen er behandlet i litteratur som bl.a. omhandler horisontal genoverføring (se f.eks. Traavik, 1995; Syvanen 1994).

Genomer er sett på som flytende ved at de endres over tid. De gjennomgår forandringer både ved erverving av nye sekvenser og ved rearrangering av allerede tilstedeværende sekvenser. Slike rearrangementer kan være duplikasjoner, delesjoner, translokasjoner eller inversjoner (Singer & Berg, 1991). Alle forandringene kan medføre en evolusjonsmessig utvikling som kan gi fortrinn eller ulemper for organismen.

Enkelte områder av genomet er mer utsatt for strukturelle endringer enn andre og dette kan ha stor innflytelse på integrert «fremmed» DNA. En type rearrangementer kan være knyttet til transposable elementer. Transposable elementer eller transposoner er genetiske elementer som uavhengig kan bevege seg fra et område til et annet innen

genomet både i prokaryoter og eukaryoter. Overflytting av transposoner kan i seg selv gi grunnlag for delesjoner eller inversjoner, eller kan føre til at sekvenser overføres til nye områder. Det sistnevnte bør vektlegges spesielt i sammenheng med GMO-problematikk fordi det kan medføre at transgent materiale forflyttes, noe som kan forandre både det transgene produktet og dets relasjon til naturlig tilstedeværende gener.

De fleste metoder for genmodifisering av både planter og dyr tar utgangspunkt i en prosess hvor det introduserte DNAet integreres tilfeldig i genomet. Beliggenheten av det introduserte DNAet vil ha innvirkning på både genuttrykk av integrerte gener og omkringliggende naturlig tilstedeværende gener. I tillegg til denne kilden til usikkerhet m.h.p. stabilitet av genetisk uttrykk over tid, kan kromosomstrukturen i integreringsområdet også påvirke den genetiske stabiliteten. Dette er viktig i forbindelse med overvåking av utsatte GMOer i et videre tidsperspektiv.

Både aktiviteten til et protein og mengden protein som blir dannet er avgjørende for funksjonalitet, og kan som diskutert over, forandres over tid. Utgangspunkt for en overvåking av integrerte transgener sett i lys av dette kan være først å undersøke at det innsatte materialet fremdeles er tilstede og deretter at ekspresjon av genene er uforandret. Det sistnevnte kan gjøres ved å studere genproduktet eller ved å analysere DNA-sekvensene rundt integrasjonsstedet. For å påvise om transgenet fremdeles er tilstede i organismen egner både PCR (2.2 G) og deteksjonsmekanismer basert på hybridisering (dot-blot 2.2. I, Southern blot) seg. I begge sammenhenger kan det brukes primere og prober med utgangspunkt i det innsatte DNAet og kartlegging er ikke nødvendig. For å undersøke eventuelle strukturelle endringer rundt integrasjonsstedet, bør imidlertid mer omfattende kartleggingsprosedyrer til. En egnet metode her er restriksjonskartlegging med tilhørende hybridisering med egnede prober. I denne sammenhengen kan genomisk DNA analysert ved konvensjonell gelelektroforese egne seg, men for mer helhetlig oversikt over integrasjonsområdet kan en om mulig inkludere pulsfelt gelelektroforese (2.2 H). Det er også en fordel hvis tilstedeværelse av transposoner nær integrasjonsstedet kartlegges og inkluderes i analysen. Dette kan gjøres ved samme metoder som ved påvisning av transgent materiale, med spesifikke prober og primere for transposon.

Stabilitet av genuttrykk vil kunne undersøkes enten ved måling av konsentrasjon av transgent produkt eller ved måling av genproduktets spesifikke aktivitet. Det sistnevnte kan være vanskelig da aktiviteten selv kan være ustabil og at det ofte kreves spesialiserte assay for hvert enkelt protein. Proteinkonsentrasjon kan måles ved blant annet immunologiske metoder (2.2 J, K, L), mens nivå av mRNA kan måles ved blant annet Northern hybridisering (2.2 M), «primer forlenging» (2.2 N), dot-blot (2.2 I) eller væskehybridisering (2.2 O). Slike undersøkelser må også omfatte eventuelle hybridorganismer som kan tenkes å oppstå hvis en transgen organisme krysses med en ikke-transgen organisme.

3 Overvåking av genmodifiserte planter (GMP)

Genteknologi har potensiale til å bli et essensielt element innen moderne planteavl. I de fleste tilfeller har genmodifisering av planter som mål å øke produktiviteten og kvaliteten av planter innenfor landbruket. Flere tusen feltforsøk av genmodifiserte planter (GMP) har allerede blitt gjennomført. Få av disse har resultert i uforutsette konsekvenser. Det må imidlertid taes i betraktning at dokumenterte feltforsøk er utført innen en tidsramme på 10-15 år, mens det er uvisst hvor mange generasjoner det vil ta for en plante å etablere seg for så eventuelt å bli utbredningsdyktig. Eventuelle forandringer over tid både i planten og miljøet kan påvirke GMPens tilpasningsdyktighet og konkurransevne på en uforutsett måte. I tillegg er det viktig å bruke at forsøk med GM-planter utført til nå er foretatt under så kontrollerte betingelser at eventuelle miljøeffekter ikke har hatt mulighet til å inntreffe. Noen hevder at de feltforsøk med genmodifiserte planter som har vært utført til nå gir tilstrekkelig grunnlag til å gi industrien klarsignal om ukontrollert kommersialisering. Det er imidlertid ikke gitt at en ut ifra småskala forsøk direkte kan forutsi hva som vil skje ved storskala kommersialisering. Kommersiell skala øker i stor grad sjansene for de skadelige hendelsene som i mindre skala ville være ubetydelige. Disse kan ifølge Rissler & Mellon (1996) deles inn i tre aspekter; Kommersialisering øker potensiale for eksponering overfor transgene planter tatt i betraktning størrelsen på småskala (f.eks. fra noen km²) og kommersiell skala (millioner av km² i bare USA); utsetting i kommersiell skala vil ikke foregå under betingelser som forhindrer unnslippelse av gener f.eks. ved at feltet er avgrenset og at feltet overvåkes; kommersiell bruk vil innbefatte planting i felt under varierende miljøbetingelser m.h.p. utvalg av slektinger, klima og variasjon i vær som flom og storm.

De viktigste bekymringene ved transgene planter kan deles inn i følgende tre punkt (Crawley et al. 1993):

- 1) At transgene planter kan utvikles til ugress eller være invasjonedyktige i naturlige habitater
- 2) At deres manipulerede gener vil kunne overføres via pollen til ville slektinger og at hybridavkommet blir mer ugressaktig eller mer invasjonedyktig
- 3) At transgene planter vil gi direkte skade på mennesker, husdyr eller andre naturlig forekommende organismer (inkludert eventuelt at genene kan overføres til mikroorganismer ved horisontal genoverføring).

3.1 Genmodifisering av planter

To forskningsgjennombrudd er bakgrunn for genetisk manipulering av planter; 1) Utviklingen av rekombinant DNA-teknologi som gjorde det mulig å isolere individuelle gener fra en hvilken som helst organisme, og 2) oppdagelsen av en jordbakterie (*Agrobacterium tumefaciens*) som kan over-

føre DNA til planter. Metoder som er benyttet i dag kan stort sett deles inn i fire grupper (Potrykus, 1990, 1991):

- *Agrobacterium*-metoden; er brukt for å transformere tofrøbladede arter. Prinsippet for metoden er å sette inn gener i T (transfer)-DNA vektorer i *Agrobacterium* som så kan introdusere DNA til planten.
- DNA-opptak ved planteprotoplaster; gjøres ved at DNA overføres til planteceller hvor celleveggen er fjernet (protoplast).
- Partikkelbombardement; er en metode som ofte blir brukt for transformasjon av kornplanter. Partiklene består av metall dekket av DNA, blir «skutt» inn i plantecellen. I enkelte av cellene blir det tilførte DNAet integrert i plantegenomet. Plastidtransformasjon foretatt på denne måten har vist å kunne øke uttrykket av de innsatte genene (Maliga, 1993; McBride et al. 1995)
- Delvis nedbrytning av celler i multicellulære strukturer; består i å delvis nedbryte planteanlegget ved hjelp av enzymer, for så å stimulere DNA-opptak ved eksponering overfor elektrisk sjokkbehandling (elektroporering).

Ved overvåking av de transgene plantene over tid, er det ikke så viktig hvilken metode som blir brukt for innsetting av stedfremmed DNA. Viktigere er det å undersøke om det innsatte DNAet er stabilt, hvor mange kopier som er satt inn, i hvilken grad det innsatte genet uttrykkes dvs. om DNAet er integrert i genomet på et sted med høy eller lav aktivitet m.h.p. uttrykk av gener osv. I alle fire metoder skissert over er integreringsstedet i genomet og antall kopier av det innsatte DNA-fragmentet tilfeldig. De fleste gener inkorporeres i de nukleære kromosomene, men det er også rapportert om transformasjon av plastidkomponenter i det cytoplasmiske genomet (O'Neill et al. 1993).

Tobakk var den første genetisk modifiserte planten og representerte mer enn ¼ av utsettinger i 1989. Av alle prøveutsettinger av genetisk modifiserte planter utført globalt fra 1986 til 1993 har imidlertid potet vært den hyppigst testede planten (Goy et al. 1995). Nord-Amerika er det stedet i verden som har tillatt flest prøveutsettinger og herbicidtoleranse er den egenskapen som blir testet i de fleste tilfellene (Goy et al. 1995). Denne trenden ser ut til å fortsette i landbruksammenheng, men ser ut til å forandre seg i forskningssammenheng hvor bruk av transgene enfrøbladede planter øker i tillegg til at det blir fokusert på andre egenskaper enn herbicidresistens. I 1995 utgjorde de fire landbruksplantene potet, oljeraps, mais og tomat til sammen omtrent 60 % av alle utsettinger i verdensammenheng (Goy et al. 1995). Typer modifiseringer det er snakk om er herbicidresistens, insektresistens, virusresistens, bakterie- og soppresistens, kvalitetsforbedring, markørgener og resistens overfor stress betingelser.

I tillegg til dette foreligger det mange andre planer med genmodifiserte planter på forskningsbasis. Enkelte av dem er skissert nedenfor.

- Hemme soppvekst ved å introdusere bakterielt kitinasegen, eller gen som koder for ribosomhemmende protein spesifikt for soppribosom i planten (Schell, 1993).
- Kontroll av fruktmodning ved senkning av etylennivå f.eks. i tomat. Dette gjør at oppbevaringen forbedres, men kan også bedre smaken på frukten.
- Bruk av planter til produksjon av stoffer som karbohydrater og lipider. Det er ønskelig med f.eks. økt stivelsesdannelse i potet ved å uttrykke bakteriegenen involvert i stivelsesbiosyntese (Schell, 1993).
- Å manipulere planter ved å aktivere spesifikke gener (innsetting av promoter elementer) til å kunne ha bedre nytteverdi i landbruket (Schell, 1993).
- Økning av ekspresjon av fytokrom gener vil kunne øke plantens evne til å utnytte sollys, - dvs. øke vekst (Robson et al. 1996).
- Overføring av LFY-genet som kontrollerer blomstutvikling i *Arabidopsis thaliana* til trær, her europeisk osp, kan føre til blomstring på kortere tid, dvs. forandret generasjonstid (Moffat, 1996).
- Bruk av «antisense»-konstruksjoner, dvs. nukleinsyrer som bindes til selve genet eller til mRNA det produserer, for å forhindre dannelse av genproduktet. Et mål for denne prosessen er genet som koder for enzymet ansvarlig for syntese av lignin, et sementlikt stoff som må fjernes før tre omdannes til papir (Moffat, 1996).
- Forbedring av hvetegluten ved å sette inn subenheter i glutenprotein (Shewry et al. 1995).
- Bruk av genmodifisert kål og brokkoli til å rense giftige tungmetaller fra gamle industri- og gruveområder (Svalbjørg, 1996).
- Redusere vekst av insektlarver ved å øke ekspresjon av heterologe inhibitorer i planten (her transgen tobakk) som forhindrer insektets fordøyelse (Jongsma et al. 1996).
- Forbedre plantenes toleranse overfor vannmangel og saltoverskudd (Bohnert & Jensen, 1996) noe som trolig krever overføring av flere gener på en gang.
- Genetisk manipulasjon med hensyn på utskilling av stoffer fra planterøttene kan føre til vekst av ønskelige mikroorganismer. Disse kan igjen gjøre planten mer motstandsdyktig overfor patogener, remediere kjemiske avfallsstoffer eller tiltrekke mikroorganismer til forbedring av plantehelse (O'Connell et al. 1996).

3.2 Mulige økologiske effekter av GMP

Intensjonene ved dannelse av nye rekombinante organismer, er å produsere organismer som er forskjellig fra de opprinnelige stedegne organismene. Overlevelse for disse organismene kan være begrenset i tid, men de kan også tenkes å etablere seg permanent i det naturlige miljøet. Økologer definerer den sistnevnte typen av introduksjoner som invasjoner (Williamson, 1988). Et viktig spørsmål å fokusere på i en slik sammenheng er hva som avgjør om en introduksjon blir vellykket eller ei og deretter å vurdere om en vellykket introduksjon har innvirkning på det invaderte

samfunnet. Til det sistnevnte knyttes to aspekter, nemlig vurdering av hvilke arter som er mest ødeleggende og hvilke miljø som er de mest følsomme (Pimm, 1987). Fra erfaringer med introduserte organismer som har vist seg å ha medført økologiske ødeleggelse, ser det ut til at følgende kategorier av organismer har større sjanse for å gi en «vellykket» introduksjon (Williamson, 1988):

- 1) «Generalister» mer enn «spesialister»
- 2) Organismer uten fiender eller på toppen av næringskjeden i sitt nye miljø
- 3) Organismer som er uskadelige i ett miljø, men hovedpest i et annet
- 4) Organismer hvor genetisk forandring har ført til økologisk forandring, f.eks. som ved influensa, hvor akkumulerte mutasjoner fører til unngåelse av immunrespons og dermed til suksessiv epidemi.

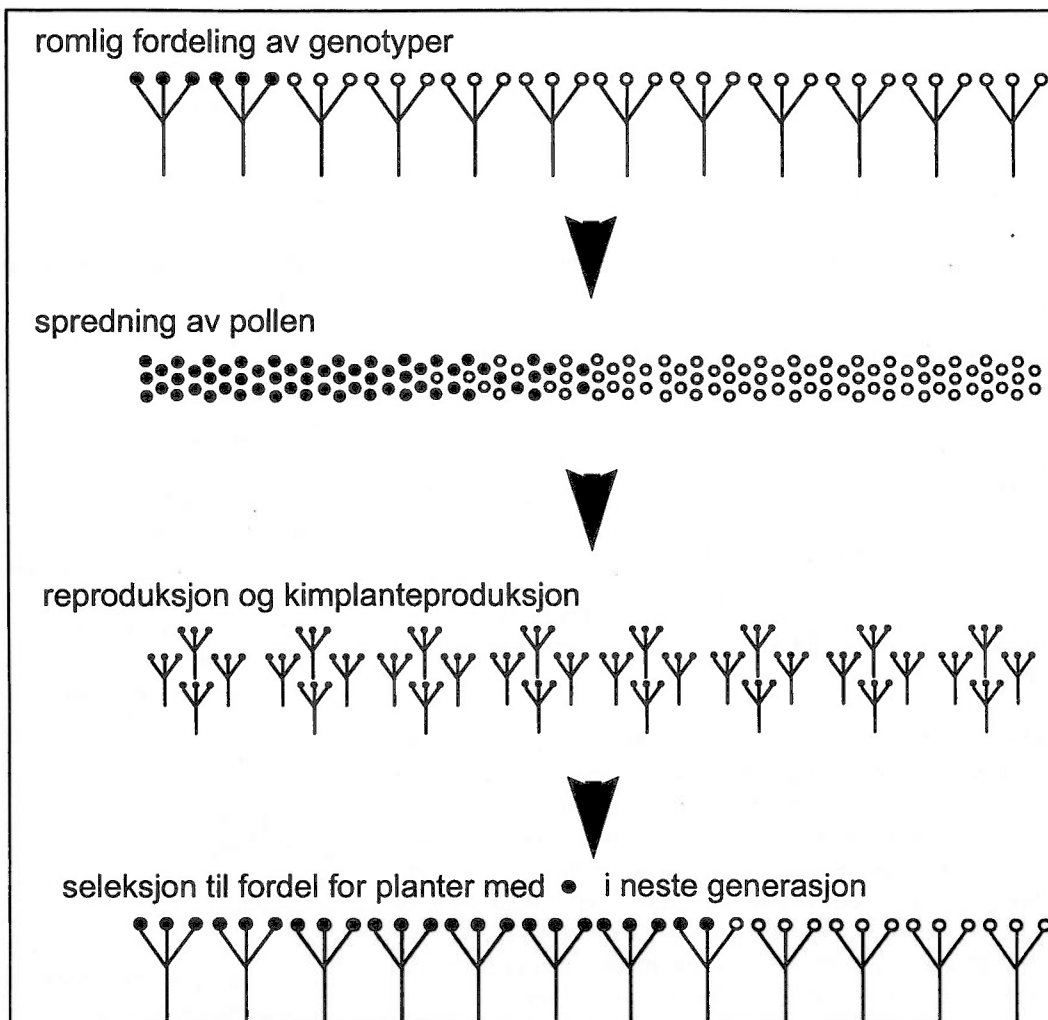
Mulige risikofylte effekter ved utsetting av genmodifiserte planter knyttes som nevnt i begynnelsen av kapittelet, spesielt til om genmodifiseringen kan øke sjansene for

- 1) at planten kan bli ugress eller invasionsdyktige i naturlige habitater,
- 2) at plantenes manipulerede gener vil kunne overføres via pollen til ville slektninger og at hybrid avkommet blir mer ugressaktig eller mer invasionsdyktig,
- 3) at planten vil gi direkte skade på mennesker, husdyr eller andre naturlig forekommende organismer.

Ingen av disse punktene er hverken lette å vurdere eller å kontrollere konsekvensene av i en økologisk sammenheng, bl.a. fordi det innebærer at problemstillingene blir satt i et svært langsiktig perspektiv. I økologisk sammenheng er det viktigst å overvåke eventuelle skader på naturlig forekommende organismer. Det er sannsynlig at små «usynlige» effekter som kan akkumuleres over tid kan utgjøre den største risikoen i en slik sammenheng (Rissler & Mellon, 1996). Et velkjent eksempel er den kumulative effekten av insekticidet DDT som ved å vandre gjennom næringskjeden fra akvatiske invertebrater til fuglearter, og ga redusert reproduktiv suksess som ga ekkoeffekter i hele økosystemet (Graham, 1970).

Punkt 1 og 2 ovenfor tar begge for seg problemstillinger relatert til om en plante enten ved å være transgen eller via overføring av transgener til hybridplanter kan øke potensielle for seg selv eller hybridene til å bli ugress eller å utgjøre en invasjon (se figur 4). Om dannelse av hybridplanter vil utgjøre en økologisk risiko, vil avhenge av hvilken type plante det gjelder og hvilke fenotypiske karakteristika overføringen av transgener vil gi. Hvis de naturlig forekommende plantene tilegner seg egenskaper som i den transgene planten skulle gitt fortrinn i forhold til sprøyting, pest eller stress, ville hybridplanten utøve en stor agonomisk trussel. I tillegg ville planten i enkelte sammenhenger pga. ervervinger av transgenet være mer konkurransedyktig enn den naturlig forekommende foreldreplanten og i den sammenhengen utøve en økologisk trussel.

Figur 4. Sekvensen av hendelser simulert i genspredningsmodell for ett-årige planter (fra Manasse & Kareiva, 1991) hvor fylte sirkler representerer fordelaktige gameter eller frø. De fylte sirklene sprer seg og øker i frekvens som følge av seleksjon og distribusjon.



Definisjonen av «ugress» er planter som er på feil sted til feil tid (Rissler & Mellon, 1996). Definisjonen avhenger av både sammenheng og menneskelige verdier da ingen planter i seg selv er ugress. Den samme planten kan være ugress i en situasjon, og svært ønsket i en annen. Det er vanskelig å gi klare retningslinjer for hvilke trekk som medfører «ugresshet», men det antas at ugress har spesielle fysiske og strukturelle trekk som medfører økt utholdelse og invasjonspotensial under gitte miljøbetingelser. En bekymring er at tilføring av gener til en plante vil øke dennes sjans til å bli et ugress, dvs. gi økt kapasitet til utholdelse og invasjon av nye habitater. Spørsmålet er hvor sannsynlig det er at tilføring av ett eller et fåtall gener vil øke plantens evne til å bli ugress. En utbredt mening er at evnen til å bli ugress er et for komplekst trekk til å inneha stor sannsynlighet for å bli tilført på denne måten. Imidlertid bygges argumentasjonen på to svært forenklede antagelser som en kan stille spørsmål ved (Rissler & Mellon, 1996). Disse er følgende: 1) at et spesifikt sett med egenskaper er nødvendig for å gjøre en plante til ugress og 2) at de fleste planter er så «ikke-ugress» at de mangler de fleste av de påkrevde særtrekk. Utfordringen er ifølge Rissler og Mellon (1996) å prøve å skille mellom en kultivert plante og et ugress hvor den kultiverte planten tilhører en «nesten-ugress-gruppe» som f.eks. agurk/squash- og *Brassica*-gruppen. Bekymringen har økt etter at det er dokumentert

tilfeller hvor ett eller et fåtall gener har forandret på en populasjons økologiske suksess. Et eksempel er en kløverplante (*Trifolium hirtum*) hvor ett gen som ga planten større og mer hårete beger, medførte invasjonspotensial (Jain & Martins 1979). Et annet eksempel er at det bare er ett enkelt «supressor»gen i kultivert havre (*Avena sativa*) som skiller denne fra den ville slektningen (*A. fatua*). I kultivert havre undertrykker genet uttrykk av evner som har med tilbakeholdelse av modning av frøet og tilstedeværelse av hårete strukturer ved basis av kornet å gjøre (Thomas & Mytton, 1970).

Gener som gir toleranse overfor miljøstress, antas å ha større mulighet for å øke en plantes tilpasning til et miljø enn andre gener, men siden ville slektinger eksisterer i svært varierende miljø både m.h.t. klimatiske og biologiske forhold, er det vanskelig å forutsi hvilke egenskaper som vil gi konkurransefortrinn i et spesifikt miljø for en spesifikk populasjon (Rissler & Mellon, 1996). Mange av de transgene egenskapene nevnt innledningsvis som de mest hyppigst brukte, antas imidlertid å ha størst konkurransefortrinn under gitte, ofte menneskeinfluerte, betingelser. Eksempel på en slik egenskap er herbicidresistens, hvor fordelene herbicidresistente planter har framfor andre ikke-resistente, bare framkommer ved sprøyting. Tilføring av herbicidresistensgener til uønskede planter via pollen-

spredning og introgresjon, er imidlertid antatt i agronomiske sammenhenger å ville medføre et stort problem da sprøytemidlene ville miste sin effekt. Resultatet vil bli tilbakevending til bruk av tidligere brukte giftige kjemikalier.

Pestresistens som er den mest «populære» genmodifiseringen etter herbicidresistens, vil i naturlige miljø også gi planten som innehar egenskapen et konkurransefortrinn ved angrep av pest. I tillegg til plantens eget konkurransefortrinn kan pestresistente planter gi sekundæreffekter på pesten, som f.eks. resistensutvikling. Et eksempel på slik virkning er dokumentert ved bruk av toksinet fra bakterien *Bacillus thuringiensis* (såkalt Bt-toksin)(Moar, 1995). Toksingenet er nå satt inn i en rekke landbruksplanter inkludert mais, ris, bomull og tobakk. Produksjon av Bt-toksin i stor mengde i en rekke ulike avlinger, er oppskrift for utvikling av resistens hos insekter som på sikt vil føre til at produktet mister sin effekt. Den eneste måten å forhindre en slik effekt på er ved integrert pestforvaltning, noe som er vanskelig å gjennomføre fordi det krever en hårfin kontroll av bruken av biopesticid.

Mange forskere arbeider med å modifisere planter til å tåle den ødeleggende effekten av plantevirus. For å oppnå dette, settes ofte virale gener inn i plantegenomet. Den resulterende transgene planten er resistent overfor infeksjoner av viruset hvorfra virusgenene ble hentet. Genmodifiserte planter med resistens overfor en pest som virus, er antatt av mange å utøve en større uforutsett risiko som lett kan bli ukontrollerbar, enn andre pestresistente genmodifiserte planter. Enkelte hevder at utstrakt bruk av slike transgene planter kan medføre dannelse av nye typer virus som igjen kan skade andre planter eller forsterke effekten av eksisterende virus (Tepfer, 1993). Dette vil kunne ramme både landbruks- og ville planter. Dokumenterte tilfeller som peker i retning av en slik utvikling er påvisning av bl.a. at ulike virus kan bytte kappe og dermed utvide spekteret av vertsplanter (det er strukturen på kappen som tilsier at viruset er forenlig eller ikke-forenlig med vertsplanten). Et eksempel ble vist av Farinelli og kollegaer (1992) hvor planter som uttrykte kappeproteiner av N stammen potetvirus Y potyvirus (PNVY-N), når infisert med en annen stamme PVY-O, produserte infeksiøse partikler av begge slag. Et annet eksempel ble beskrevet av Lecoq og kollegaer (1993) hvor *Nicotiana benthamiana* planter som uttrykte kappeprotein til en bladlusoverført stamme av «plum pox potyvirus» (PPV) ble infisert med en bladlus-ikke-overført «zucchini yellow mosaic potyvirus» (ZYMV-NAT). Et defekt kappeprotein var ansvarlig for at ikke ZYMV-stammen kunne overføres via bladlus. Viruspartikler ble produsert som viste seg å inneholde ZYMV-NAT genomet innkapslet i både PPV og ZYMV-NAT kappeprotein, og resultatet var at ZYMV da kunne overføres via bladlus.

Modifisering av planter som medfører bedre overlevelse overfor stressfaktorer som tørke, saltholdighet, kulde osv, antas å kunne medføre de største økologiske konsekvensene. Et enkelt hypotetisk eksempel skissert av Rissler & Mellon (1996) tar for seg mulige konsekvenser ved genmodifisert salttolerant ris; Risen er plantet i et våtmarksom-

rådet nær sjøen og det antas at risen invaderer saltvanns-økosystemet og utkonkurrerer naturlig forekommende salttolerante arter. En konsekvens av at de naturlige populasjonene forsvinner, er at andre organismer typisk assosiert med disse som alger, mikroorganismer, insekter, andre artropoder, amfibier og fugler ikke vil være kompatible med den invaderende risen og vil dermed forsvinne de også. Andre organismer, som vil være nye for dette økosystemet vil etter hvert finne seg til rette i dette nye risdominerte økosystemet, mens det forrige økosystemet vil være borte.

3.3 Overvåkingsstrategi for GMP

Metoder og erfaring fra økologisk genetikk, planteøkologi (deriblant muligheter for kryssing med ville slektninger) og eksperimentelle foredlingsstrategier er av verdi for overvåking av genmodifiserte planter. Det eksisterer god kunnskap om både biologi og adferd til de fleste landbruksplanter, men om en ut ifra denne kunnskapen kan forutse hvordan en plante vil oppføre seg ved tilføring av nye egenskaper, kommer an på egenskapen og dennes innflytelse på plantens fenotype.

I Norge vil forutsetninger for vurdering av sikkerhet rundt ulike GMPer knytte seg til plantens bruksområde og egenskaper. Krav for innesluttet bruk av genmodifiserte planter er formulert i Genteknologiloven (1993) og omfatter:

- 1) Vurdering av mulighetene for etablering og spredning av planten dersom pollen, frø, planter eller planterester slipper ut (fokusert på norsk natur)
- 2) Vurdering av mulig risiko i landbrukssammenheng fokusert på potensialet for planten som ugress, spredning av ugresssegenskaper, risiko for spredning av plantepatogener og interaksjon med andre planter
- 3) Vurdering av helserisiko eller andre negative konsekvenser

Forskrift om innesluttet bruk av GMP er under utarbeidelse. Etter Genteknologiloven er det Miljøverndepartementet som har ansvar for tilsyn med lovens utsettelsesbestemmelser, hvor Direktoratet for naturforvaltning er ansvarlig for faglig rådgivning i saksbehandlingen når det gjelder planter og dyr. Foreløpig vurderes hver enkelt sak for seg etter at en konsekvensutredning er foretatt.

Foreløpig er det ingen klare retningslinjer om hvilke strategier som skal ligge til grunn for overvåking av ulike grupper av transgene planter. Standarder er under utarbeidelse av Europeisk Standardiseringsforbund, og ifølge en slik standard (CEN-dokumentet, WI 55, 1995) bør det fokuseres på følgende ved utarbeidelse av en overvåkingsprotokoll:

- 1) at omfanget av prøvetakingen tilfredsstillende antatte overvåkingsmål;
- 2) at omfanget av overvåkingen tilfredsstillende de eksperimentelle forutsetningene m.h.t. tidsskala, prøvetakingskala og prøvetakingsområde;

- 3) at plantetypens adferd med hensyn på pollinering og pollen spredning, frøspredning, konkurransedyktighet og evnen til å utvikle seg til ugress er kjent;
- 4) at det utvalgte overvåkingsområdet slik som utsettingsstedet og og/eller potensielle spredningsområder er relevant;
- 5) at det velges ut passende metoder for overvåking av planten involvert i eksperimentet

Det er imidlertid verdt å merke seg at disse standardene er utviklet for bruk i forskning og ikke for å ivareta miljøhensyn og miljøovervåking som f.eks. genspredning til naturmiljøet og hybridisering med ville slektninger.

Faktorer og kriterier som påvirker om overvåkingsprotokollen er passende avhenger blant annet av formålet med overvåkingen. Dette kan være deteksjon, identifikasjon, undersøkelse med hensyn på stabilitet/genuttrykk, undersøkelse med hensyn på effekt av modifikasjon, rask screening eller detaljert undersøkelse, kvantitativt eller kvalitativt utgangspunkt. Egenskaper som skal overvåkes, kan være enten tilstedeværelse av et gen, uttrykk av genprodukt, den genmodifiserte planten og/eller kjente eller ukjente mulige berørte populasjoner. Hovedfaktorer som har innvirkning på det eksperimentelle feltet er: miljøbetingelser, tilstedeværelse av mulige planteetere som kan spise den transgene planten, tilstedeværelse av organismer som kan være vektorer for det genetiske materiale og/eller tilstedeværelse av kompatible arter som den transgene planten kan krysse seg med innen et potensielt spredningsområde.

3.4 Overvåkingsmetoder for GMP

Følgende krav bør ifølge CEN-dokumentet, WI 55 (1995), stilles til selve overvåkingsmetodene:

- 1) Metodene bør gi resultater for tilfredsstillende besvaring av spørsmålene stilt i utgangspunktet
- 2) Relevante ressurser for eksperimentet er tilstede
- 3) Metoden er selektiv nok til å skille en bestemt hendelse fra en kompleks blanding uten innvirkning fra andre komponenter i blandingen
- 4) Metoden er spesifikk
- 5) Metodene er reproduerbare selv under forandrede betingelser
- 6) Metoden kan repeteres uten at resultatene endres
- 7) Metoden er til å stoles på
- 8) Metoden er gjennomførbar i praksis
- 9) Begrensningene ved metoden er kjente
- 10) Det fastslås hvilket nedre nivå av hendelsen som kan detekteres med sikkerhet

Målsetningen ved overvåkingen, hvilke spørsmål som stilles og hvilke metoder som bør benyttes, bestemmes gjennom en risikovurdering. Temaet er belyst i forhold til de samme tre punktene som for risikovurderinger diskutert tidligere i kapitlet.

At transgene planter kan bli ugress eller invasjonedyktige i naturlige habitater

Det er viktig her å fokusere på om tilstedeværelse av transgenet i planten er en belastning for planten eller om det har uforutsett innvirkning som kan føre til økt invasjonspotensiale. Det er økende beviser for at plantene har metabolsk kapasitet til overs som gjør dem i stand til å bære nøytrale gener som f.eks. antibiotikaresistens- og herbicidresistensgener under ikke-agronomiske betingelser. Spredningen av transgener i naturlige populasjoner kan modelleres ved data fra markører som f.eks. isozymer, RFLPer, mikro- eller minisatellitter som antas å være nøytrale. Som nevnt tidligere, er det foreløpig lite som tyder på at gener som herbicidresistens, fører til økt tilpasning i naturlige miljøer. Imidlertid er det uvisst om uforutsette pleiotrope effekter av slike gener kan være fordelaktig for plantene (Raybold & Gray, 1994).

For å belyse temaet er det viktig med mest mulig informasjon om den genmodifiserte planten før utsetting for lettere å kunne forutsi plantens oppførsel og mulige påvirkninger på miljøet ved en utsetting. Informasjonen bør omfatte grundige opplysninger om både foreldreplanten og hvordan den transgene planten skiller seg fra denne. Overvåking av grunnleggende biologiske egenskaper kan være nødvendig i startfasen av en overvåking for så å kunne bestemme eventuelle tidsrammer for en fullstendig overvåking. Faktorer det da er aktuelt å se på er relatert til frøet (produksjon, vekt/størrelse, overlevelse, spiring, spredning), kimplanten (konkurrans, overlevelse, vekst), voksende plante (størrelse, vekst, konkurranse), reproduksjon (blomstring og pollen-spredning), genom (genotype, genetiske markører, polymorfismer, kromosomer, proteiner, DNA, RNA) (Kjellsson & Simonsen, 1994).

Ofte er utgangspunktet før utsetting at forhåndskunnskaper foreligger med hensyn på den aktuelle genmodifiserte planten. Det vil imidlertid bli aktuelt med evalueringsprosesser med jevne mellomrom for overvåking av eventuelle endringer. I denne sammenheng er det viktig med en nøye karakterisering av utsettingsområdet før og etter introduksjon av den transgene arten for å kunne si noe om disse eventuelle forandringene. Aktuelle metoder som er brukbare til dette formålet er beskrevet i kapittel 2.

At plantenes manipulerte gener vil kunne overføres via pollen til ville slektninger og at hybrid avkommet blir mer ugressaktig eller mer invasjonedyktig.

Landbruksplanter kan deles inn i fakultative og obligate etter evnen til overlevelse i naturlige habitater (Sukopp & Sukopp, 1993). Overlevelse av en transgen plante vil i stor grad avhenge av hvilken gruppe av de to den tilhører. Imidlertid er det uvisst om hybridisering og introgresjon mellom obligate landbruksplanter og ville arter kan fjerne eller tilføye trekk som kan endre plantens karakter til en mer fakultativ form (Raybold & Gray, 1994).

Genetisk modifikasjon kan påvirke hybriddannelse enten ved å endre frekvensen for denne type hendelse, eller ved å endre omfang av seksuelt compatible arter. Det er imidlertid økende indikasjon på at modifikasjon har liten påvirkning på slike faktorer (Raybould & Gray, 1994). Hybriddannelse mellom den transgene planten og ikke-modifiserte planter av samme art eller med ville slektinger avhenger av om disse artene er tilstede i utsettingsområdet og / eller i den utstrekning pollen eller frø kan spres. Den viktigste faktoren er bevegelse av pollen til reseptive arr. Pollenproduksjon og armodning i GMPen og vill slekting må være sammenfallende for at et hybrid skal kunne dannes (Raybould & Gray, 1994). Pollenspredning beskrives i de fleste tilfeller ut fra en sterkt «leptokurtic» fordeling fra kildeplanten, hvor det meste av pollenkorner enten beveges langt fra kilden eller kun få meter (Levin, 1981). Dette er stadfestet i flere arbeid med transgene planter (se ref. i Raybould & Gray, 1994). Det er imidlertid også dokumentert spredning som overskrider 1000 m (Ellstrand & Hoffman, 1990). Gjennom en nøye risikovurdering av en spesifikk GMP, vil trolig kunnskap om spredningsdistansen av pollen og frø fra planten være tilgjengelig. Det er da viktig før en eventuell utsetting å foreta en kartlegging av arter i det aktuelle området for om mulig å kunne finne arter som kunne være gjenstand for hybriddannelse og også kunne karakterisere populasjonsdynamikken til en slik art etter at en utsetting er foretatt.

Populasjonsdynamikk i sammenheng med overvåking av GMP inkluderer studier av ulike livsprosesser og tetthetsavhengige faktorer som har innvirkning på overlevelse, vekst og spredning av en plantepopulasjon. Den seksuelle reproduksjonsevne til individuelle planter vil sterkt påvirke populasjonsstruktur og invasjonsevne. I relasjon til GMPer og eventuelle hybridpopulasjoner er det viktig å observere mulige populasjonsendringer over tid for å kunne estimere potensiell økning i invasjonspotensial. Metoder her (beskrevet under økologiske metoder i kapittel 2) som beskriver studier av økosystem, samfunnsstruktur og samfunnsdynamikk kan inngå i denne sammenhengen i tillegg til metoder for påvisning av forandring i genetisk sammensetning innen en populasjon som f.eks. ved immunologiske metoder (2.2 J,K,L), ved isozymelektroforese (2.3 Q), ved RAPD (random amplified polymorphic DNA) (2.3 R) eller RFLP (restriction fragment length polymorphism) (2.3 S). Sekvensering av baser er en annen metode som kan benyttes, men den er tidkrevende. PCR (polymerase chain reaction) (2.2 G) alene, kombinert med sekvensering eller med restriksjonszymer, kan være effektive redskaper for å detektere variasjoner på DNA-nivå (Jain, 1993).

Ved å følge et samfunn over tid kan strukturelle dynamiske endringer i samfunnet reflektere endringer i biodiversitet. Utbredelsen av et plantesamfunn synes å være sterkt påvirket av konkurranseevnen til hver art. Strukturen i et samfunn er viktig for potensiell etablering og invasjon av nye arter i samfunnet og dermed for den potensielle utsikten i så henseende for en introdusert GMP. Muligheten for demografiske svingninger og økt vekst til en transgen

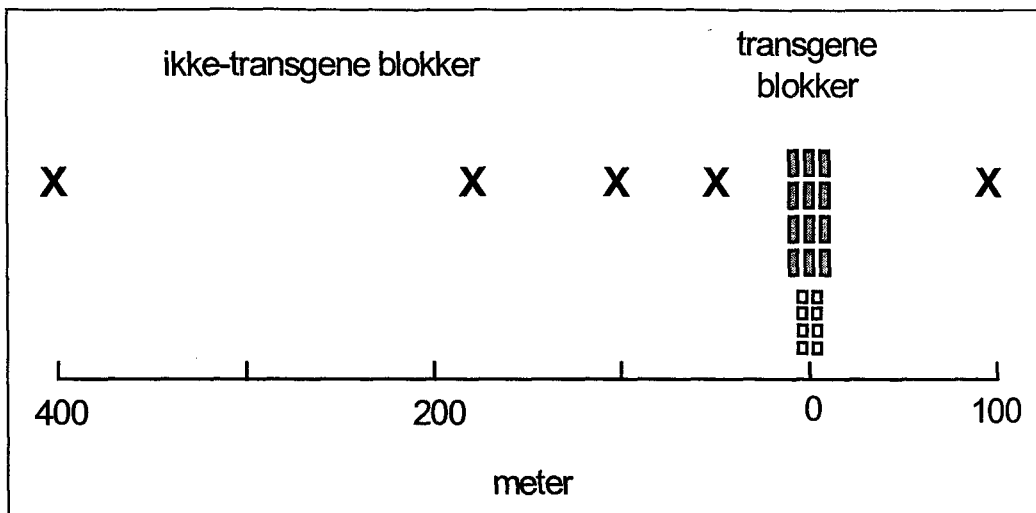
populasjon kan til en viss grad estimeres ved bruk av simuleringmodeller.

Analytiske modeller kan også brukes for å forutsi spredning av organismer eller gener. Det kan vises at «asymptotic rate of spread» ARS målt i distanse / tid av et introdusert gen som antas å oppføre seg som en vandrende bølge, blir $2\sqrt{Dm}$ hvor D er diffusjonskoeffisienten og m er seleksjonsintensiteten til fordel for mutanten (Manasse & Kareiva, 1991). Manasse og Kareiva søker å bruke data fra feltutsettinger for å forutsi omfanget av en mulig spredningsrate. De er spesielt interessert i å undersøke kortsiktig spredning under variable betingelser og sammenlikne antakelser fra både felteksperimenter og analytiske resultater. I den sammenheng har de vurdert to felteksperimenter i forhold til bruk i videre simulering av spredningsraten. Det ene eksperimentet var en feltutsetting av transgen raps utført av Monsanto Co. og Agriculture Canada og eksperimentoppsettet er illustrert i figur 5.

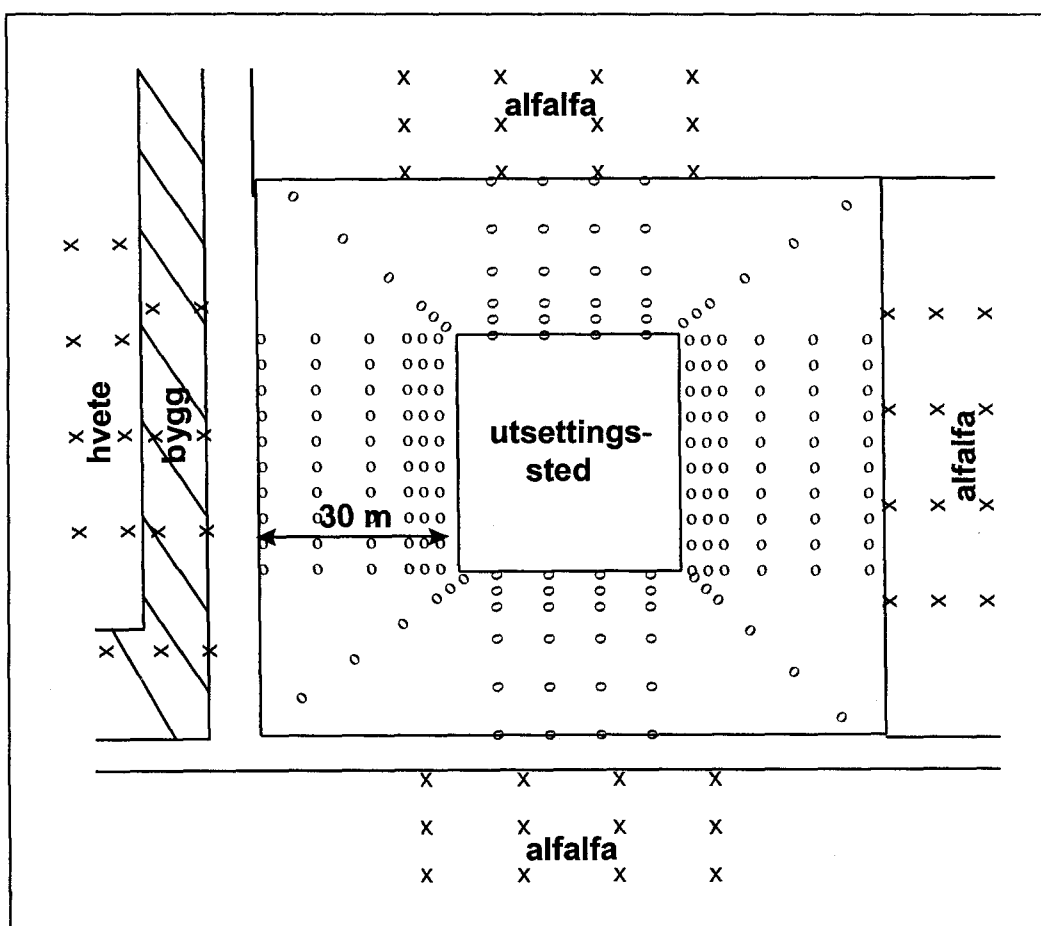
De fleste av de transgene rapsplantene hadde minst en innsatt kopi av transgenet for herbicidresistensen glyfosat (Roundup) som ble uttrykt dominant i planten. Ikke-transgene planter dør kort tid etter sprøyting, lenge før modning. I miljø hvor Roundup blir brukt er seleksjonen veldig sterk til fordel for den transgene planten. Hvis genet skulle «unnslippe» og bli inkorporert i genomet til et ugress beslektet med rapsen, ville naturlig seleksjon favorisere spredning av transgene gjennom populasjoner av ugress. Monsanto utførte eksperimentene for å bedømme sjansene for en slik «unnslippelse» via pollenspredning (og for å evaluere graden av herbicidresistens i felt). Ikke-transgene planter som vokste i blokker utenfor det sentrale feltet ble ikke sprøytet med herbicid og kunne produsere frø som så ble testet for herbicidresistens. 10 000 frø ble samlet fra hver blokk med ikke-transgene planter og spiretest ble utført på medium med 2.5 mM glyfosat. Tilstedeværelse av transgen ble stadfestet dersom planten overlevde spiring. Monsanto rapporterte krysningssrate på 0.022 % i blokken 50 m fra kilden og 0.011 % i hver av blokkene 100 m fra. Selv om den observerte genspredningen var mellom landbruksplanter, var dette en god modell for spredning til ugresspopulasjoner fordi raps er veldig lik ugress som f.eks. *B. campestris*, hvor krysning skjer fritt. Ifølge Manasse & Kareiva er imidlertid konstruksjonen ufullstendig for å forutsi spredningsrate for glyfosat fordi deteksjon av krysning ved bare to distanser fra den transgene kildeplanter ikke gir mulighet til å karakterisere spredningsfunksjon som er nøkkelen til antakelsen om spredning. Et bedre prøvetakingsoppsett ifølge Manasse & Kareiva ville inneha flere ikke-transgene felter ved ulike posisjoner innenfor 50 m, samtidig som et fullstendig ikke-transgent transekt hvor mulig krysning fra de transgene plantene kunne detekteres, burde gå i flere retninger.

Figur 6 illustrerer feltutsetting av isminus bakterien *Pseudomonas syringae* utført av Lindlow og kollegaer (1989) illustrert i Manasse & Kareiva (1991). I motsetning til eksperimentet beskrevet over, representerer dette oppsettet et mye bedre eksempel på spredning av en GMO fordi prøve-

Figur 5. Prøvetakingsstrategi for prøveforsøk av transgen raps og transektorer av ikke-transgene blokker for å måle genspredning (figur er gjengitt fra Manasse & Kareiva, 1991 hvor forsøket utført av Monsanto Co. og Agriculture Canada er beskrevet). Ikke-transgene blokker er gjengitt med X'er. Genspredning ble vurdert ved innsamling og analyse av frø fra ikke-transgene felter for egenskapen herbicidresistens (som var det genet som var satt inn i rapsplantene).



Figur 6. Prøvetakingsstrategi for feltutslipp av transgen bakterie (Manasse & Kareiva, 1991). Illustrasjonen viser utslippssted for en transgen isminus bakterie med omkringliggende prøvetakingsstasjoner; o'ene representerer petriokåler og bønneplante-«feller» og X'ene indikerer lokaliteter hvor alfalfa, bygg eller hvete ble kultivert for sjekking av tilstedeværelse av isminus bakterie.



takingsstrategien gir tilstrekkelige resultater for å kunne simulere spredningen. Fordeling og tetthet av bakterien ble estimert ved kultivering av bakterieskåler plassert på bakken eller fra potteplantede bønneplanter som fungerte som «feller». Bakterieprøver ble i tillegg samlet fra vegetasjonen rundt av alfalfa, hvete og bygg i felt 30 m eller lenger borte. Prøver ble samlet på ulike tidspunkt slik at prelimenære indikasjoner av spredningshastighet kunne oppnås fra dette feltforsøket.

At transgene planter vil gi direkte skade på mennesker, husdyr eller andre naturlig forekommende organismer

Om en GMP kan ha helsemessige konsekvenser for mennesker eller dyr avhenger av hvilken type plante det er snakk om, hvor de stedfremmede genene stammer fra, og i hvilken form planten eller planteproduktet kommer i interaksjon med mennesker eller dyr. Problemstillinger som er nødvendig å vurdere i hvert enkelt tilfelle er knyttet til allergen virkning på organismer eller effekt på omkring-

liggende miljø medregnet potensiell horisontal genoverføring til mikroorganismer i jord. Se nærmere utredning under del 3.5.

3.5 Eksempel på overvåking av en GMP med raps som utgangspunkt

Raps (*Brassica napus*) tilhører korsblomstfamilien og er en oljeproduserende plante. Utvikling av transformasjons-systemer har gjort det mulig for produksjon av modifiserte rapslinjer med transgener som herbicidresistens, insektresistens, økt metionin-innhold i frø, hannsterilitet, tungmetalltoleranse og antibiotikaresistens. Raps er valgt som eksempel her fordi: 1) Raps er den viktigste oljeproduserende landbruksplante i Europa, Canada og Japan, og 2) raps er kjent for å ha nære slektninger i naturen, slik at faren er tilstede for dannelse av hybrider.

Som nevnt før er det tre områder som spesielt har skapt bekymring relatert til utsetting av genmodifiserte planter (Crawley et al. 1993):

- 1) At GM-planten utvikles til ugress og/eller invaderer naturlige habitater
- 2) At GM-planten overfører transgener til nærliggende kommersielle eller naturlige populasjoner hvor avkommet blir mer ugressaktig eller invasjonedyktig
- 3) At GM-planten er en direkte helsefare for mennesker eller dyr

Nedenfor vil overvåking av raps diskuteres med bakgrunn i disse punktene.

At GM-rapsen utvikles til ugress og/eller invaderer naturlige habitater

Det er vanskelig å kunne forutse om en plante vil ha økt sjanse til å fungere som ugress i et gitt miljø. Faktorer som har innvirkning på evnen til etablering, kolonisering og spredning er rask veksthastighet, høyere frøproduksjon, økt frøoverlevelse, forbedret vinteroverlevelse og økt resistens overfor plantepatogener eller andre pestformer. GM-rapsens evne til å spre seg som ugress eller bli mer invasjonedyktig i et utsettingsmiljø, avhenger av forandringer som har funnet sted i avkommet ved tilført genetisk materiale. Utgangspunktet for en bedømmelse må være en sammenlikning av foreldreplanten og den genmodifiserte planten over tid. Spørsmål som det må taes stilling til, er om de tilførte genene kan øke rapsens tilpasningsdyktighet og konkurranseevne og om GM-rapsens fenotype kan forandres over tid pga. ustabilitet forbundet med det innsatte genetiske materialet.

Om egenskapen som er tilført en GMO vil ha innvirkning på invasjons- og konkurranseevne, avhenger av hvilken forandring som er oppstått, noe som krever spesiell vurdering i hvert enkelt tilfelle. Her vil plantens evne avhenge av om genet / genene som er satt inn er nøytrale eller gir planten en selektiv fordel. Herbicidresistens i raps vil trolig ikke føre til økt «fitness» verken for den opprinnelige GM-rapsen eller eventuelle hybridplanter utenfor området som er sprøytet med ugressmiddelet, fordi egenskapen ikke da vil medføre en fordel for planten. Det vil imidlertid ha innvirkning over tid på plantefeltet ved at herbicidtolerante planter som ikke er ønsket, blir vanskelig å fjerne. Dette kan føre til at GM-rapsen må tilføres nye herbicidtolerante gener for bekjempelse av ugress hvilket igjen kan føre til utvikling av multiresistent ugress (Jørgensen, 1994).

Insektresistens i planter har logisk sett innvirkning på «fitness» i planten ved at skadelig påvirkning fra insekter, er redusert (Fitt, 1994). I motsetning til herbicidtoleranse, vil insekttoleransegener kunne vedvare i plantepopulasjoner utenfor feltet ved at disse stadig er i interaksjon med insektet som planten er resistent overfor. Med andre ord eksisterer det et selektivt press for opprettholdelse av egenskapen. Modifisering av toleranse i GM-rapsen overfor ulike stressfaktorer som kulde, tørke, saltholdighet osv. antas å kunne øke «fitness» da deres hovedhensikt er å øke plantenes levedyktighet i visse områder (jf. hypotetisk eksempel om salttolerante risplanter). Planter med slik økt toleranse bør derfor vurderes ekstra nøye m.h.p. økt konkurranse- og invasjonspotensial. Naturlig forekommende raps finnes i størst grad i «menneskeforstyrrede» områder som f.eks. beitemark, parker, vegkanter o.l. (Jørgensen, 1994). Det er imidlertid mulig at toleranse overfor stressfaktorer kan endre dette slik at planten kan etablere levedyktige populasjoner i «ikke-forstyrrede» habitater.

Kan endret genetisk stabilitet ved dannelse av rekombinant DNA i seg selv ha effekt på «fitness»? Dette er et omdiskutert spørsmål fordi det opprinnelig ble påstått at GMOer ofte har redusert «fitness» på grunn av den energi-relaterte byrden det er å opprettholde og uttrykke rekombinant DNA («excess baggage hypothesis», Regal, 1988, Crawley et al. 1993), men dette har vist seg å ikke gjelde for planter, som kan opptre normalt selv ved introduksjon av helt nye metabolske prosesser (Regal, 1988). Selektive ulemper kan motarbeides ved tilleggsmutasjoner som kan øke konkurranseevnen. Andre årsaker til variasjon som uforutsett kan påvirke «fitness» kan være:

- 1) Variasjoner i transgen ekspresjon som følge av transgenets lokalisering og antall kopier.
- 2) Pleiotrope effekter, dvs. i hvilken grad transgenet kan ha innvirkning på uttrykk av andre planteegenskaper som ikke er forventet å være assosiert med transgenet (Dale & McPartlan, 1992).

- 3) Transgen ustabilitet som påvirker uttrykk av transgenet kan forekomme under vegetativ utvikling eller over generasjoner ved seksuell reproduksjon (Dale et al. 1994).
- 4) Somaklonale effekter, dvs variasjoner observert i forbindelse med antall og type tilfeldige fenotypiske og genotypiske variasjoner assosiert med ulike trinn i transformasjonsprosessen (Dale et al. 1994).
- 5) Miljø kan virke på transgen ekspresjon og stabilitet. (Her er blomsterfarge i petunia et godt eksempel hvor interaksjon med miljø påvirket blomsterfargen på en uforutsett måte i den transgene planten; Meyer et al. 1992).
- 6) Undertrykkelse og inaktivering av naturlige gener eller modifisering av andre transgener (Dale et al. 1994).

Ved overvåking av utsatt GM-raps vil en som nevnt før for GM-planter, måtte gå ut ifra allerede eksisterende kunnskaper om både foreldreplante og genmodifisert variant. Kortsiktig vurdering av invasjon- og konkurransepotensial vil da til en viss grad være klarlagt. I motsetning vil langsiktige vurderinger være vanskeligere å vurdere på bakgrunn av faktorene nevnt ovenfor, og vil kreve en nøye planlagt overvåking over en viss tidsperiode. Overvåkingen må bygge på både økologisk og molekylærbiologisk metodikk. Hvor omfattende prøvetaking som er nødvendig avhenger av størrelsen på populasjonen. I dette tilfelle blir det da den plantede GM-raps populasjonen og hvordan denne er sammensatt. Spørsmål en bør stille seg er om de utsatte plantene er fra samme stamme genmodifiserte plantelinje slik at det eksisterer genetisk homogenitet, eller om det er raps fra flere plantelinjer slik at de på en måte kan sees på som en populasjon med genetisk variasjon. I begge tilfeller kan det tas utgangspunkt i at poenget med undersøkelsen er å kunne detektere en potensiell endring over tid og at denne kan sammenliknes med frekvensen av en forekomst i en gruppe. I det første tilfellet kan en ut ifra totalt antall utsatte individer beregne antall prøver det ville være nødvendig å analysere.

At GM-rapsen overfører transgener til nærliggende kommersielle eller naturlige populasjoner hvor avkommet blir mer ugressaktig eller invasjonedyktig

For å kunne forutse mulig overføring av transgener fra et felt med GM-raps til nærliggende kommersielle eller naturlige populasjoner, er det en forutsetning med kunnskap om spredning av pollen, frø eller vegetative vekstdele og opplysning om forekomst og fordeling av andre rapspopulasjoner eller andre beslektede arter i utsettingsområdet. Rognli (1994) tar utgangspunkt i en såkalt «spredningskode» (D_{pdf}) til bruk for vurdering av risiko for genspredning fra kultiverte planter til vill flora. Spredningskoden er utviklet av de Vries et al. (1992) hvor D_p = spontan genspredning med pollen, D_d = spontan genspredning med frø og vegetative vekstdele (diasporer), D_f = artens forekomst i norsk flora. Oljeraps (*Brassica napus olifera*) vurderes til en D_{pdf} verdi på 1.2.2,

[$D_p = 1$; betyr at «kulturarten» har ville slektninger av samme slekt i norsk flora. Hybridisering innen slekten mellom dyrket og vill art er ikke observert i naturen. Kunstig hybridisering mellom slike arter har ikke gitt levedyktig avkom, dvs. ingen virkning på norsk flora, $D_d = 2$; betyr at kulturarten er registrert utenfor dyrking. Arten kan reproducere seg vegetativt og/eller etablere seg, og overleve en generasjon i naturen, dvs. liten til middels virkning på norsk flora, $D_f = 2$; betyr at kulturarten eller den nærmeste slektningen hører til vår flora, og har en mindre til ganske vanlig forekomst, dvs. liten til middels virkning på vill flora] og tolkes av Rognli (1994) til å bety at utsatt raps vil ha liten virkning på vill flora. Det synes imidlertid å være uenighet om dette, da Jørgensen (1994) hevder at spontan hybridisering mellom raps og *B. campestris*, åkerkål (synonym *B. rapa*, ryps) er alminnelig, og at naturlige hybrider kan forekomme i høy frekvens i jordbrukslandskap (Jørgensen & Andersen, 1994). Hybridene kan krysse seg tilbake til *B. campestris*, og Jørgensen og kollegaer har innen naturlige populasjoner av åkerkål funnet planter med raps-spesifikke markører. Uansett grad av risiko er det viktig med en veloverveid overvåkingsstrategi slik at så liten spredning som mulig vil forekomme.

Ville former av raps er ikke kjent. Arten stammer antakelig fra en interspesifikk hybridisering mellom *B. rapa* (åkerkål) X *B. oleraceae* (kål). Raps er i stor grad selvbefruktende, og graden av krysspollinering varierer mellom 5-55 % under feltbetingelser (se ref. i Timmons, 1995). Krysspollinering skyldes vind og insekter (honingbier). Hos oss forekommer raps både dyrket og forvillet nord til Velfjord (Lid, 1985). Mange slekter innen korsblomster synes å ha betydelig genom-fellesskap. Så langt er slektskap mellom *Brassica* og andre slekter ikke klarlagt (Jørgensen, 1994). At genom-fellesskapet innen *Brassica*-artene er såpass omfattende er kanskje en av grunnene til at *B. napus* har vist seg å kunne hybridisere med en rekke andre arter. Dokumenterte tilfeller er som allerede nevnt åkerkål *B. rapa* (Jørgensen, 1994; Lefol et al. 1995; Timmons et al. 1995), narresennep *Hirschfeldia incana* (Lefol et al. 1995; Timmons et al. 1995), åkerredikk *Raphanus raphanistrum* (Dietz et al. 1995; Timmons et al. 1995), kål *B. oleracea* (Dietz et al. 1993), svartsennep *B. nigra* (Dietz et al. 1993), åkersennep *Sinapis arvensis* (Dietz et al. 1993) og sareptasennep *B. juncea* (Mitten & Lindemann, 1994).

Spredning av et transgen fra et gitt punkt til omkringliggende populasjoner avhenger av evolusjonskrefter som migrasjon, seleksjon og genstrøm og genetisk drift. I hvilken grad og hvor hurtig en slik prosess går er vanskelig å estimere, men det er vist at selv en liten selektiv fordel er tilstrekkelig til at frekvensen av transgenet i en naturlig populasjon vil kunne øke hvis den utsatte populasjonen med transgen er stor nok (Tømmerås et al. 1996). F.eks. i et miljø hvor et herbicid (som f.eks. glyfosat) blir påført herbicidresistente rapsplanter, vil seleksjonen til fordel for transgenet (som ofte er dominant) være veldig sterkt. Selv om slik seleksjon kan synes irrelevant for landbruksplanter med årlig innhøsting som raps, ville genet hvis det «unnslipp» og ble inkorporert i genomet til en naturlig *Brassica*-

art, kunne spres ved at transgenet ble favorisert ved seleksjon. I en slik spredningsprosess vil frekvensen av transgenet i løpet av de første generasjonene bare bestemmes av en enveis migrasjonsprosess som en «bølgefront». Effekten av seleksjon vil bare bli synlig mye senere når «bølgen» er adskilt fra resten. Dette medfører at kort-tidsovervåking som f.eks. strekker seg over 10 generasjoner, er utilstrekkelig for oppsamling av nok data for å kunne gi tilstrekkelig informasjon om kritiske parametre som f.eks. seleksjonskoeffisienten som virker på transgenet (Tømmerås et al. 1996). Her forutsettes det at den transgene populasjonen opprettholdes. Ved en engangsette vil seleksjonen kunne oppdages på et tidligere tidspunkt.

Ved overvåking av et utsettingsfelt for GM-raps kunne det være aktuelt med kartlegging av felter med kryssbare planter i utstrekning bestemt av distansen på forventet pollen-spredning. Det er her viktig å måle distansen som skiller ville populasjoner og landbruksfelt, og størrelsen på de forskjellige populasjonene som et ledd i overvåking av populasjonsdynamiske endringer. Det kunne være aktuelt å måle pollentetthet i varierende avstand fra kilden (dvs. utsettingsfeltet). Dette kunne gjøres som forklart av Timmons et al. (1995) hvor «fellene» var lokalisert på et lineært transekt i samme retning som pågående vind 0 m, 100 m og 360 m fra feltet. For å sjekke langdistanse pollenbevegelse kunne en i tillegg inkludere en volumetrisk «felle» 10 m over bakken 1-2 km fra utsettingsfeltet. Timmons et al. (1995) foretok målinger over to blomstringssesonger, hver 24 timer, og beregnet så middelverdi av pollenkorner per m³ luft. Hvis dette ikke er gjort av produsenten av den aktuelle GM-planten på forhånd, ville det være aktuelt å foreta slike målinger over noen år i et bestemt utsettingsområde for å få en oversikt over pollen-spredning.

For å undersøke evnen til langdistanse hybridisering kan en sette ut planter som kan fange opp pollen og danne hybrider i bestemte avstander fra utsettingsfeltet. Frø fra disse plantene kan så analyseres og mulig hybridisering med GM-rapsen kan stadfestes. Dette kan gjøres enten ved telling av antall kromosomer (Timmons et al. 1995) hvis kromosomtallet i den transgene rapsen og mottakerplanten er forskjellige, ved bruk av morfologiske karakteristika hvis hybridplanten er forskjellig fra foreldreplantene, eller ved molekylærbiologiske metoder som f.eks. isoenzymelektroforese, RAPD, RFLP, PCR eller dot-blot analyse (skissert i kapittel 2).

Utsprekningen på området som bør overvåkes rundt utsettingsfeltet, bør bygge på data om spredningsdistansen for pollen. Distansen på hvor langt pollen kan spre seg varierer fra art til art, generelt 100 m eller mindre for selvpollinerende planter til 1000 m eller mer for sterkt krysspollinerende planter (Crawley et al. 1993). M.h.t. raps er det rapportert flere undersøkelser for spredning av pollen med vind. Dataene viser imidlertid stor variasjon fra reduksjon av luftbåren pollen 100 m fra kilden på 2-11 % (McCartney & Lacey, 1991) sammenliknet med 27-69 % dokumentert av Timmons et al. (1994). Genstrømnivåer på 0.022 %

(Manasse & Kareiva, 1991) og 0.00033 % (Scheffler et al. 1993) er observert ved henholdsvis 47 m og 50 m sammenliknet med 0.08 og 1.2 % målt henholdsvis 2.5 og 1.5 km fra kilden i et annet tilfelle (Timmons et al. 1995). Variasjonen antas å ha sammenheng med bl.a. størrelsen på feltene. Det oppfordres av Timmons og kollegaer (1995) å utøve varsomhet m.h.t. å ekstrapolere informasjon fra småskala til storskala utsetninger.

Hvis en antar at pollen kan spres opp til en km, bør et område på en km radius fra utsettingsfeltet kartlegges for tilstedeværelse av populasjoner med kryssbare slektninger (disse må ha sammenfallende blomstringstid i tillegg til kryssningskompatibilitet). Antall individer innen hver populasjon bør beregnes slik at prøvetakingen kan gjøres så presis som mulig. **Figur 7** er en grov skisse over prøvetaking i et felt med genmodifisert raps. Figuren bygger på to modeller; utarbeidet av Nurminiemi og kollegaer (1997) og Monsanto (Manasse & Kareiva 1994) med de modifikasjonene som Manasse & Kareiva foreslo til forbedring av «Monsanto»-modellen beskrevet i del 3.4.

At GM-rapsen er en direkte helsefare for mennesker eller dyr

Det er trolig ingen betydelig risiko for at GM-rapsen kan ha alvorlige helsemessige konsekvenser for hverken mennesker eller dyr, men dette avhenger selvfølgelig av hvilke gener som er satt inn. Potensielle konsekvenser det vil være nødvendig å vurdere er:

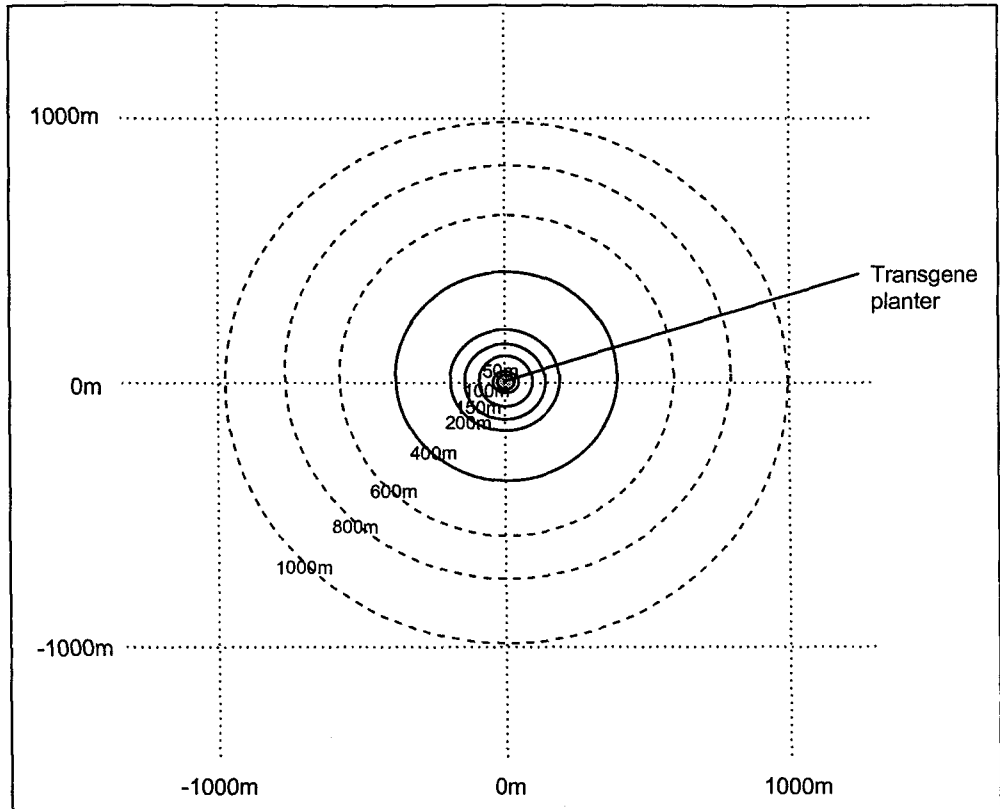
- 1) Allergen virkning på menneskekroppen ved inntak av produktet som stammer fra den genmodifiserte rapsen eller ved eksponering overfor pollen;
- 2) produksjon av toksiske produkter i f.eks. oljen;
- 3) potensiell effekt av transgenet på fauna omkring utsettingsstedet;
- 4) indirekte effekt ved økt andel antibiotikaresistensgener i miljøet.

Vurdering av det allergene potensialet til mat produsert fra genmodifiserte planter burde ifølge Fuchs og Astwood (1996) fokusere på tre ting:

- 1) kilden som transgenet kommer fra;
- 2) fysiokjemiske og biologiske sammenlikninger av det transgene genproduktet (proteinene) med vanlige kjente allergene proteiner;
- 3) potensielle forandringer innen de allerede tilstedeværende allergenene til vertsplanten (hvis disse er tilstede).

Stabiliteten til proteiner overfor ulike prosesseringsaktiviteter er viktig ved vurdering av allergent potensiale. Raps blir benyttet til produksjon av olje både i fôr, menneskemat, og maskinolje. Studier av oljer fra ulike planter, inkludert soyabønner, peanøtter og solsikke, viste ingen allergen reaksjon hos individer allergisk overfor disse produktene

Figur 7. Prøvetakingsmodell for overvåking av pollenspredning fra genmodifisert raps basert på data fra Nurminiemi og kollegaer (1997) og Manasse & Kareiva (1994). Feltet er delt opp i konsentriske ringer rundt feltet med transgene planter. Prøvetaking av aktuelle naturlige planter hvor transgenet kan ha spredt seg bør skje tilfeldig m.h.p. retning innen de ulike feltene. Antall prøver innen hver sirkel bestemmes statistisk ut ifra forventet spredning fra simuleringsmodeller. Det er viktig som Manasse & Kareiva påpekte med flere prøver tatt innenfor 50 m fra spredningskilden. Prøvetaking er her hyppigere innenfor 400 m (full linje) og sjeldnere utover i feltet.



i mindre prosessert tilstand, noe som ikke er overraskende tatt i betraktning det lave proteinnivået i olje utvunnet fra landbruksplanter (Fuchs & Astwood, 1996). At vurdering av allergenisitet inngår ved testing av GM-produkter før kommersialisering, (se f.eks. retningslinjer utarbeidet av OECD, 1992b og WHO, 1995) og at rapsoiljen som andre oljer trolig ikke inneholder signifikante mengder transgent genprodukt eller DNA, tilsier at denne siden av saken trolig ikke vil være aktuell å vurdere ved overvåking av en GM-plante i felt.

Potensiell skade eller innflytelse på fauna rundt utsetningsstedet, vil gjelde f.eks. dyr som kommer i direkte kontakt med planten, som gressende herbivorer eller insekter. Ved raps som med innsatt transgen for insektresistens (Bt) ville det være aktuelt å overvåke utvikling av resistens overfor Bt-toxin i insekter knyttet til raps. Imidlertid vil det trolig ikke bli aktuelt med utbredt bruk av insektresistent raps her i Norge fordi skadeinsekter i denne sammenheng bare er et problem i enkelte distrikt og sesonger. Hvis denne problemstillingen blir aktuell å vurdere vil insekter tilhørende snutebiller (*Centhorynchus floralis* og *C. erysimi*) og jordlopper (*Phyllotreta vittata*, *Psylliodes napi*, *P. chrysocephala* og *Meligethes aenus*) være aktuelle insekter å overvåke (Oddvar Hanssen og Frode Ødegaard, NINA, pers.medd.).

Utbredning av antibiotikaresistens er et økende globalt problem. Selv om sannsynligheten for forverring av tilstanden er vurdert som liten ved bruk av antibiotikaresistente planter (Kruse 1996), er likevel risikoen tilstede ved økt tilstedeværelse av slike gener i miljøet. Denne risikoen er det nødvendig å ta. Det vil sannsynligvis i framtiden finnes varianter av GM-raps med alternative selektive markører,

eller varianter hvor markøren er eliminert (Yoder & Goldsbrough 1994). Imidlertid inneholder de fleste kommersielle GM-rapsvariantene i dag kanamycinresistensgener og enkelte kan inneholde andre antibiotikaresistensgener som ampicillinresistens, tetracyclinresistens og kloramfenikolresistens. Til de sistnevnte knytter det seg alvorligere bekymringer fordi de er hyppig brukt ved bekjempelse av bakterieinfeksjoner i medisinsk sammenheng. Kanamycinresistensgenet *aph (3')-II* er imidlertid i dag det hyppigst brukte markørgenet i transgene planter. Genproduktet inaktiverer aminoglykosidene kanamycin, neomycin, paromomycin, ribostamycin, gentamisin B og butirosin. Av disse er det bare kanamycin og neomycin som brukes i klinisk terapi (Kruse 1996). Aktuelle risikoer i denne sammenheng er knyttet til:

- 1) potensiell overføring av kanamycinresistensgen fra GM-raps til intestinale mikroorganismer eller epitelceller i tarmlyumen og
- 2) potensiell overføring av kanamycinresistensgen fra GM-raps til jordmikroorganismer

Det hersker imidlertid uenighet om sannsynligheten for at noe av dette skal inntreffe. Calgene (1990) vurderer risikoen for eventuell horisontal genoverføring av *aph (3')-II* gen til ubetydelig, mens Kruse (1996) og Traavik (1995) mener at manglende kunnskap rundt eksisterende bakterieflora og mekanismer rundt opptak og inkorporering av frie nukleinsyrer, tilsier forsiktighet og nøye vurdering. Spredning av kanamycinresistens blant tarmbakterier har størst sannsynlighet for å forekomme ved selektiv påvirkning. Inntak av neomycin eller kanamycin kan derfor øke risikoen for at *aph*

(3')-II genet fra GMP overføres og spres innen bakteriene i tarmen.

Etter en utsetting blir det viktig å vurdere potensielle horisontale overføringer av *aph (3')-II* genet til mikroorganismer i naturen. Det er imidlertid rimelig å anta at det er liten sannsynlighet for at de økologiske effektene av en slik overføring blir signifikante (Kruse 1996). Dette har sammenheng med at bakterier med resistensgen i et naturlig miljø trolig ikke har konkurransefortrinn slik at de ikke utsettes for selektivt press. Det er imidlertid usikkert hvorvidt en eventuell økning i forekomsten av kanamycin/neomycinresistente mikroorganismer i naturen vil kunne ha innflytelse på resistensutvikling hos bakterier relatert til infeksjoner hos mennesker og dyr (Kruse 1996). Ved en eventuell overvåking av en slik risiko vil det være aktuelt å teste både tilstedeværelse av bakterier som har fått tilført transgenet og vedvaring av DNA fra den transgene planten i jorda over tid.

4 Overvåking av genmodifiserte dyr

I dag er det kommersielle omfanget for bruk av genmodifiserte dyr lite sammenliknet med planter. Som illustrasjon kan nevnes at av alle de tusenvis av utsettinger av transgene planter som er foretatt, hadde «United States Department of Agriculture» (USDA) fram til 1995 bare godkjent en enkelt innesluttet utsetting av et transgent dyr (karpe; Powell, 1995). I motsetning til transgene planter, er kontrollerte eksperimentelle feltforsøk med transgene dyr i dag hverken politisk akseptert eller biologisk realistisk. Krav til både omfattende eksperimenter og nødvendig størrelse og sikkerhetskrav til innhegning (bur, kar, mærd osv.), ville gjøre inneslutning nærmest uoverkommelig for enkelte dyrearter. Spørsmålet blir så om transgene dyr fritt i miljøet vil bli aktuelt.

4.1 Genmodifisering av dyr

Flere ulike typer dyr har vært gjenstand for genmodifisering. Av invertebrater kan nevnes insekter, nematoder og midd og innenfor vertebrater, fisk og pattedyr. I oversikten under følger eksempler hvor en i dag tar i bruk genmodifiserte dyr eller hvor en teoretisk kan tenke seg disse bli tatt i bruk i framtiden.

Pattedyr:

- I forskningssammenheng med mål å øke forståelse for genetiske-, medisinske- og utviklingsbiologiske relasjoner.
- Som «bioreaktorer» hvor dyret kan produsere (vanligvis gjennom sekresjon i melkekjertlene) farmasøytiske produkter eller andre substanser hvor kjemiske syntese-reaksjoner er ukjente eller for kostbare. Eksempler på slike er human α - og β -globin i gris (Swanson et al. 1992), human α 1-antitrypsin i sau (Wright et al. 1991) og human plasminogen aktivator i geit (Ebert et al. 1991).
- Husdyr med forbedrede egenskaper sammenliknet med det opprinnelige dyret. Forbedring kan knyttes til egenskaper som vekst, størrelse og sykdomsresistens. Dette gjøres f.eks. ved introduksjon av gener for veksthormon fra andre arter (mus, rotte, gris).

Fisk:

- Genmodifisering for økt vekst ved innsetting av gen for veksthormon.
- Innsetting av anti-frys gener som gjør at fisken blir mer tolerant overfor kulde.
- Modifisering m.h.p. økt sykdomsresistens. (Forskning på virusresistens ligger langt framme.) I tillegg kan det i framtiden bli mulig å innføre resistens mot bakterie- og parasittinfeksjoner. Gener for denne type resistens er imidlertid til nå ikke utforsket (Maclean & Penman, 1990).
- Modifisering for bedre evne til utnyttelse av lavkostdiett.

- Modifisering av reproduksjonsmønster (inkludert sterilitet) for forbedring av fiskekjøtt og regulering av vekst.
- Modifisering for redusert aggresjonsnivå.
- Bruk av fisk som bioreaktor for produksjon av nyttige stoffer og legemidler.
- Forbedring av fiskens kvalitet som matprodukt ved å endre kjøttets farge, smak, konsistens og fettsyresammensetning.
- I studier innen utviklingsbiologi, vekst og reproduksjonsfysiologi (fisk som modell for andre vertebrater).

Nematode:

- Nematoden *Caenorhabditis elegans* er en mye brukt modellorganisme for genetiske, utviklingsbiologiske og molekylærbiologiske studier. Aktuelle problemstillinger relatert til transgen *C. elegans* er som biosensor for fysisk eller kjemisk stress (Candido & Jones, 1996).

Fugl:

- Modifisering for økt motstandsdyktigheten overfor sykdom, f.eks. ved innsetting av resistensgener som gjør kyllingen motstandsdyktig overfor virusinfeksjon (Salter & Crittendon, 1989).
- Modifisering av egenskaper som økt vekst (Chen et al. 1990).

Insekter:

- Bruk av molekylære markører for å måle miljøvariable via insekter. Et eksempel er effekten av temperaturforandringer på varmesjokkproteiner i bananflue (Shorrocks & Coates, 1993).
- Modifisering av insekter som verktøy i biologiske bekjempelsesprosesser f.eks. ved hindring av spredningsforløp for insektbårne patogener ved modifisering av insektet. Et eksempel her er å gjøre mygg resistent overfor Dengue-2 ved genmodifisering (Olson et al. 1996). En annen strategi kan tenkes å innbefatte genmodifisering som fører til sterile insekthanner for å utrydde en type insektbestand.

4.2 Overvåkingsstrategi for genmodifiserte dyr

Risikovurdering ved rømte transgene dyr omfatter muligheten for spredning utover planlagt spredningsområde, deretter eventuell formering uten hjelp fra mennesker hvilket kan ha en innflytelse på miljøet som blir sett på som ugunstig eller skadelig. Risikovurdering for slike hendelser består av to elementer: et estimat for at hendelsen skal oppstå («risiko»), og en beskrivelse av forutsette skader skapt av hendelsen («fare»). Faktorer som inngår i en slik risikovurdering er i prinsippet de samme som for transgene planter; dvs. sannsynligheten for unnslippelse fra inneslutningen vurderes, samt sannsynligheten for etablering av populasjoner på uønskede lokaliteter. Det må også vurderes om de innsatte genene kan overføres til ville populasjoner enten ved seksuell hybridisering eller ved horisontal

genoverføring. For å estimere muligheten for etablering i miljøet må:

- 1) den transgene fenotypen nøye karakteriseres og
- 2) undersøkelser foretas for vurdering av om den nye fenotypen har innflytelse på økosystemet.

Det sistnevnte må foregå ved sammenlikning av dyret før og etter genetisk modifisering og sammenlikne utsettingsmiljøet før og etter utsetting.

En overvåkingsstrategi for transgene dyr vil bli sterkt influert av hvilken type dyr en har å gjøre med. Av dette følger at også metodene vil variere sterkt. Transgene husdyr vil i utgangspunktet være lettere å overvåke enn andre dyr ved at de ofte er fysisk innesluttet og at de ikke naturlig vil formere seg ute i naturen. Ved genmodifisering av pattedyr for bruk som «bioreaktorer» er det et faktum at bare et lite antall slike vil trenge for å dekke det kommersielle behovet. I tillegg vil viljen å holde dyrene sikkert innesperret være stor pga. disse dyrenes høye økonomiske verdi. Hvis de mot all formodning skulle unnsnippe antas de å være lette å detektere pga. størrelsen.

Ved utsetting av f.eks. insekter, fisk, andre invertebrater eller små pattedyr vil en måtte vurdere et meget komplekst batteri av interaksjoner hvor situasjonen kan være vanskelig å kontrollere. Det er her spesielt viktig å ha en forståelse av de økologiske forholdene i et utsettingsområde, økologien mellom predator og bytte, herbivor og plante eller vert og parasitt. Transgene dyr kan være modifisert på ulike måter og nivå som i større eller mindre grad fører til forandring av fenotypen til organismen. Å forutse mulige konsekvenser ved en utsetting i hvert enkelt tilfelle er vanskelig, men tidligere erfaringer med introduserte arter kan i enkelte tilfeller hjelpe til å belyse mulige risikoer (Kareiva 1996). Økologiske simuleringmodeller kan til en viss grad hjelpe til å forutsi konsekvensene, men disse gir et svært forenklet bilde. Til forskjell fra mikroorganismer og planter har det vært få dokumenterte tilfeller av utsetting av transgene dyr. Vurdering foretatt av risiko bygger derfor ofte på kunnskap relatert til invasjon av arter og genotyper i stedfremmede økosystemer (Shorrocks & Coates, 1993). Risikoer knyttet til fisk og insekter er nærmere diskutert nedenfor.

4.3 Overvåking av genmodifisert fisk

Kunnskapen omkring genmodifisert fisk (GM-fisk) har økt sterkt de senere år, men ennå er det tekniske hindringer før kommersiell anvendelse kan bli et faktum. Generelt sett vil produksjon av en stamme av GM-fisk, homozygot for et individuelt transgen, ta flere generasjoner. I arter med lang generasjonstid, som laks, kan dette ta 10-15 år (Woodward et al. 1994). Spesielt har integrering av transgener i vertskromosomer og deres stabile overføring og ekspresjon i avkom, vært et problem. Uspesifikk integrering har ført til mosaikkindivider med både innvirkning på fenotypisk uttrykk

og på selve nedarvningsprosessen. Dette problemet antar en imidlertid vil kunne løses over tid. Det kan nevnes at det nylig ble dokumentert stabil Mendelsk nedarvning til F6 generasjonen i medaka (*Oryzias latipes*) transgen linje (Kinoshita et al. 1996). Bruk av spesifikke integreringsprosedyrer ved homolog rekombinasjon av ES-celler (foster stamceller) har vist seg lovende ved stabilisering av prosessen.

En annen hindring før transgen fisk eventuelt vil kunne kommersialiseres, er effektivisering av metoden for konstruksjon av GM-fisk. Til nå er individuell mikroinjeksjon av egg benyttet i størst omfang, men utarbeidelse av andre teknikker som elektroporering av spermceller eller zygoter kan gjøre masseproduksjon av transgen fisk enklere. Disse metodene er imidlertid foreløpig på et eksperimentelt stadium (Woodwark et al. 1994).

Forstilte kategorier for risikovurdering av transgen fisk er følgende (Woodwark et al. 1994):

- Evnen til overlevelse i økosystemet
- Evnen til reproduksjon i økosystemet
- Evnen til spredning til andre habitater
- Evnen til å etablere levedyktige populasjoner
- Evnen til å unngå innfangning
- Effekt av å utnytte transgenet - adferdsforandring - fysiologisk forandring
- Konkurransen med / skade på ville populasjoner av samme art
- Hybridisering og introgresjon med ville slektninger
- Innflytelse på andre arter

Punktene ovenfor er meget generelle og kunne gjelde for en hvilken som helst GMO. Det er her viktig å gripe fatt i spesielle risikoer forbundet med transgen fisk og prøve å utdype disse. De fleste kategoriene vil være avhengig av hvilken fiskeart det gjelder, hvilke egenskaper som er forandret og tilpasning til miljøet den slippes ut i. Det er derfor også her viktig med en trinnsvis «sak-for-sak» vurdering.

Til forskjell fra de fleste transgene pattedyr, kan en anta at transgen fisk har slektninger eller ikke-modifiserte individer av samme art i utsettingsområdet den kan hybridisere med, men dette vil bare være et problem om den transgene fisken ikke er steril. Selv om en nøye gjennomarbeidet overvåking skjer i samsvar med punktene nevnt over, er det viktig å innse at miljøet trolig er for komplekst og uforutsigbart til å til enhver tid å ha fullstendig oversikt over situasjonen. Evaluering av transgen fisk skjer ofte ved analogier til oppdrettsfisk og dennes innvirkning på miljø. En antar imidlertid at transgen fisk vil medføre større risiko enn konvensjonell akvakultur fordi organismer med nye kombinasjoner av egenskaper trolig vil spille nye økologiske roller (Tiedje et al. 1989).

Fysisk inneslutning av fisk i akvakultursystemer er sjelden perfekt. Andelen av rømt oppdrettslaks på opptil 72 % (Lund et al. 1996) i enkelte norske elver er tydelig bevis på dette. Det er forventet at en strengere kontroll av fysiske

inneslutningssystemer vil bli nødvendig og påkrevet ved eventuelt kommersiell oppdrett av GM-fisk. En overvåking vil innebære sikkerhetskontroll av alle potensielle rømningsveger. Allikevel vil det alltid være en risiko for rømning, slik at stikkprøver fra områder rundt anlegg må inngå som en del av sikkerhetsrutinene.

Biologisk inneslutning kombinert med fysisk inneslutning har blitt foreslått som kanskje eneste noenlunde sikre metoden for å forhindre potensiell innflytelse på miljø fra rømt eller introdusert GM-fisk. En biologisk inneslutning av fisk vil innebære å innføre sterilitet ved enkel genetisk manipulering (Johnstone et al. 1991; Devlin & Donaldson, 1992) eller ved genetisk manipulering med innføring av «selvmords»-gener som ville medføre kontrollert dødelighet i fisken (Powers et al. 1992). System der fisk kontrolleres ved «selvmord»-gener er avhengig av at disse genene er stabile og at utkommet er pålitelig. Relevante spørsmål er knyttet til når og hvor slike gener skulle uttrykkes, ville disse genene kunne overføres til hybridavkom før de har hatt sin virkning i foreldrefisken og hva så med påfølgende populasjonsvekst? (Hindar, 1993). Biologisk inneslutning ville være mot sin hensikt hvis målet med utsetting var å øke fiskebestanden. Opprettholdelse av bestanden i et slikt tilfelle ville medføre en kontinuerlig utsetting av ny fisk. Dette ville medføre at en enten måtte ha en stamme med fruktbare fisk eller at steril fisk kunne gjøres fruktbare ved hormonbehandling (P. Alestrøm, pers.medd.).

Skala på utsetting kan ha betydning for konsekvensenes rekkevidde. Ved storskala utsetting kan GM-fisk med større sannsynlighet krysse seg med hverandre. Ved småskala vil sjansen for å treffe på en annen transgen fisk være redusert, og sjansen for hybridisering med ikke transgene fisk større. Problemstillingen her må imidlertid sees i tidsperspektiv, da populasjonsdynamikken vil ha sterk innflytelse på utviklingen. For å hybridisere må selvfølgelig fisken være fruktbar og miljøbetingelsene må ligge til rette for reproduksjon og overlevelse av avkom. Overlevelse etter utsetting og effekter av transgene fiskepopulasjoner, avhenger av deres tilpasningsdyktighet i relasjon til ville stammer. Dette betyr en indirekte sammenheng til de egenskaper som er påvirket, dvs. uttrykk av transgenet.

Et overvåkingsprogram må være basert på allerede eksisterende kunnskaper om den transgene fisken og dennes tiltenkte utsettingsmiljø, eller miljø som potensielt kunne tenke seg å komme i interaksjon med GM-fisken. I en forundersøkelse vil det være viktig å foreta en kartlegging av mulige interaksjonsorganismer medregnet potensielle hybridiseringspartnere. (Det siste er ikke så aktuelt hvis fisken er steril.) Det vil være viktig i en overvåkings-sammenheng å undersøke stedegen fisk for sykdomsfremkallende agens for så å kunne overvåke potensiell innflytelse fra utsettingsfisken. Sykdomsresistent transgen fisk kunne på den måten tenkes å kunne fungere som et «reservoir» for sykdomsfremkallende organismer som igjen kunne spres til ikke-resistente fisk i miljøet. Det kunne også tenkes at slik transgen fisk vil kunne konkurrere ut villfisk fordi den ikke blir syk.

Forundersøkelse av populasjoner tiltenkt mulig innflytelse fra transgen fisk, må omfatte både størrelsesfordeling, atferdsmønster og genetisk diversitet. På bakgrunn av forundersøkelsene vil en muligens kunne evaluere eventuelle endringer som følge av utsetting. Kunnskap om størrelsen på stedegen populasjon, utsatt populasjon og estimert spredning vil være viktig for utarbeidelse av en tilfredsstillende prøvetakingsstrategi. Med tilfredsstillende menes her, som i alle slike sammenhenger, at prøvematerialet reflekterer virkeligheten i størst mulig grad. Dette må utarbeides gjennom eksisterende kunnskap og statistiske metoder.

Tidsperspektivet ved overvåking av GM-fisk etter utsetting avhenger av den gitte fiskens reproduksjonsmønster. Selv om dette er kjent, vil det likevel være vanskelig å forutse tidsrammene for en eventuell spredning, etablering og invasjon. Erfaring med introduksjon av stedfremmede ikke-modifiserte arter har vist uforutsette og overraskende potensialer i slike henseender (Kareiva, 1996). F.eks. tok det regnbueørreten i De Store Sjøene i Canada-USA 100 år å etablere seg etter at den ble satt ut (Dueck, 1994).

For overvåking av GM-fisk må denne først kunne detekteres i miljøet. Det forutsettes at sannsynligheten for påvisning av fisken er nøye overveid gjennom statistiske beregninger. Selve prøvetakingsprosedyren kan bestemmes ut ifra generelle fangstmetoder (se f.eks. Sutherland, 1996). Påvisning av transgen fisk avhenger av at den kan atskilles fra ikke-modifisert fisk, dvs. at den på en eller annen måte er merket. Slike markører kan være av varierende art, men generelt sett fungerer selve transgenet i utgangspunktet som genetisk markør. Påvisning av genetisk markør er nødvendig for deteksjon av transgen fisk og eventuelt avkom, men også for studier av innsatt DNA over tid (2.3) er det nødvendig at den genetiske markøren kan benyttes som analytisk redskap. For deteksjon av transgenet kan flere metoder benyttes, men metoder hvor PCR (2.2 G) inngår er raskest og mest sensitiv. Ellers kan dot-blot metoden (2.2 I) egne seg. Ved rask deteksjon av utsatt fisk kan også andre fysiske og kjemiske merkingsmetoder benyttes.

4.4 Overvåking av genmodifiserte insekter

Bruk av genmodifiserte insekter er mest aktuelt i forbindelse med biologisk bekjempningsproblematikk. Biologisk kontroll av skadedyr omfatter bruk av levende organismer eller virus for å holde skadedyr under en økonomisk skadeterskel. Da bruk av kjemiske insekticider (som f.eks. DDT, PBC, BHC) av erfaring har vist seg å forårsake kjemikalieresistente populasjoner av skadedyr (Stenseth, 1991) og samtidig er miljøgifter, ansees biologiske bekjempelsesmetoder å være et alternativ til kjemiske insekticider. Organismene som brukes ved slik bekjempelse omfatter hovedsakelig insekter, midd, nematoder, sopp, bakterier og virus. Bruk av genmodifiserte insekter i en slik sammenheng har ofte sin

forløper i klassisk biologisk bekjempelse. Eksempel er masseutsetting av sterile individer for utrydding av skadeinsektpopulasjonen av samme art (Ewing, 1991).

Sykdom overført ved insekt, og spesielt av mygg, er ansvarlig for noen av de mest alvorlige helseproblemerkene i verden i dag. Godt kjent er overføring av malaria, filariosis og arbovirus via forskjellige myggarter. Det kan nevnes at det av 500 millioner smittede, dør 3 millioner mennesker av malaria hvert år. Malaria er forårsaket av parasitten *Plasmodium* overført av myggen *Anopheles gambiae*, (Sturchler, 1989). *Aedes aegypti*, også kalt gulfebermygg, er den primære urbane vektoren for flere arbovirus (kalt slik fordi de er arthropod-båret) inkludert gulfeber, denguefeber, Japansk hjernebetennelse og LaCrossefeber (Eggleston, 1991). Bruk av genmanipulerte mygg for å stagge spredning av insektbårne parasitter, er et forskningsfelt i økning. En innfallsvinkel til denne problemstillingen er ved genmanipulering å blokkere produksjon av viruset i myggen (Olson et al. 1996).

De aller fleste tenkte tilfeller der genmodifiserte insekter kan komme til nytte involverer åpen bruk i naturen, men en kan også tenke seg mulig bruk i drivhusproduksjon ved skadeinsektbekjempelse (innesluttet bruk). All bruk hvor insektet kan tenkes å komme i interaksjon med det naturlige miljøet krever nøye risikovurdering av mulige økologiske konsekvenser. De mulige økologiske konsekvensene må så veies mot økonomiske og helsemessige fordeler ved utsetting. En kan anta at utsetting av genmodifiserte, stedegne insekter vil kunne gi bedre forutsigbarhet enn utsetting av helt fremmede insektarter (Hindar et al. 1992).

Potensiell effekt av utsetting kan være knyttet direkte til den transgene egenskapen, eller det faktum at det foretas introduksjon av en fremmed art. Det sistnevnte kan knyttes til følgende faktorer som krever nøye vurdering ved klassisk biologisk bekjempelse (Hindar et al. 1992):

Langtidspåvirkning - Introduksjoner som gir opphav til dannelse av stabile bestander over tid, slik at muligheten for innvirkning på andre arter er stor.

Vertsskifte - Nye artsinteraksjoner har enkelte ganger gitt uønskede effekter og ført til utryddelse av arter (Funasaki et al. 1988).

Områdeskifte - Introduserte arter kan være mer habitat- eller nisjespesifikke enn vertsspesifikke. De kan raskt etablere seg i en biotop som likner «opphavsbiotopen», men med «vikarierende» arter.

Genetisk stabilitet - Hos insekter kan relativt små endringer føre til at arten skifter fra en mer til en mindre vertsspesifikk art eller omvendt (Pimentel et al. 1989; Howarth 1991).

Adferd og mutualisme - Leddyr som lever i samfunn eller i kolonier har vist seg å ha hatt stor effekt når de introduseres i fremmede økosystemer. Dette gjelder blant annet

maursamfunn i varme strøk og afrikanske bier i Amerika (Smith 1991).

Sårbare områder - Enkelte områder er mer sårbare for introduksjon som f.eks. øyer, innsjøer og områder utsatt for naturinngrep (Drake et al. 1989).

I tillegg til de ovenfornevnte faktorene som må vurderes ved en utsetting av ikke-manipulerte insekter, må egenskaper direkte knyttet til den modifiserte organismen vurderes. Dannelsen av en ny skadeorganisme kan gi endrede toleranseegenskaper som gjør det mulig for organismen å etablere seg i andre habitater. Den tilførte genetiske egenskapen kan også medvirke til innflytelse på miljøet ved at f.eks. transgene egenskaper som motstandsdyktighet kan overføres til andre beslektede arter og / eller at insektet kan virke på eller gi skade på andre organismer enn målarten (Tiedje et al. 1989). (Det siste gjelder også ved introduksjon av stedfremmede arter).

De transposable genetiske P-elementene fra *D. melanogaster* har vært brukt i forskjellige insektarter ved forsøk på å konstruere transgene individer (Engels, 1988). P-elementer kan som andre transposable elementer virke på stabiliteten av genomet ved å gi høy mutasjonsrate, skape rekombinasjoner, kromosomale rearrangementer, sterilitet og unormal utvikling (Eggleston, 1990). Ved aktiv bruk av transposable elementer ved konstruksjon av transgene insekter innføres dermed en faktor som skaper ustabilitet i genomet. Dette må nøye overveies ved en overvåkingsprosedyre.

En faktor som nøye må vurderes som risiko, er bruken av genmodifisert virus (GMV) som redskap i genmanipuleringsprosessen for innføring av stedfremmede gener. Det kan nevnes eksperimenter knyttet til resistens overfor Dengue-2 virusoverføring i mygg, hvor det rekombinante Sindbis-viruset ble benyttet for transduksjon av *Aedes aegypti* (Olson et al. 1996). Selv for virus som allerede er utsatt i miljøet finnes det svært lite relevante data til bedømmelse av problemstillinger knyttet til miljø (Traavik, 1992). Relevante spørsmål som må stilles i denne sammenhengen er ifølge Traavik:

- Har det genmodifiserte virus fått utvidet sitt vertsspektrum *in vitro* (i cellekultur)?
- Har GMV fått utvidet vertsspektrum *in vivo* (for forsøksdyr)?
- Kan andre virus som sirkulerer innen økosystemet påvirke infeksjonsforløpet?
- Kan blodsugende eller andre parasittære arthropoder virke som virusvektorer?
- Kan GMV infisere og spres av dyr som migrerer over store avstander (f.eks. trekkfugl)?
- Hvor lang overlevelsestid kan GMV oppnå under naturlige betingelser?
- Hvor genetisk stabil er en GMV?
- Har GMV evne til å danne pseudotyper med andre virus?

- Har GMV evne til å etablere persistente eller latente infeksjoner?
- Kan GMV foreta genetisk rekombinasjon med eller oppnå genetisk komplementering fra naturlig forekommende virus?
- Kan GMV endre parasitt/vertsbalansen for naturlig forekommende infeksjoner, eller aktivere naturlig forekommende latent/vedvarende infeksjoner?
- Kan GMV aktivere endogene virus hos mottagerpopulasjonen eller hos sekundært infiserte arter, f.eks. ved heterolog transaktivering av genekspresjon?

Som for andre GMOer er det viktig med en nøye planlagt overvåkingsstrategi for å ha en oversikt over ukontrollert spredning og etablering. Kontrollsystemet for insekter må kanskje være spesielt nøye planlagt p.g.a. insektenes store tilpasningsevne. Som for andre GMOer kan overvåkingen baseres på metoder skissert i kapittel 2. Omfanget og praktisk gjennomføring av overvåkingen avhenger av målsetting. Fangstmetoder spesifiseres etter type insekt (se f.eks. Sutherland, 1996).

5 Økonomi

Det er vanskelig å gi en klar oversikt over de økonomiske kostnadene i forbindelse med en overvåking da denne vil avhenge av mange ulike faktorer. Faktorer som vil ha innvirkning på omfanget er: størrelsen på utsettingen, hvilken type organisme det er snakk om og i hvilket miljø organismen blir satt ut i. I utredningen er det skissert en rekke metoder som kan benyttes i en overvåking. Imidlertid vil det til en hver tid være kostnadsavhengig i hvor stor grad en kan ha oversikt over alle mulige effekter av en utsetting til enhver tid.

Nedenfor følger et hypotetisk eksempel hvor det blir gjort en vurdering av kostnadene for overvåking av mulige effekter ved utsetting av en genmodifisert plante. Vi antar at den genmodifiserte planten har mulighet for å danne hybrider med naturlig forekommende planter i området rundt utsettingsfeltet, og at de på den måten får spredd transgener til miljøet. I dette eksempelet er kun dette ene aspektet tatt med, nemlig å detektere mulig spredning av transgener fra feltet til hybridplanter.

I praksis vil dette bety en omfattende kartlegging av utsettingsområdet før utsetting finner sted av mulige beslektede planter som den transgene planten kan krysse seg med. Omfanget på området bestemmes ut i fra kjennskap til pollenspredning for den spesifikke planten. La oss si at det vil ta to personer syv dager i felt å kartlegge et område på 1 km². Da ville de omtrent kostnadene bli følgende:

Feltarbeid:

| | |
|---|-------------------------|
| Lønn for to personer i felt (6000 kr per dag x 7) | kr 42 000 |
| Kost/ natt tillegg(1650 kr per dag x 7) | kr 11 550 |
| Felttillegg(900 kr per dag x 7) | kr 6300 |
| Reise-bilutgifter til utsettingsstedet | <u>kr 1500</u> |
| Totale utgifter | <u>kr 61 350</u> |

Hvis vi etter vekstsesongen antar at det vil ta tre dager å samle inn frø fra hybridplanter. Får vi ekstra kostnader på: 27 150 kr.

Hvis vi antar at et antall frø på ca. 1000 skal analyseres i laboratoriet, kan vi beregne isolering av DNA til to dager og selve PCR-analysen til to dager. PCR-analysen kan utføres raskt fordi flere DNA-prøver kan slås sammen for hver deteksjon (antas at 10 prøver slås sammen til en).

Analyse på laboratoriet:

| | |
|--|-------------------------|
| Lønn for to personer på laboratoriet (6000 kr per dag x 4) | kr 24 000 |
| Kostnad for PCR-deteksjon per prøve (50 kr per prøve* x 1000) | <u>kr 5 000</u> |
| (*kostnad er beregnet etter Kolstø & Prydz 1994) | |
| Totalt | <u>kr 29 000</u> |

Kostnadene til sammen for en slik undersøkelse vil være mellom 100 -150 000 kr. Imidlertid er det viktig å understreke at det i dette eksempelet er vurdert kostnadene ved kun et aspekt av en rekke aspekter som er nødvendig å inkludere i overvåkingen.

6 Konklusjoner

Forventninger om en full oversikt over alle potensielle vekselvirkninger mellom en utsatt transgen organisme og det naturlige økosystem, er sterkt avhengig av hvilken organisme det gjelder. Enkelte husdyr som f.eks. genmodifiserte sauer vil være lett å overvåke pga. størrelsen. I tillegg vil de ikke kunne reprodusere med ville slektninger og vil dermed ikke kunne etablere seg eller danne levedyktige populasjoner. En transgen plante som f.eks. mais vil heller trolig ikke medvirke til store effekter på norsk natur fordi den ikke kan reprodusere med naturlig forekommende planter og dermed ikke få spredd sine gener. Andre organismer som f.eks. mygg vil være umulig å kontrollere hvis den blir utsatt her. Selv med utsetting av den kjente landbruksplanten raps, som brukes som eksempel i denne utredningen, er det knyttet usikkerhet både m.h.p. spredning, hybriddannelse, taksonomi osv. Tidligere erfaringer med introduserte arter har tydelig vist at tiden det tar fra en art blir introdusert til den blir etablert eller invasionsdyktig er helt umulig å estimere. Dette viser tydelig hvor viktig det er å ha et langtidsperspektiv ved overvåking av genmodifiserte planter og dyr.

Det er vist her at simuleringsmodeller for estimering av spredning av organismer eller gener kan gi grunnlag for en overvåkingsstrategi. Slike modeller kan imidlertid aldri fullt ut avspeile virkeligheten og det trengs lengre erfaring med slike modeller enn det vi nå har for fullt ut å kunne utnytte deres kapasitet. Det er i denne sammenheng viktig at tidligere modeller vurderes og sammenliknes med felldata før prøvetakingsomfanget i en overvåkingsprosedyre bestemmes.

Sammenliknet med genmodifiserte planter, er erfaring med genmodifiserte dyr liten. Det er knyttet stor bekymring til hva et storskala utslipp av dyr vil bety for økosystemet. I denne sammenheng antas det å være spesielt stor risiko relatert til dyr som har slektninger eller ikke-modifiserte organismer av samme art i utsettingsområdet som de kan krysse seg med, og / eller dyr som er spesielt tilpasningsdyktige.

I utredningen er fisk og insekter tatt opp spesielt fordi de synes å tilhøre en av de største risikogrupperne blant dyr. Fysisk inneslutning av fisk i akvakultursystemer er sjelden perfekt, noe som forekomst av rømt oppdrettsfisk på opp til 72 % viser. Hybriddannelse mellom rømt GM-fisk og villfisk vil kunne medføre stor innflytelse på villfiskstammene.

Tenkt bruk av GM-insekter knyttes spesielt til biologisk bekjempelse, noe som vanligvis vil medføre utsetting. Risiko for at insekter kan ha uforutsette effekter på miljøet knytter seg bl.a. til at de ved sin kapasitet til raske genetiske endringer er meget tilpasningsdyktige. En spesiell risiko relateres til insekter som bærer genmodifiserte virus.

Overvåking av en genmodifisert organisme innebærer en prosess hvor målet er å følge effekter av en utsetting over tid ved bruk av kjente metoder. En slik overvåking må

bygge på en nøye planlagt overvåkingsstrategi basert på statistiske beregninger. Samtidig må en slik prosess være fleksibel for å kunne fange opp uforutsette endringer i miljøet, i den transgene organismen eller ved interaksjonen mellom dem. Problemet er at slike uforutsette hendelser ikke kan systematisk overvåkes før de blir oppdaget. Dette er trolig den viktigste årsaken til å innta en føre-var-holdning i forhold til utsetting av GMOer.

7 Ordforklaringer

Agarosegel - Gel bestående av agarose

Allel - alternative utgaver av et gen eller en DNA-sekvens

Amplifisering - Økning av antall kopier av et DNA-fragment, enten ved kloning i en vektor eller ved bruk av PCR

Antigen - Et molekyl eller substans (oftest av protein-natur) som vil stimulere immunapparatet til å produsere antistoffer ved innføring i et hvirveldyr

Antistoff - Et protein som produseres når immunapparatet gjenkjenner en fremmed inntrenger (molekyl, virus, mikroorganisme). Har som oppgave å uskadeliggjøre inntrengeren

Art - En taksonomisk kategori som typisk (men ikke alltid) omfatter en organisme som faktisk eller potensielt kan krysse seg naturlig

Arthropoder - Leddyr

Autoradiografi - Deteksjon av radioaktivt merkede molekyler ved røntgen film

Base - Forkortelse for nitrogenbase i nukleinsyremolekylet (A=adenin, T=tymin, U=uracil, C=cytosin og G=guanin)

Assay - undersøkelse

Biodiversitet - Mangfold og variasjon mellom levende organismer og de økologiske kompleksene hvor de forekommer

Bioreaktor - Biologisk produksjonsenhet

Biosensor - Biologisk enhet som «måleapparat»

Bp - Basepar - To komplementære baser som ved hjelp hydrogenbindinger kan parre seg med hverandre fra en posisjon i hver sin motstående nukleinsyretråd. A parrer seg med T (eller U i RNA), G med C

Brønn (på en gel) - Fordypning som er stanset ut

Delesjon - Misting av DNA sekvens (eller del av kromosomet)

Denaturering - Oppdeling av DNA-tråden (dobbeltråden) til to separate tråder (enkeltrådet)

Dominant - En egenskap som uttrykkes i et individ som er heterozygot for det spesifikke genet

Duplikasjon - Mutasjon som består i at et DNA-fragment har fordoblet seg

Ekstotisk art - En art som ikke hører hjemme i den naturlige fauna eller flora. Utrykket omfatter både naturlig introduserte arter og de introdusert av mennesker, slik som landbruksarter.

Elektroforese - En teknikk hvor molekyler separeres ved ulik mobilitet i et elektrisk felt.

Endogen - virus - En virus som er integrert i genomet til vertsorganismen

Enzym - Et protein som oppfører seg som en katalysator i et biologisk system

Etidium bromid - En kjemisk forbindelse som bindes til nukleinsyrer slik at disse kan observeres ved ultraviolett stråling

Eukaryot organisme - Organisme som har genomet fordelt i kromosomer innbefattet i en kjerne (eks.: planter, dyr, sopp).

Fenotype - Observerte egenskaper til en organisme

«Fingerprint» - Er et mønster som framkommer ved gelelektroforese av fragmenter (enten protein eller DNA)

«Fitness» - Den reproduktive tilførselen fra en organisme eller genotype til påfølgende generasjoner

Gel - Geléaktig substans som brukes til separasjon av ulike molekyler (DNA, proteiner)

Gen - Funksjonell arvbar enhet vanligvis båret på kromosomet og «konstruert» av DNA

Genstrøm - Utveksling av gener mellom ulike, ofte ubeslektede, populasjoner

Genetisk markør - DNA polymorfisme eller et allel av interesse i et eksperiment

Genom - Det genetiske innholdet i et komplett (haploid) kromosomsett

Genomorganisering - Organisering av genene innen genomet

Genotype - Totalsum av genetisk informasjon i en organisme

GMO - Genetisk modifisert organisme

GMP - Genetisk modifisert plante

Heterozygot - Et individ som har to ulike alleler i et spesielt locus på et par homologe kromosomer

Heterozygositet - Mål på andelen av heterozygote individer innen en populasjon eller et gitt antall individer

Homozygot - Et individ som har to identiske alleler i et spesielt locus på et par homologe kromosomer

Homologe kromosomer - Kromosomer som parrer seg under meiosen og inneholder identiske loci

Homolog rekombinasjon - Rekombinasjon mellom homologe eller like DNA-sekvenser

Horisontal genoverføring - Ikke-seksuell bevegelse av gener mellom voksne individer

Hybrid - Et avkom mellom to genetisk forskjellige individer

Hybridisering - Seksuell reproduksjon mellom individer som tilhører forskjellige arter, eller paring av RNA og DNA eller to ulike DNA-tråder som er helt eller delvis komplementære

Ikke-mål organisme - Organisme som utilsiktet påvirkes av et produkt

Innesluttet bruk - Omfatter framstilling og bruk av genmodifiserte organismer innenfor et lukkede systemer, jf Genteknologiloven.

Introgresjon - Prosess hvor nye gener introduseres i en vill populasjon ved tilbakekryssing av hybrider mellom to populasjoner

Insertsjon - Integrering av en DNA-sekvens i et genom

In situ hybridisering - Hybridisering med en passende probe utført direkte på et kromosompreparat eller histologisk snitt

Invasjonsdyktig - Kapasitet for en organisme til å spre seg utover introduksjonsstedet og bli etablert på det nye stedet

Inversjon - En kromosomal mutasjon karakterisert ved reversering av et DNA-segment

In vitro - «I glass», dvs i et rør eller utenfor organismen

In vivo - I organismen

Isozymer - En av flere former av et spesifikt enzym

Kappe (hos virus) - Ytre «kapsel» av proteiner rundt en nukleinsyrekjerne av et virus

Kb-Kilo basepar - Tusen basepar

- Koblingsanalyse** - Analyse av i hvilken grad ulike alleler for gitte gener nedarves uavhengig ved meiose eller i en genetisk krysning
- Kodominant allel** - Alleler hvor begge genproduktene har like stor påvirkning på fenotypen
- Konjugasjon** - Overføring av DNA fra en bakterie til en annen
- Komplementaritet** - I DNA sammenheng er to nukleinsyrer komplementære når svarende til A i den ene tråd finnes T i den annen tråd, og tilsvarende G i den ene når det er C i den andre
- Komplementering (genetisk)** - Utbytting/erstatning av et gen med samme funksjon
- Kromosom** - Struktur av DNA hvor genene er plassert
- Kryssing** - Seksuell reproduksjon mellom individer som tilhører samme biologiske art
- Locus** - (flert. Loci) Sted på et kromosom hvor et arveanlegg eller en spesifikk sekvens er lokalisert
- Markør** - DNA fragment med kjent størrelse brukt til kalibrering ved elektroforese. Er også betegnelse for en DNA polymorfisme eller et allel av interesse i et eksperiment
- Maternell nedarvning** - Nedarvning skjer via cytoplasma (dvs. via moren)
- Mb- Megabase** - En million basepar (tusen Kb)
- Mendelsk nedarvning** - Betyr her at genene på de ulike homologe kromosomene nedarves uavhengig av hverandre når de overføres til gametene
- Metylering** - Modifikasjonen, ved tilføyning av en (-CH₃)-gruppe til en base i et DNA- eller RNA-molekyl. Metylering i eukaryote celler er korrelert med inhibering av transkripsjon
- Mitokondrie** - Liten sirkulær DNA-enhet i cytoplasma
- Monoklonalt antistoff** - Rent antistoff som produsert av en enkelt celleklon
- Mosaikk individ** - Individ bestående av vev med forskjellig genetisk sammensetning
- mRNA** - «messenger RNA»- «budbringer» RNA (riboonukleinsyre). Er involvert i proteinsyntesen
- Mutasjon** - Forandring av arvestoffet i cellen
- Mutagen** - En substans som gir opphav til mutasjoner
- Northern blotting** - Teknikk hvor RNA overføres fra agarosegel til membran hvor de kan hybridiseres til komplementært DNA.
- Nukleotid** - Byggesten i DNA eller RNA
- Oligonukleotid** - Et enkelttrådet DNA-molekyl med ca. 10-100 nukleotider
- Patogen** - Organisme som kan gi sykdom i en annen organisme
- Plasmid** - Et ekstrakromosomalt sirkulært DNA-molekyl som kan replikere autonomt
- Plastid** - I planter, en selvreplikerende organelle som kan differensiere til en kloroplast
- Pleiotropi** - Effekt av et gen på flere ulike egenskaper
- PCR - Polymerase chain reaction**. Metode for å amplifisere spesifikke, korte områder av DNA ved bruk av en varmestabil polymerase. Når mange kopier av DNA-fragmentet av interesse er produsert, kan det eksamineres ved andre teknikker som elektroforese
- Pollinering** - Overføring av pollen fra hann- til hunnplante
- Polymerase** - Enzym som forlenger en nukleotidsekvens
- Polymorfisme** - Tilstedværelsen av to eller flere alleler i et locus som er relativt vanlig i en populasjon - dvs. genetisk variasjon
- Primer** - Kjede av nukleotider med sekvens komplementær til et bestemt stykke av templat DNA
- Probe** - Fragment av DNA med kjent opprinnelsessted i genomet og/eller kjent DNA sekvens. Anvendes til å oppdage/påvise komplementære sekvenser i blanding av DNA-molekyler
- Prokaryot organisme** - organisme hvor genomet består av en enkelt sirkulært DNA-molekyl tilstede i cytoplasma i cellen (f.eks. bakterier)
- Promoter** - Den sekvensen i DNA-molekylet som gjør at RNA polymerasen kan gjenkjenne hvor et gen starter.
- Rekombinant DNA** - DNA fra ulike kilder satt sammen ved bruk av moderne molekylærbiologiske metoder
- Rekombinasjon** - En naturlig prosess hvor utveksling av deler av nukleinsyre mellom to liknende nukleinsyrer resulterer i en ny kombinasjon av gener
- Replikasjon** - Prosessen hvor en ny nukleinsyre dannes
- Restriksjonszymer/endonukleaser** - En endonuklease som gjenkjenner spesifikke nukleotidsekvenser i DNA og så foretar et dobbelttråd kutt i DNA-molekylet
- Restriksjonskartlegging** - Konstruksjon av et lineært kart hvor ulike restriksjonsenzymseter er lokalisert
- Restriksjonssete** - En spesifikk basesekvens som gjenkjennes av et restriksjonsenzym
- RFLP** - «Restriction fragment length polymorphism» Polymorfisme som følge av om et restriksjonssete er tilstede eller ikke
- Satellitt DNA** - DNA som består av repeterte kromosomale nukleotidsekvenser
- Sekvens** - I DNA-sammenheng menes rekkefølgen av ulike nukleotider
- Sekvensering** - Metoden for å finne sekvensrekkefølgen av nukleotider
- Seleksjon** - Evnen for en spesifikk genotype i en populasjon til å overleve og reproducere. Er også brukt for metoder som fremmer overlevelse av en celle-koloni eller en vevskultur
- Selvpollinering** - Pollen til en plante overføres til hunden delen på samme plante eller en annen plante med samme genetiske sammensetning
- Stedegne** - Organismer eller gener/DNA som hører naturlig til i et gitt miljø
- Stedfremmede** - Organismer eller gener/DNA som ikke hører naturlig til i et gitt miljø
- Southern blotting** - Teknikk hvor DNA overføres fra agarosegel til membran hvor de kan hybridiseres til komplementært DNA
- Stringens** - Betegner her ofte saltkonsentrasjonen på en buffer og temperaturen under en hybridiseringsreaksjon. Ettersom parametrene forandres, forandres graden en probe bindes til en DNA-sekvens på.
- Substitusjon** - Betegner her ofte en mutasjon hvor en nukleotid er byttet ut med en annen
- Tandemrepetert** - Repeterte DNA-sekvenser som ligger ved siden av hverandre (i tandem)

Templat - DNAet i en enkelttråd som fungerer som en mal for dannelse av komplementær-tråden, eller for et RNA-molekyl

Transduksjon - Overføring av DNA mellom bakterier via et bakterievirus

Transformasjon - Opptak av DNA i en celle

Transkripsjon - Prosessen hvor et enkelttrådet RNA-molekyl (mRNA), komplementært til DNA-templaten, syntetiseres av RNA-polymerasen

Translokasjon - Overføring av genetisk materiale fra et kromosom til et annet

Transgen - Gen fra en forskjellig organisme eller et kunstig konstruert gen som tilføres en annen organisme ved molekylærbiologiske metoder

Transgen organisme - En organisme hvor fremmed DNA (fra samme eller ulik art) er tilstede i genomet i nesten alle cellene

Translokasjon - Kromosomforstyrrelse som innebærer forflytning av et segment til et nytt sted, enten på samme eller et annet kromosom

Transposabelt element / Transposon - ET DNA-fragment som kan bevege seg innen og mellom genomer

Vektor - Plasmid, kosmid, bakteriofag, animalsk virus, YAC etc. som anvendes for å overføre fremmed DNA til en vertsorganisme

Viral - Av virus-opprinnelse

Western blotting - Teknikk hvor proteiner overføres fra gel til membran hvor de kan gjenkjennes av reagenser (ofte antistoffer) spesifikke for spesielle aminosyresekvenser

Utsetting - Framstilling og bruk av genmodifiserte organismer som ikke regnes som innesluttet bruk jf Genteknologiloven

8 Litteratur

- Avise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A. & Saunders, N.C. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial bridge between population genetics and systematics. - *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18: 489-522.
- Bibby, C.J., Phillips, B.N. & Seddon, A.J.E. 1985. Birds of restocked conifer plantations in Wales. - *J. Appl. Ecol.* 22: 619-633.
- Bohnert, H.J. & Jensen, R.G. 1996. Strategies for engineering waterstress tolerance in plants. - *Trends Biotech.* 14: 89-97.
- Bruford, M.W. & Wayne, R.K. 1993. Microsatellites and their application to population genetic studies. - *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3: 939-943.
- Burke, T. 1989. DNA fingerprinting and other methods for the study of mating success. - *Trends Ecol. Evol.* 4: 139-144.
- Calgene 1990. Kan' gene: Safety and use in the production of genetically engineered plants. - Request for advisory opinion, Calgene Inc., California.
- Callen, D.F., Thompson, A.D., Shen, Y., Phillips, H.A., Richards, R.I., Mulley, J.C. & Sutherland, G.R. 1993. Incidence and origin of «null» alleles in the (AC)_n microsatellite markers. - *Am. J. Hum. Genet.* 52: 922-927.
- Candido, E.P.M. & Jones, D. 1996. Transgenic *Caenorhabditis elegans* strains as biosensors. - *Trends Biotech.* 14: 125-129.
- CEN (Comité Européen de Normalisation), WI 55 (1995) Biotechnology - Modified organisms for application in the environment - Strategies for the monitoring of genetically modified plants.
- Chen, H.Y., Garber, E.A., Mills, E., Smith, J., Kopchick, J.J., Dilella, A.G. & Smith, R.G. 1990. Vectors, promoters and expression of genes in chick embryos. - *J. Reprod. Fertil. (suppl.)* 41: 173-182.
- Crawley, M.J., Hails, R.S., Rees, M., Kohn, D. & Buxton, J. 1993. Ecology of transgenic oilseed rape in natural habitats. - *Nature* 363: 620-623.
- Dale, P.J. & McPartlan 1992. Field performance of transgenic potato plants compared with controls regenerated from tuber discs and shoot cuttings. - *Theor. App. Genet.* 84: 585-591.
- Dale, P.J., Scheffler, J.A. & Irwin, J.A. 1994. The transition from the small-scale field release of transgenic crop plants to their widespread use in agriculture. - s. 57-67 i *Proceeding of the 3rd International Symposium on The Biosafety Results of Field Tests of Genetically Modified Plants and Microorganisms*
- Davies, K.E. 1988. *Genome analysis - A practical approach*, IRL Press, Oxford, England.
- Devlin, R.H. & Donaldson, E.M. (1992) Containment of genetically altered fish with emphasis on salmonids. - s. 229-265 i *Hew, C.L. & Fletcher, G.L. (eds.). Transgenic fish*. World Scientific Publishing, Singapore,

- Dietz, A. 1993. Risk assessment of genetically modified plants introduced into the environment. - s. 209-227 i Wöhrmann, K. & Tomiuk, J. (eds.). *Transgenic organisms*. Birkhäuser Verlag Basel/Switzerland.
- Drake, J.A., Mooney, H.A., di Castri, F., Groves, R.H., Kruger, F.J., Rejmanek, M. & Williamson, M. 1989. *Biological invasions: a global perspective*. - SCOPE 37, John Wiley, Chichester.
- Dueck, L.A. 1994. Population divergence of introduced rainbow trout in the Lake Ontario watershed, based on the mitochondrial genome. - M.Sc. thesis, University of Guelph, Guelph, Canada.
- Ebert, K.M., Selgrath, J.P., DiTullo, P., Denman, J., Smith, T.A., Memon, M.A., Schindler, J.E., Monasterski, G.M., Vitale, J.A. & Gordon, K. 1991. Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk. - *Bio/Technology* 9: 835-838.
- Edwards, M.D., Stuber, C.W. & Wendel, J.F. 1987. Molecular-marked-facilitated investigations of quantitative-trait loci in maize. Numbers, genomic distribution and types of gene action. - *Genetics* 116: 113-125.
- Eggleston, P. 1991. The control of insect-borne disease through recombinant DNA technology. - *Heredity* 66: 161-172.
- Ellstrand, N.C., Devlin, B. & Marshall, D.L. 1989. Gene flow by pollen into small populations: Data from experimental and natural stands of wild radish. - *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 9044-9047.
- Ellstrand, N.C. & Hoffman, C.A. 1990. Hybridization as an avenue of escape for engineered genes. *BioScience*. 40: 438-442.
- Engels, W.R. 1988. P elements in *Drosophila melanogaster*. s. 437-484 i Berg, D. and Howe, M., ed. *Mobile DNA*, ASM Publications, Washington, D.C.
- Ewing, T. 1990. Double blow for bowflies in Australia. - *Nature* 343: 496.
- Farinelli, L., Malnoe, P. & Collet, G.F. 1992. Heterologous encapsidation of potato virus strain o (PVYO) with the trasgenic coat protein of PVY strain N (PVYN) in *Solanum tuberosum* cv. Bintje. - *Bio/Technology* 10: 1020-1025.
- Fitt, G.P. 1994. Field evaluation of transgenic cotton in Australia: Environmental considerations and consequences of expanding trial size. - s. 37-47 Proceeding of the 3rd International Symposium on The Biosafety Results of Field Tests of Genetically Modified Plants and Microorganisms.
- Fuchs, R.L. & Astwood, J.D. 1996. Allergenicity assessment of foods derived from genetically modified plants. - *Food technology* 50: 83-88.
- Funasaki, G.Y., Lai, P.-Y., Nakahara, L.M., Beardsley, J.W. & Ota, A.K. 1988. A review of biological control introductions in Hawaii: 1890 to 1985. - *Proc. Hawaii. Entomol. Soc.* 28: 105-160.
- Genteknologiloven 1993 Nr. 38. Lov om fremstilling og bruk av genmodifiserte organismer. Sosial- og helse-departementet og Miljøverndepartementet.
- Goksøyr, J. & Sørheim, R. 1991. Utsetting av genmodifiserte mikroorganismer. - Kontrakt nr. BTEK 2, Direktoratet for naturforvaltning.
- Goy, P.A. & Duesing, J.H. 1995. From pots to plots. Genetically modified plants on trial. - *Bio/Technology* 13: 454-458.
- Graham, F. (1970) *Since silent spring*. New York, Houghton Mifflin.
- Harrison, R.G. 1991. Molecular changes at speciation. - *Ann. Rev. Ecol. System.*, 22: 281-308.
- Hindar, K. 1993. Genetically engineered fish and their possible environmental impact. - NINA Oppdragsmelding 215: 1-48.
- Hindar, K., Jonsson, N. & Aagaard, K. 1992. Genmodifiserte organismer i biologisk kontroll av insekter og andre virvelløse dyr. - NINA utredning 37: 1-24.
- Hoffman, T., Golz, C. & Schieder, O. 1994. Foreign DNA sequences are received by a wild-type strain of *Aspergillus niger* after co-culture with transgenic higher plants. - *Current Genet.* 27: 70-76.
- Howarth, F.G. 1991. Environmental impacts of classical biological control. - *Ann. Rev. Entomol.* 36: 485-509.
- Jain, S.M. 1993. Recent advances in plant genetic engineering. - *Curr. Sci.* 64: 715-724.
- Jain, S. & Martins, P. 1979. Ecological genetics of the colonizing ability of rose clover (*Trifolium hirtum* All.). - *Am. J. Bot.* 66: 361-366.
- Jeffreys, A.J., Wilson, V. & Thein, S. 1985. Hypervariable «minisatellite» regions in human DNA. - *Nature (London)* 314: 67-73.
- Johnstone, R., Knott, R.M., MacDonald, A.G. & Walshingham, M.V. 1991. Production and performance of triploid Atlantic salmon in Scotland. - *Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.* 1789: 15-36.
- Jongsma, M.A., Stiekema, W.J. & Bosch, D. 1996. Combating inhibitor-insensitive proteases of insect pests. - *Trends Biotech.* 14: 331-333.
- Jørgensen, R.B. 1994. Genspredning fra raps (*B. napus*) til agerkål (*B. campestris*) - et ukrudt i agro-økosystemet. Regulering af anvendelsen af genetisk modificerede planter i Norden. - Nordisk Ministerråd.
- Jørgensen, R.B. & Andersen, B. 1994. Spontaneous hybridization between oilseed rape (*Brassica napus*) and weedy *B. campestris* (*Brassicaceae*): A risk of growing genetically modified oilseed rape. - *Am. J. Bot.* 81.
- Kareiva, P. 1996. Special feature - Developing a predictive ecology for non-indigenous species and ecological invasions. - *Ecology* 77 (6).
- Kidwell, M.G. 1993. Lateral transfer in natural populations of eukaryotes. - *Annu. Rev. Genet.* 27: 235-256.
- Kinoshita, M., Toyohara, H., Morihiko, S., Inoue, K., Yamashita, S., Satake, M., Wakamatsu, Y. & Ozato, K. 1996. A stable line of transgenic medaka (*Oryzias latipes*) carrying the CAT gene. *Aquaculture* 143: 267-276.
- Kjellson, G. & Simonsen, V. 1994. Methods for risk assessment of transgenic plants. - Birkhäuser Verlag, Basel, Sveits.

- Krebs, C.J. 1989. Ecological methodology. - Harper Collins Publisher, New York, USA.
- Kruse, H. 1996. Bruk av kanamycinresistensgener som markørgener i genmodifiserte planter - sikkerhet for miljø og helse. - DN-utredning, nr. 3.
- Lecoq, H., Ravelonandro, M., Wipf-Scheibel, C., Monsion, M., Raccach, B. & Dunez, J. 1993. Aphid transmission of an aphid nontransmissible strain of zucchini yellow mosaic potyvirus from transgenic plants expressing the capsid protein of plum pox potyvirus. - Mol. Plant-Microb. Interact. 6: 403-406.
- Lefol, E., Danielou, V., Darmency, H., Boucher, F., Maillet, J. & Renard, M. 1995. Gene dispersal from transgenic crops. Growth of interspecific hybrids between oilseed rape and the wild hoary mustard. - J. Appl. Ecol. 32: 803-808.
- Lenski, R.E. & Nguyen, T.T. 1988. Stability of recombinant DNA and its effect on fitness. - Trends Ecol. 3: S18-S20.
- Levin, D.A. 1981. Dispersal versus gene flow in plants. - Ann. Missouri Bot. Gard. 68: 233-253.
- Lid, J. 1985. Norsk, svensk, finsk flora. - Det Norske Samlaget, Oslo. 5. Utgave.
- Lindlow, S.E., Panopoulos, N. & McFarland, B. 1989. Genetic engineering of bacteria from managed and natural habitats. - Science 244: 1300-1307.
- Litt, M. & Luty, J.A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of dinucleotide repeats within the cardiac muscle actin gene. - Am. J. Hum. Genet. 44: 397-401.
- Lund, R.A., Østborg, G.M. & Hansen, L.P. 1996. Rømt oppdrettslaks i sjø- og elvefiske i årene 1989-1995. - NINA Oppdragsmelding 411: 1-16.
- Lynch, M. & Milligan, B.G. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. Mol. Ecol. 3: 91-99.
- Maclean, N. & Penman, D. 1990. The application of gene manipulation to aquaculture. - Aquaculture 85: 1-20.
- Maliga, P. 1993. Towards plastid transformation in flowering plants. - Trends Biotech. 11: 101-107.
- Manasse, R. & Kareiva, P. 1991. Quantifying the spread of recombinant genes and organisms. -s. 215-231 i Ginzburgh, L. (ed.). Assessing ecological risks of biotechnology,. Butterworth-Heinemann, Boston.
- McBride, K. E., Svab, Z., Schaaf, D.J., Hogan, P.S., Stalker, D.M. & Maliga, P. 1995. Amplification of a chimeric *Bacillus* gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco. - Bio/Technology 13: 362-365.
- McCartney, H.A. & Lacey, M.E. 1991. Wind dispersal of pollen from crops of oil seed rape (*Brassica napus* L.). - J. Aerosol. Sci. 22: 467-477.
- Metz, P.L.J., Nap, J-P. & Stiekema, W.J. 1995. Hybridization of radish (*Raphanus sativus* L.) and oilseed rape (*Brassica napus* L.) through a flower-culture method. - Euphytica 831: 159-168.
- Meyer, P., Linn, F., Heidman, Z.A.H., Niederhof, I. & Saedler, H. 1992. Endogenous and environmental factors influence 35S promoter methylation of a maize A1 gene construct in transgenic petunia and its colour phenotype. - Mol. Gen. Genet. 231: 345-352.
- Moar, W.J., Pusztai-Carey, M., Van Faassen, H., Boch, D., Frutos, R., Rang, C., Luo, K. & Adang, M.J. 1995. Development of *Bacillus thuringiensis* CryIC resistance by *Spodoptera exigua* (Hübner)(*Lepidoptera* : *Noctuidae*). - Appl. Environ. Microbiol. 6: 2086-2092.
- Moffat, A.S. 1996. Moving forest trees into the modern genetics era. - Science 271: 760-761.
- Morgenroth, V.H. 1991. Monitoring of genetically modified organisms released to the environment. - OECD, Paris.
- Mitten, D. & Lindemann, J. 1994. Laurate canola (*Brassica napus*) commercialization of the first oilseed crop genetically engineered to modify oil composition. - s. 453-457 i Proceeding of the 3rd International Symposium on The Biosafety Results of Field Tests of Genetically Modified Plants and Microorganisms.
- Numata, M. 1961. Forest vegetation in the vicinity of Chosi. Coastal flora and vegetation at Chosi, Chiba Prefecture IV. - Bulletin of the Chosi marine laboratory of Chiba University 3: 28-48.
- Nurminiemi, M., Tufto, J., Nilsson, N-O. & Rognli, O.A. 1997. Spatial models of pollen dispersal in the forage grass meadow fescue (Submitted)
- O'Connell, K.P., Goodman, R.M. & Handelsman, J. 1996. Engineering the rhizosphere: expressing a bias. - Trends Biotech. 14: 83-88.
- OECD 1992a. Report of the OECD workshop on the monitoring of organisms introduced into the environment. - Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- OECD 1992b. Safety evaluation of foods derived by modern biotechnology: Concepts and principles. - Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- OECD 1995. Proceedings of workshop on safety evaluation of foods, environmental health and safety div. - Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- O'Neill, C., Horvath, G.V., Horvath, E., Dix, P.J. & Medgyesy, P. 1993. Chloroplast transformation in plants: polyethylene glycol (PEG): treatment of protoplasts is an alternative to biolistic delivery systems. - Plant J., 3: 729-738.
- Olson, K.E., Higgs, S., Gaines, P.J., Powers, A.M., Davis, B.S., Kamrun, K.I., Carlson, J.O., Blair, C.D. & Beaty, B.J. 1996. Genetically engineered resistance to Dengue-2 virus transmission in mosquitoes. - Science 272: 884-886.
- Pimentel, D., Hunter, M.S., LaGro, J.A., Efromson, R.A., Landers, J.C., Mervis, F.T., McCarthy, C.A. & Boyd, A.E. 1989. Benefits and risks of genetic engineering in agriculture. - BioScience 39: 606-614.

- Pimm, S.L. 1987. Determining the effects of introduced species. - *Trends Ecol. Evol.* 2: 106-108.
- Potrykus, I. 1990. Gene transfer to plants: assessment and perspectives. - *Physiol. Planta*, 79: 125-134.
- Potrykus, I. 1991. Gene transfer to plants. - *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 42: 205-225.
- Powell, D. 1995. Safety in the contained use and release of transgenic animals and recombinant proteins. - s 110-146 in *Genetically modified organisms - A guide to biosafety*, ed. Tzotzos, G.T., CAB International, UK.
- Powers, D.A., Chen, T.T. & Dunham, R.A. 1992. Transgenic fish. - pp. 233-249 i Murray, J.A.H., ed. *Transgenesis: application of gene transfer*. Wiley, Chichester.
- Raybould, A.F. & Grey, A.J. 1994. Will hybrids of genetically modified crops invade natural communities? - *Trends Ecol. Evol.* 9: 85-89.
- Regal, P.J. 1988. The adaptive potential og genetically engineered organisms in nature. - *Trends Ecol. Evol.* 6: 47-49.
- Rissler, J. Mellon, M. 1996. The ecological risks of engineered crops, - The MIT Press, Cambridge, Massachusetts, UK.
- Robson, P.R.H., McCormac, A.C., Irvine, A.S. & Smith, H 1996. Genetic engineering of harvest index in tobacco through overexpression of a phytochrome gene. - *Nature Biotechnology* 14: 995-998.
- Rognli, O.A. 1994. Gentechnologi i kulturplanter. - *Faginfo* 21: 81-187. NLH-Fagttjenesten.
- Salter, D.W. & Crittendon, L.B. 1989. Artificial insertion of a dominant gene for resistance to avian leukosis virus into the germline of the chicken. - *Theor. Appl. Genet.* 77: 457-467.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Scheffler, J.A., Parkinson, R. & Dale, P.J. 1993. Frequency and distance of pollen dispersal from transgenic oilseed rape (*Brassica napus*). - *Transgenic Research* 2: 356-364.
- Schell, J.S. 1993. Plant biotechnology: state of the art in developed countries and relevant safety considerations. - no. 20: s. 25-39 i *Proceedings from Pan-European conference on the potential long-term ecological impact of genetically modified organisms*. Strasbourg. Council of Europe Press.
- Schlüter, K., Fütterer, J. & Potrykus, I. 1995. «Horizontal» gene transfer from a transgenic potato line to a bacterial pathogen (*Erwinia chrysanthemi*) occurs - if at all - at an extremely low frequency. - *Bio/Technology* 13: 1094-1098.
- Shewry, P.R., Tatham, A.S., Barro, F., Barcelo, P & Lazzeri, P. 1995. Biotechnology of breadmaking: unraveling and manipulating the multi-protein gluten complex. - *Bio/Technology* 13: 1185- 1190.
- Shorrocks, B. & Coates, D. 1993. The release of genetically-engineered organisms. *British Ecological Society*. - *Ecological Issues* No. 4. s.1-45.
- Singer, M. & Berg, P. 1991. *Genes and genomes*, University Science Books. - Blackwells Scientific Publications, USA.
- Smith, C.L., Warburton, P.E., Gaal, A. & Cantor, C.R. 1986. Analysis of genome organization and rearrangements by pulsed field gradient gel electrophoresis. - s. 45-70 i *Genetic Engineering*. Plenum Press, New York, Vol. 8.
- Smith, D.R. 1991. African bees in the Americas: insights from biography and genetics. - *Trends Ecol. Evol.* 6: 17-21.
- Southern, E.M., Anand, R., Brown, W.R.A. & Fletcher, D.S. 1987. A model for the separation of large DNA molecules by crossed field gel electrophoresis. - *Nucl. Acids Res.* 15: 5925-5943.
- Stenseth, C. 1991. Biologisk bekjempelse av skadedyr på veksthusgrønnsaker. - *SFFL Norsk landbruksforskning suppl.* 10: 33-35.
- Sturchler, D. 1989. How much malaria is there Worldwide? - *Parasitology Today* 5: 39.
- Sutherland, W.J. 1996. *Ecological census techniques - A handbook*. Cambridge University Press, England, UK.
- Sukopp, H. & Sukopp, U. 1993. Ecological long-term effects og cultigens becoming feral and of naturalization of non-invasive species. - *Experientia* 40: 438-442.
- Svalbjørg, A. 1996. Gjør kål på metallforurensning. - *N&M Bulletin* 14: 6.
- Swanson, M.E., Martin, M.J., O'Connell, J.K., Hoover, K., Lago, W., Huntress, V., Parsons, C.T., Pinckert, C.J., Pidler, S. & Logan, J.D. 1992. Production of functional human haemoglobin in transgenic swine. - *Bio/Technology* 10: 557-559.
- Syvanen, M. 1994. Horizontal gene transfer: Evidence and possible consequences. - *Annu. Rev. Genet.* 28: 237-261.
- Taberlet, P. & Bouvet, J. 1991. A single plucked feather as a source of DNA for bird genetic studies. - *Auk*, 108: 959-960.
- Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. - *Nucl. Acids Res.* 17: 6463-6471.
- Tepfer, M. 1993. Viral genes and transgenic plants. What are the potential environmental risks? - *Bio/Technology* 11: 1125-1132.
- Thomas, H. & Mytton, J. 1970. Mono-somic analysis of fatuoids in cultivated oat *Avena sativa*. - *Can. J. Gen. Cytol.* 12: 32-35.
- Tiedje, J.M., Colwell, R.K., Grossman, Y.L., Hodson, R.E., Lenski, R.E., Mack, R.N. & Regal, P.J. 1989. The planned introduction of genetically engineered organisms: ecological considerations and recommendations. - *Ecology* 70: 298-315.
- Timmons, A.M., O'Brian, E.T., Charters, Y.M., Dubbels, S.J. & Wilkinson, M.J. 1995. Assessing the risk of wind pollination from fields of genetically modified *Brassica napus* ssp. - *Oleifera*. *Euphytia* 85: 417-423.
- Traavik, T. 1991. Utsetting/utslipp av genmodifiserte vira (GMV): Økologiske «worst scenarios». - Økologisk risiko ved utsetting av genmodifiserte organismer i naturen, del II. DN-notat 1991 - 10, s. 9-19.

- Traavik, T. 1995. For tidlig kan være for sent .- Økologiske færemomenter ved anvendelse av nakent DNA som biologisk verktøy innen forskning, produksjon og terapi. DN-utredning Nr. 5.
- Tufto, J., Engen, S. & Hindar, K. 1996. Inferring patterns of migration from gene frequencies under equilibrium conditions. - *Genetics* 144: 1911-1921.
- Tømmerås, B.Å., Johnsen, Ø., Skrøppa, T., Hindar, K., Holten, J. & Tufto, J. 1996. Long-term environmental impacts of release of transgenic Norway spruce (*Picea abies*). - NINA*NIKU - Project Report 003: 1-48.
- Van Pijlen, I.A., Amos, B. & Dover, G.A. 1995. Patterns of genetic variability at individual minisatellite loci in minke whale *Balaenoptera acutorostrata* populations from three different oceans. - *Mol. Biol. Evol.* 12: 459-472.
- Vries, F.T. de, Meiden, R. van der & Brandenburg, W.A. 1992. Botanical Files - A study of the real chances for spontaneous gene flow from cultivated plants to the wild flora of the Netherlands. *Gorteria* Supplement 1.
- Weber, J.L. & May, P.E. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. - *Am. J. Hum. Genet.* 44: 388-396.
- Welsh, J. & McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. - *Nucl. Acids Res.* 18: 7213-7218.
- WHO 1995. Application of the principles of substantial equivalence to the safety evaluation of foods and food components from plants derived by modern biotechnology. - World Health Org., Food Safety Unit, Geneva, Switzerland.
- Williams, J.G.K., Kublelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. & Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. - *Nucl. Acids Res.* 18: 6531-6535.
- Williamson, M. 1988. Potential effects of recombinant DNA organisms on ecosystems and their componenets. *Trends Biotech.* 6: S32-35.
- Woodwark, M., Penman, D. & McAndrew, B. 1994. Genetic modification of fish - A UK perspective - Department of the Environment - Research Report no. 2. - Genetically Modified Organisms Research Report.
- Wright, G., Carver, A., Cottom, D., Reeves, D., Scott, A., Simons, P., Wilmut, I., Garner, I. & Colman, A. 1991. High level expression of active human α_1 -antitrypsin in the milk. - *Bio/Technology* 9: 830-834.
- Yoder, J.I. & Goldbrough, A.P. 1994. Transformation systems for generating marker-free transgenic plants. - *Bio/Technology* 12: 263-267.
- Zhang, T.Y., Smith, C.L. & Cantor, C.R. 1991. Secondary pulsed field gel electrophoresis: a new method for faster separation of larger DNA molecules. - *Nucl. Acids Res.* 19: 1291-1296.

ISSN 0802-4103
ISBN 82-426-0805-9

476

NINA
OPPDRAGS-
MELDING

NINA Hovedkontor
Tungasletta 2
7005 TRONDHEIM
Telefon: 73 58 05 00
Telefax: 73 91 54 33

NINA
Norsk institutt
for naturforskning