

PĀRSKATS PAR LATVIJAS REPUBLIKAS ZEMKOPĪBAS MINISTRIJAS
LAUKU ATBALSTA DIENESTA ZINĀTNISKĀ PROJEKTA

**“AR JAUNĀM ĢENĒTISKO MODIFIKĀCIJU METODĒM
IEGŪTU PĀRTIKAS, DZĪVNIEKU BARĪBAS UN TO
PIEDEVU NOTEIKŠANA UN ŠĀDU PRODUKTU
ZINĀTNISKĀ RISKĀ NOVĒRTĒJUMS”**

NORISI 2020. GADĀ

RĪGA, 2020

Satura rādītājs

Saīsinājumu saraksts	4
KOPSAVILKUMS	6
Projekta mērķis, uzdevumi un 2020. gadā paveiktā darba apraksts	7
Literatūras analīze par jaunākajām ģenētisko modifikāciju metodēm organismiem, kas tiek izmantoti pārtikas un dzīvnieku barības un to piedevu ražošanā	11
1. Problēmas aktualitāte	11
2. Saitspecifiskās nukleāzes genoma rediģēšanai un to riska novērtējums.....	15
2.1. Ievads. Jaunās selekcijas metodes Eiropas Savienībā	17
2.2. Saitspecifiskās nukleāzes 1, 2 un 3	18
2.3. Galvenie saitspecifisko nukleāžu veidi.....	19
2.4. Saitspecifiskās nukleāzes un to pielietojums genoma rediģēšanā.....	25
2.5. Saitspecifisko nukleāžu riska novērtējums atbilstoši to darbības veidam.....	27
2.6. SDN-3 riska novērtējums	28
2.7. Secinājumi par SDN-1, SDN-2 un ODM	29
3. Gēnu dziņi un to iespējamais pielietojums lauksaimniecībā.....	31
4. EUGINIUS datu bāzē esošās informācijas analīze par genomiski rediģētiem organismiem. 38	
4.1. Genomiski rediģētais rapsis "5715" jeb "SU Canola"	40
4.2. Genomiski rediģētais rapsis "CLB-1"	43
4.3. Genomiski rediģētie kartupeļi "PPO_KO potato"	46
4.4. Genomiski rediģētā soja "FAD2KO Soybean"	49
4.5. Genomiski rediģētā soja "FAD3KO Soybean"	52
4.6. Genomiski rediģētie kvieši "MLO_KO Wheat"	55
4.7. Genomiski rediģētie kartupeļi "GE-Vinv Potato"	58
4.8. Genomiski rediģētā kukurūzas "BHB Hi-Yield Maize"	62
4.9. Genomiski rediģētā kukurūza "CRISPR-Cas Waxy Corn"	69
5. Detekcijā izmantojamās metodes	73
5.1. Detekcijā izmantojamo metožu īss raksturojums.....	73
5.2. ddPQR optimizācija, lai noteiktu α -gliadīna gēnu kopiju skaita variācijas mutantos un genomiski rediģētos poliploīdos kviešos	75
5.3. DNS sekvenēšanas pielietojuma iespējas genoma rediģēšanas detekcijā	82
6. Ar jaunām ģenētisko modifikāciju metodēm iegūto organismu zinātniskā riska analīze	95
6.1. Ievads	95

6.2. Gēnu dziņu riska novērtēšanas specifika	97
6.3. Secinājumi.....	102
Pielikumi.....	104
1. pielikums. Projekta darba grupas sanāksmes protokols	105
2. pielikums. Populārzinātnisks raksts.....	108
3. pielikums. Ielūgums un semināra programma 2020. gada 12. martā	112
4. pielikums. Ielūgums un semināra programma 2020. gada 3. novembrī	114
5. pielikums. Semināru dalībnieku viedoklis par jaunajām genoma rediģēšanas tehnoloģijām	116
6. pielikums. Respondentu atbilžu apkopojums.....	121

Saīsinājumu saraksts

AHAS	acetohidroksiskābes sintāze
ALS	acetolaktāta sintāze
ASV	Amerikas Savienotās Valstis
BIOR	Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskais institūts "BIOR"
Cas	Ar CRISPR saistītas nukleāzes
CIS	<i>cold-induced sweetening</i>
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
DHPLC	Denaturing High Performance Liquid Chromatography
ddPQR	<i>droplet digital PCR</i>
dPQR	digitālā polimerāzes ķēdes reakcija
DSBs	<i>double-strand breaks</i>
EK	Eiropas Komisija
EMNs	Meganukleāzes
ENGL	<i>European Network of GMO Laboratories</i>
EPNI	Eiropas Pārtikas nekaitīguma iestāde
ES	Eiropas Savienība
ESAO	Ekonomiskās sadarbības un attīstības organizācija
EUGINIUS	<i>EUropean GMO INItiative for a Unified database System</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FDA	Food and Drug Administration
GDO	ģēnu dziņu organisms
GM	Ģenētiski modificēts
GMO	Ģenētiski modificēts organisms
GRON	<i>gene repair oligonucleotides</i>
HGSAM	<i>High Level Group of the Scientific Advice Mechanism</i>
HR	Homologā rekombinācija
HRMA	High resolution melting analysis
ISAAA	<i>International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications</i>
ISU	<i>Iowa State University</i>
JRC	<i>Joint Research Centre</i>
LAD	Lauku atbalsta dienests
LMO	<i>living modified organism</i>
MEDEA	<i>Maternal Effect Dominant Embryonic Arrest</i>
NGS	<i>next generation sequencing</i>
NHEJ	nehomologā DNS galu savienošana
ODM	<i>oligonucleotide directed mutagenesis</i>
PQR	Polimerāzes ķēdes reakcija
PEG	polietilēnglikols
PPO	polifenoloksidāze
PVD	Pārtikas un veterinārais dienests
RASFF	<i>Rapid Alert System for Food and Feed</i>
RdDM	RNS atkarīgā DNS metilācija
RE-PCR	<i>Restriction enzyme digestion suppressed PCR</i>

RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
RL-PKR	reālā laika polimerāze ķēdes reakcija
RNAi	RNS interference
RVD	<i>repeat-variable di-residue</i>
SCCS	<i>Scientific Committee on Consumer Safety</i>
SCENIHR	<i>Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks</i>
SCHER	<i>Scientific Committee on Health and Environmental Risks, SCHER</i>
SDN	<i>site-directed nuclease</i>
SNV	<i>single nucleotide variation</i>
SSCP	<i>single-stranded conformation polymorphism</i>
TALE	<i>transcription activator-like effector</i>
TALENs	<i>transcription activator- like effector nucleases</i>
USDA APHIS	<i>United States Department of Agriculture Animal and Plant Health Inspection Service</i>
VAAD	Valsts Augu aizsardzības dienests
VInv	Vakuolārā invertāze
WHO	<i>World Health Organization</i>
ZFNs	<i>zinc finger nucleases</i>
ZM	Zemkopības ministrija

KOPSAVILKUMS

PĀRSKATS PAR LATVIJAS REPUBLIKAS ZEMKOPĪBAS MINISTRIJAS LAUKU ATBALSTA

DIENESTA ZINĀTNISKĀ PROJEKTA

„AR JAUNĀM ĢENĒTISKO MODIFIKĀCIJU METODĒM IEGŪTU PĀRTIKAS, DZĪVNIĒKU

BARĪBAS UN TO PIEDEVU NOTEIKŠANA UN ŠĀDU PRODUKTU ZINĀTNISKĀ RISKĀ

NOVĒRTĒJUMS”

NORISI 2020. GADĀ

Projekta mērķis ir ar jaunām ģenētisko modifikāciju metodēm iegūtu pārtikas produktu, dzīvnieku barības un to piedevu diagnostisko metožu un iespējamo risku novērtēšana Latvijā. Viens no darba uzdevumiem 2020. gadā bija veikt diagnostikas iespēju izpēti un zinātniskā riska analīzi organismiem, kas iegūti ar jaunajām mutaģenēzes metodēm. Projekta sākumā tika izvēlēti potenciālie modificēto organismu piemēri, kas tuvākajos gados varētu būt aktuāli Eiropas Savienības un Latvijas tautsaimniecībai. Lai veiktu šo uzdevumu, tika izmantota datu bāze EUGINIUS. Tika konstatēts, ka lielākoties augu genoma rediģēšanā ir izmantotas transkripcijas aktivatoriem līdzīgās efektornukleāzes (TALEN), RNS vadītas saitspecifiskās nukleāzes ar CRISPR/Cas sistēmu, cinka pirkstu nukleāzes, meganukleāzes, oligonukleotīdu vadīta mutaģenēze, un saitspecifiskā mutaģenēze. Tādēļ projekta ietvaros tika sagatavots apraksts par saitspecifiskām nukleāzēm un to riska novērtējums, kā arī izvēlēti genomiski rediģētu kultūraugu apraksti (rapsis, kartupeļi, soja, kvieši, kukurūza). Pirmā darba uzdevuma ietvaros tika veikta ar jaunām ģenētisko modifikāciju metodēm iegūto organismu diagnostikas iespēju izpēte. Paralēli tika veikta izvēlēto organismu zinātniskā riska analīze, veicot teorētisku iespējamo apdraudējumu (*hazards*) identificēšanu cilvēku un dzīvnieku veselībai un apkārtējai videi, iespējamo apdraudējumu varbūtību un sekas, apdraudējumu ekspozīciju un atbilstošo risku.

Otrs 2020. gada darba uzdevums bija veikt zinātniskā riska analīzi organismiem, kas iegūti ar mutaģenēzes metodēm un tādām jaunajām tehnoloģijām kā gēnu dziņi (*gene drive*) un citām jaunajām augu selekcijas metodēm (*new plant breeding techniques*) atbilstoši Latvijas tautsaimniecības vajadzībām. Gēnu dziņu sistēmu pielietojums lauksaimniecībā var būt saistīts ar nezāļu populāciju ierobežošanu, kā arī ar augu kaitēkļu populāciju ierobežošanu. Vairākas gēnu dziņu sistēmas ir izstrādātas punktspārnu augļmušas *Drosophila suzuki* ierobežošanai. Par šo tēmu projekta ietvaros tika sagatavots un publicēts populārzinātnisks raksts. Projekta aktivitātes ietvaros tika organizēti divi semināri dažādu tautsaimniecības nozaru pārstāvjiem, zinātniekiem, nevalstiskajām organizācijām un lēmumpieņēmējiem, lai iepazīstinātu ar šīm tehnoloģijām, uzzinātu šo ieinteresēto pušu viedokli par tām, tai skaitā par iespējamiem ieguvumiem, zaudējumiem un izaicinājumiem, ko varētu radīt šādi organismi Latvijas tautsaimniecībai un videi.

Projekta mērķis, uzdevumi un 2020. gadā paveiktā darba apraksts

Projekta mērķis

Projekta mērķis – ar jaunām ģenētisko modifikāciju metodēm iegūtu pārtikas produktu, dzīvnieku barības un to piedevu diagnostisko metožu un iespējamo risku novērtēšana Latvijā.

Projekta mērķa realizācija nodrošinās Latvijas gatavību veikt minēto pārtikas produktu diagnostiku, konstatējot šādu produktu kravas uz robežas, kā arī dažādu aizdomu gadījumos, lai nepieļautu patērētāju maldināšanu, veselības apdraudējumu vai iespējamo kaitējumu Latvijas videi.

Projekta realizācijai izvirzītie darba uzdevumi

Uzdevumi 2020. gadam:

1. Veikt diagnostikas iespēju izpēti un zinātniskā riska analīzi organismiem, kas iegūti ar jaunajām mutaģenēzes metodēm. Projekta sākumā tika izvēlēti potenciālie modificēto organismu piemēri, kas tuvākajos gados varētu būt aktuāli Latvijas tautsaimniecībai. Tālākajā darbā tika veikta šo organismu diagnostikas iespēju izpēte, izsverot gan iespējamās pieejamās metodoloģiskos risinājumus uz vietas Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskajā institūtā "BIOR", gan arī iespējas atsevišķus diagnostikas posmus veikt citās Latvijas vai citu valstu laboratorijās. Paralēli tiks veikta izvēlēto organismu zinātniskā riska analīze, veicot teorētisku iespējamo apdraudējumu (*hazards*) identificēšanu cilvēku un dzīvnieku veselībai un apkārtējai videi, iespējamo apdraudējumu varbūtību un sekas, ekspozīciju un atbilstošo risku. Diagnostikas iespēju izpētes un zinātniskā riska analīzes rezultāti tiks iekļauti projekta pirmā gada atskaitē.

2. Veikt zinātniskā riska analīzi organismiem, kas iegūti ar mutaģenēzes metodēm un tādām jaunajām tehnoloģijām kā *gene drive* un citām jaunajām audzēšanas metodēm (*new plant breeding techniques*) atbilstoši Latvijas tautsaimniecībai. Šīs aktivitātes ietvaros tika organizēti divi semināri dažādu tautsaimniecības nozaru pārstāvjiem, zinātniekiem, nevalstiskajām organizācijām un lēmumpieņēmējiem, lai iepazīstinātu ar šīm tehnoloģijām, uzzinātu šo ieinteresēto pušu viedokli par tām, tai skaitā par iespējamiem ieguvumiem, zaudējumiem un izaicinājumiem, ko varētu radīt šādi organismi Latvijas tautsaimniecībai un videi. Iegūtā informācija tika iekļauta projekta pirmā gada atskaitē. Šīs aktivitātes ietvaros ir sagatavots populārzinātnisks raksts.

Uzdevumi 2021. gadam:

3. Veikt ekspozīcijas novērtējumu atbilstoši aktuālajai situācijai - eksperimentāla situācijas novērtēšana, pārtikas un dzīvnieku barības un to piedevu paraugiem, kas iegūti mazumtirdzniecībā un no dzīvnieku barības ražotājiem, nosakot kvalitatīvu un kvantitatīvu

ĢMO klātbūtni. Genomiski rediģētie organismi tiks analizēti pēc literatūras datiem, bet ekspozīcija tiks noteikta tradicionālajiem ĢMO un ĢMM.

4. Ekspozīcijas novērtējumā pēc nepieciešamības izmantot jaunas zinātniski analītiskās metodes, kas nākotnē būs pielietojamas arī genomiski rediģētu organismu noteikšanā – digitālā PQR, uz sekvenēšanu balstītas metodes, kā arī modeļorganismus ar delēciju un nukleotīdu nomaīņu mutācijām genomā.

5. Risku vadības rekomendāciju izstrāde. Projekta noslēgumā tiks veikta ar jaunām ģenētisko modifikāciju metodēm iegūtu pārtikas, dzīvnieku barības un to piedevu riska vadības rekomendāciju izstrāde lēmumpieņēmējiem.

Plānotais projekta realizācijas grafiks ir dots 1. tabulā, bet projekta darba grupa un tās dalībnieku darba uzdevumi 2020. gadā ir doti 2. tabulā.

1.tabula

Plānotais projekta realizācijas grafiks

Darba uzdevumi	Realizācijas laiks							
	2020				2021			
	I cet.	II cet.	III cet.	IV cet.	I cet.	II cet.	III cet.	IV cet.
1.uzdevums								
2.uzdevums								
3.uzdevums								
4.uzdevums								
5.uzdevums								

2.tabula

Projekta darba grupa un tās dalībnieku darba uzdevumi 2020. gadā

Vārds, uzvārds	Amats, zinātniskais grāds	Darba slodze (procentos) un konkrētie pienākumi
Lelde Grantiņa – Ieviņa	Projekta vadītāja, vadošā pētniece, Dr. biol.	30%; Zinātniskā projekta vispārējā vadība, darba mērķu un uzdevumu noteikšana un korekcija atbilstoši projekta realizācijas gaitai, sanāksmju un semināru organizēšana, zinātniskās literatūras analīze, eksperimentālā darba plānošana un realizācijas kontrole, zinātnisko pārskatu sagatavošana atbilstoši projekta mērķim un uzdevumiem, zinātnisko un populārzinātnisko publikāciju sagatavošana.

Vārds, uzvārds	Amats, zinātniskais grāds	Darba slodze (procentos) un konkrētie pienākumi
Nils Rostoks	Projekta eksperts, vadošais pētnieks, Dr. biol.	30%; dalība projekta sanāksmēs un semināros, darba mērķu un uzdevumu noteikšana un korekcija atbilstoši projekta realizācijas gaitai, zinātniskās literatūras analīze, eksperimentālā darba plānošana (sekvenču analīze), līdzdalība zinātnisko pārskatu sagatavošanā atbilstoši projekta mērķim un uzdevumiem, zinātnisko un populārzinātnisko publikāciju sagatavošana.
Juris Ķibilds	Projekta eksperts, pētnieks, LU un BIOR doktorantūras students	20%; dalība projekta sanāksmēs un semināros, darba mērķu un uzdevumu noteikšana un korekcija atbilstoši projekta realizācijas gaitai, zinātniskās literatūras analīze, eksperimentālā darba plānošana (paraugu sagatavošana sekvenēšanai, sekvenēšana, sekvenču analīze), līdzdalība zinātnisko pārskatu sagatavošanā atbilstoši projekta mērķim un uzdevumiem, zinātnisko publikāciju sagatavošana.
Aija Jēriņa	Projekta eksperte, vadošā pētniece	30%; dalība projekta sanāksmēs un semināros, darba mērķu un uzdevumu noteikšana un korekcija atbilstoši projekta realizācijas gaitai, zinātniskās literatūras analīze, eksperimentālā darba plānošana (paraugu sagatavošana sekvenēšanai, sekvenēšana, sekvenču analīze), līdzdalība zinātnisko pārskatu sagatavošanā atbilstoši projekta mērķim un uzdevumiem, zinātnisko un populārzinātnisko publikāciju sagatavošana.
Elizabete Miltiņa	Maģistrantūras students	30%; dalība projekta sanāksmēs un semināros, zinātniskās literatūras analīze, eksperimentālā darba plānošana (paraugu sagatavošana digitālajai PCR vai sekvenēšanai, reakciju veikšana), līdzdalība zinātnisko pārskatu sagatavošanā atbilstoši projekta mērķim un uzdevumiem, dalība zinātnisko un populārzinātnisko publikāciju sagatavošanā.

Projekta aktivitātes 2020. gadā

1. Projekta darba koordinēšana elektroniskajā vidē, projekta darba koordinēšanas sanāksmes klātienē projekta BIOR ekspertiem, kā arī, sanāksme attālināti 2. jūnijā visai projekta komandai (1. pielikums).
2. Literatūras analīze par saitspecifiskām nukleāzēm genoma rediģēšanai un to riska novērtējumu, par gēnu dziņiem (*gene drives*) un to iespējamo pielietojumu lauksaimniecībā, par EUGINIUS datu bāzē esošajiem genomiskajiem organismiem, par genomiski rediģētu organismu riska analīzi, kā arī detekcijā izmantojamo metožu raksturojumu.
3. Populārzinātniska raksta sagatavošana "Potenciāli jauns kaitēklis Latvijas augļu dārzos punktspārnu augļmuša *Drosophila suzuki* un tā ierobežošanas iespējas nākotnē ar gēnu rediģēšanas palīdzību" (2. pielikums).

4. Semināru organizēšana 12.03.2020. (3. pielikums) un 03.11.2020. (4. pielikums). Šo semināru laikā dalībniekiem tika izplatītas anketas, lai uzzinātu dažādu ieinteresēto pušu viedokli par jaunajām ģenētisko modifikāciju metodēm, tai skaitā par iespējamām ieguvumiem, zaudējumiem un izaicinājumiem, ko varētu radīt ar šīm metodēm iegūti organismi Latvijas tautsaimniecībai un videi. No anketām iegūto viedokļu apkopojums ir dots 5. pielikumā, bet respondentu atbildes ir dotas 6. pielikumā.

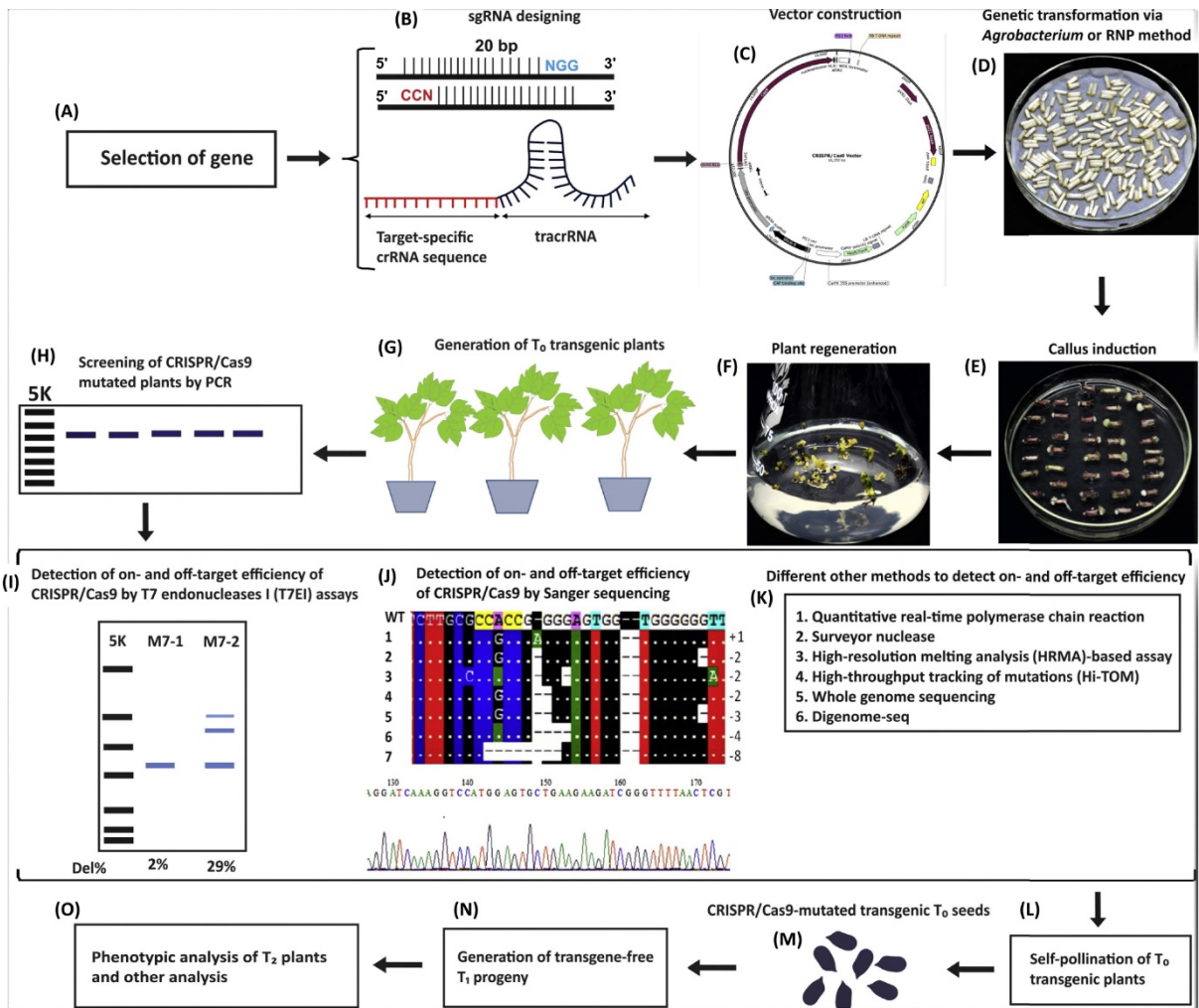
Literatūras analīze par jaunākajām ģenētisko modifikāciju metodēm organismiem, kas tiek izmantoti pārtikas un dzīvnieku barības un to piedevu ražošanā

1. Problēmas aktualitāte

Ģenētiski modificētu organismu (ĢMO) izplatīšanu vidē, kā arī ģenētiski modificētas (ĢM) pārtikas un dzīvnieku barības izplatīšanu Eiropas Savienības (ES) tirgū nosaka direktīva 2001/18/EC, kā arī Regulas 1829/2003 un 1830/2003. Direktīva 2001/18/EC ir pārņemta Latvijas Republikas likumdošanā kā Ģenētiski modificēto organismu aprites likums no 15.11.2007. ar labojumiem un uz tā pamata izdotiem Ministru kabineta noteikumiem Nr.457 "Noteikumi par ĢMO apzinātu izplatīšanu". 2018. gada 25. jūlijā Eiropas Kopienas Tiesa lēma, ka organismi, kas iegūti ar jaunām mutaģenēzes metodēm, tas ir, ar genoma rediģēšanu, atšķirībā no konvencionālajām mutaģenēzes metodēm, "kuras ir bieži izmantotas un kurām ir ilgas drošas lietošanas vēsture", nav atbrīvotas no tiesību aktiem, kas attiecas uz ĢMO (European Court of Justice, 2018).

Pie jaunām genoma rediģēšanas metodēm pieskaitāmas tādas kā atkārtotu palindromisku sekvenču un starpsekvenču sakopojumu (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*, CRISPR) un ar tiem saistīto nukleāžu (Cas) izmantošana, oligonukleotīdu vadīta mutaģenēze (*oligonucleotide directed mutagenesis*, ODMs), meganukleāzes (EMNs), cinka pirkstu nukleāzes (*zinc finger nucleases*, ZFNs), un transkripcijas aktivatoriem līdzīgās efektoru nukleāzes (*transcription activator-like effector nucleases*, TALENs) (ENGL, 2019). Ar CRISPR/Cas ģenētiski transformētu augu izveides process attēlots 1. attēlā. Šīs jaunās tehnoloģijas sniedz iespēju mainīt ģenētisko informāciju un izmainīt gēnu ekspresiju organismos ātrākā un precīzākā veidā. Šādas gēnu modifikācijas var būt atsevišķas delēcijas, insercijas vai nukleotīdu nomaiņas dabiski eksistējošā DNS vai RNS molekulā (Agapito-Tenfen et al., 2018). Tās var būt arī kā garāku sekvenču ievietošana vai delēcija. Ar CRISPR/Cas sistēmas palīdzību iespējams radīt gēnu dziņu (*gene drive*) organismus, kas no klasiskajiem ĢMO atšķiras ar to, ka izmainītā pazīme iedzimst vairāk nekā 50 % no pēcnācēju, un arī tādos gadījumos, kad nav selektīvā spiediena (Rüdelshaim and Smets, 2018).

Vēl pie jaunajām augu selekcijas tehnoloģijām (*new plant breeding techniques*) pieskaitāmas tādas metodes kā cisģenēze, RNS atkarīgā DNS metilēšana, potēšana gadījumos, kad izmanto ne-ĢM potzaru uz ĢM potcelma, reversā selekcija un agro-infiltrācija (European Commission, 2019). Atsevišķos gadījumos genoma rediģēšanu pieskaita pie sintētiskās bioloģijas metodēm.

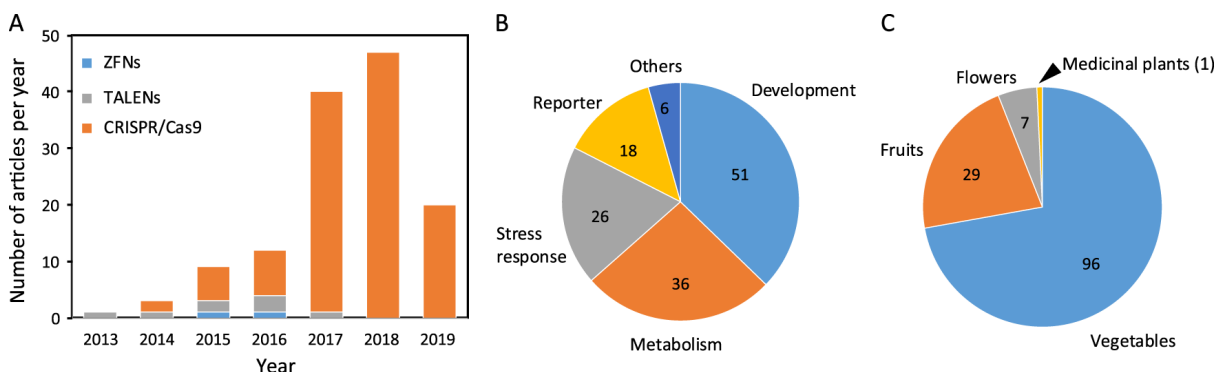


Trends in Plant Science

1.attēls. Ar CRISPR/Cas palīdzību veiktas augu ģenētiskās transformācijas gaita, sākot ar gēna izvēli līdz auga analīzei. (A) Mērķa gēna izvēle. (B) Mērķa gēnam specifiskas single-guide RNS (sgRNA) izveide. (C) Vektora izveide. (D) Ģenētiska transformēšana ar *Agrobacterium*/ribonukleoproteīnu (RNP) CRISPR/Cas sistēmas ienesēi. (E) Audu kultūra (kallusu inducēšana). (F) Augu reģenerācija no CRISPR/Cas izmainītiem audiem. (G) Ar CRISPR/Cas izmainītu transgēno augu T₀ paaudze. (H) Transgēno augu skrīnings ar PĶR. (I) Ar CRISPR/Cas izmainīto augu mērķa un ne-mērķa efektivitātes noteikšana ar T7E1. (J) Mērķa un ne-mērķa efektivitātes noteikšana ar Sangeru sekvenēšanu. (K) Dažādas metodes mērķa un ne-mērķa efektivitātes noteikšanai. (L) T₀ transgēno augu pašapputē, lai iegūtu homozigotiskus T₁ augus. (M) Ar CRISPR/Cas izmainīto augu T₀ sēklas. (N) No transgēna brīvu T₁ pēcnācēju ieguve. (O) T₁ augu fenotipiskais raksturojums un citas analīzes (pēc Manghwar et al., 2019).

Pēdējos gados ar CRISPR, TALEN un ZFN tehnoloģiju ir radīti daudzi lauksaimniecības kultūraugi un dekoratīvie augi (2. attēls). Dominējošā ir CRISPR tehnoloģija, lielākā daļa (72 %) modifikāciju ir veikta dārzeņu kultūrām, bet ir modificēti arī dekoratīvie augi un augi ar medicīnisku nozīmi. No dārzeņu kultūrām visbiežāk tiek modificēti tomāti (*Solanum lycopersicum*), kartupeļi (*Solanum tuberosum*), rapsis (*Brassica napus*), kā arī vīnogulāji (*Vitis vinifera*), apelsīni (*Citrus sinensis*), greipfrūti (*Citrus paradisi*), banāni (*Musa balbisiana* un

Musa acuminata), arbūzi (*Citrullus lanatus*) un zemenes (*Fragaria vesca* un *Fragaria x Ananassa*) (Xu et al., 2019).



2.attēls. **A** Publikāciju skaits laika periodā 01.01.2013.-31.05.2019., kurās ir aprakstīti ar CRISPR, TALEN un ZFN tehnoloģijām radīti lauksaimniecības kultūraugi un dekoratīvie augi. **B** Zinātnisko publikāciju skaits, kurās rediģētie gēni galvenokārt bija saistīti ar attīstību, metabolismu, stresa izturību un citām funkcijām. **C** Zinātnisko publikāciju skaits ar gēnu rediģēšanu sadalījumā pa dažādām augu grupām (Xu et al., 2019).

Datu bāzē <http://plantcrispr.org> ir apkopota informācija par genomiski rediģētiem tomātiem, zemenēm, tabaku (*Nicotiana benthamiana*), rīsiem (*Oryza sativa*), lucernu (*Medicago truncatula*), fizāļiem, manioku (*Manihot esculenta*) un *Brachypodium distachyon*. Būtisks daudzums informācijas par augiem, kas iegūti ar genoma rediģēšanas metodēm, ir apkopota International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA) datu bāzē: <http://www.isaaa.org/resources/genomeediting/default.asp>.

Tuvākajos 10 gados ES tirgu varētu sasniegt, piemēram, lini ar medicīnā izmantojamām šķiedrām, augi ar ievietotu B12 vitamīnu sintēzes ceļu (Deery et al., 2012), labība ar samazinātu glutēna saturu (Sánchez-León et al., 2018), kultūraugi ar izmainītu polinepiesātināto taukskābju saturu, augi ar kompleksām radītām īpašībām – imunitāti, izturību pret nevēlamām apkārtējās vides apstākļiem u.c. (De la Concepcion et al., 2019).

Klasiskajiem ĢMO, kas ir reģistrēti ES izmantošanai pārtikā, barībā, cita veida pārstrādē un audzēšanai, pietiecinājās izstrādā, un Kopienas References laboratorija par ĢMO (*Joint Research Centre*) validē atbilstošās noteikšanas metodes, kas balstītas uz PCR. Pašlaik ES nav Kopienas References laboratorijas apstiprinātu metožu, ar kurām būtu iespējams detektēt organismus, kas iegūti ar genoma rediģēšanas metodēm. No zinātniskajām publikācijām šajā jomā secināms, ka metodes šādu organismu noteikšanai būs balstītas uz jaunās paaudzes sekvenēšanas tehnoloģijām (*next generation sequencing*, NGS). Tomēr varētu būt iespējams izmantot arī metodes, kas balstītas uz PCR reakcijām tādos gadījumos, kad ir veiktas garākas nukleotīdu izmaiņas, kā arī īsāku sekvenču un pat atsevišķu nukleotīdu izmaiņu gadījumā, ja vien veiktās izmaiņas ir zināmas un ir pieejama atbilstoša references sekvenca. Problēmas varētu būt ar kvantitatīvu noteikšanu, it sevišķi jauktā sastāva produktiem pie ES nepieciešamajiem sliekšņiem: 0.1 % un 0.9 %. Homogēniem paraugiem var izmantot Sangera tipa sekvenēšanu, bet jauktā sastāva paraugiem varētu būt piemērotākas metodes, kas balstītas uz NGS – vairākkārtēja konkrēta fragmenta sekvenēšana vai mērķētā dziļā sekvenēšana. NGS gadījumā nav nepieciešamas iepriekšējas zināšanas par veiktajām

izmaiņām genomā. Iegūtās sekvences tiek salīdzinātas ar attiecīgā organisma references sekvencēm, kas pieejamas datu bāzēs (Grohmann et al., 2019).

Atsauces

Agapito-Tenfen SZ, Okoli AS, Bernstein MJ, Wikmark O-G and Myhr AI. 2018. Revisiting Risk Governance of GM Plants: The Need to Consider New and Emerging Gene-Editing Techniques. *Front. Plant Sci.* 9:1874. doi: 10.3389/fpls.2018.01874

Deery, E., Schroeder, S., Lawrence, A. et al. 2012. An enzyme-trap approach allows isolation of intermediates in cobalamin biosynthesis. *Nat Chem Biol* 8, 933–940. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1086>

De la Concepcion JC, Franceschetti M, Terauchi R, Kamoun S, Banfield MJ. 2019. Protein engineering expands the effector recognition profile of a rice NLR immune receptor. *bioRxiv* 611152; doi: <https://doi.org/10.1101/611152>

European Commission. 2019. New plant breeding techniques, [https://www.europarl.europa.eu/RegData/etudes/BRIE/2019/642235/EPRS_BRI\(2019\)642235_EN.pdf](https://www.europarl.europa.eu/RegData/etudes/BRIE/2019/642235/EPRS_BRI(2019)642235_EN.pdf).

European Court of Justice, C-528/16 - Judgement of 25 July 2018. See: <http://curia.europa.eu/juris/document/document.jsf?docid=204387&mode=req&pageId=ndex=1&dir=&occ=first&part=1&text=&doclang=EN&cid=515140>.

European Network of GMO Laboratories (ENGL), Detection of food and feed plant products obtained by new mutagenesis techniques, 26 March 2019 (JRC116289)

Grohmann L, Keilwagen J, Duensing N, Dagand E, Hartung F, Wilhelm R, Bendiek J, Sprink T 2019. Detection and Identification of Genome Editing in Plants: Challenges and Opportunities. *Front. Plant Sci.* 10:236. doi: 10.3389/fpls.2019.00236

Manghwar H., Lindsey K., Zhang X., Jin S. 2019. CRISPR/Cas System: Recent Advances and Future Prospects for Genome Editing. *Trends in Plant Science*, 24(12): 1102-1125.

Rüdelshheim P.L.J., Smets G. 2018. Gene Drives - Experience with gene drive systems that may inform an environmental risk assessment. *COGEM Report CGM 2018-03*

Sánchez-León, S., Gil-Humanes, J., Ozuna, C. V., Giménez, M. J., Sousa, C., Voytas, D. F., & Barro, F. 2018. Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. *Plant biotechnology journal*, 16(4), 902–910. doi:10.1111/pbi.12837

Xu, J., Hua, K. & Lang, Z. 2019. Genome editing for horticultural crop improvement. *Hortic Res* 6, 113

2. Saitspecifiskās nukleāzes genoma rediģēšanai un to riska novērtējums

Saskaņā ar Eiropas Veselības un pārtikas drošības Komisāra pasūtīto ziņojumu par jaunajām metodēm lauksaimniecības biotehnoloģijā (High Level Group of Scientific Advisors, 2017) saitspecifiskās nukleāzes (angl. *site-directed nuclease*, SDN) ir enzīmi, kas veido saitspecifiskus divpavedienu DNS pārrāvumus noteiktās sekvences vietās. SDN tipiski atpazīst noteiktu DNS sekvenci un šķeļ DNS šajā vietā vai tuvumā. DNS mērķa sekvences atpazīšanu nodrošina vai nu pati proteīna molekula (proteīnu virzītās SDN), vai arī asociētā RNS molekula (RNS virzītās SDN). Apskata sagatavošanai par pamatu izmantots Eiropas pārtikas nekaitīguma iestādes (EPNI, angl. *European Food Safety Authority*, EFSA) atzinums par drošības novērtējumu augiem, kas veidoti izmantojot Zn pirkstu nukleāzes 3 (ZFN-3) un citas saitspecifiskās nukleāzes ar līdzīgu funkciju (EFSA 2012b), Eiropas Komisijas ekspertu sagatavotais ziņojums par jaunajām metodēm lauksaimniecības biotehnoloģijā (High Level Group of Scientific Advisors, 2017), kā arī 2020. g. pieņemtais EPNI zinātniskais atzinums par SDN-1, SDN-2 un ODM metodēm (EFSA 2020). Aprakstā izmantoto terminu skaidrojums ir dots 3. tabulā.

3.tabula

Aprakstā izmantoto terminu skaidrojums (High Level Group of Scientific Advisors, 2017)

Termins angļu val.	Termins latviešu val.	Skaidrojums
Endonuclease	Endonukleāze	Enzīms, kas šķeļ DNS molekulas fosfodiēstersaiti, izveidojot pārrāvumu. Skat. saitspecifiskā nukleāze.
Exogenous DNA Foreign DNA	Ārējā DNS Svešā DNS	DNS, kas radusies vai izveidota ārpus konkrētā organisma, kura var nonākt organismā dabiski, vai ar tehniskas iejaukšanās palīdzību.
Filler DNA	Pildījuma DNS	DNS fragmenti, kas var nejauši kalpot par matricu divpavedienu DNS pārrāvumu reparācijas laikā, izmantojot homologijas vadīto reparācijas mehānismu.
Homology-directed repair	Homoloģijas vadīta reparācija	Šūnas process, kura laikā tiek laboti (reparēti) divpavedienu DNS pārrāvumi. Visizplatītākā homologijas vadītās reparācijas forma ir homologā rekombinācija. Homoloģijas vadītā reparācija var notikt tikai tad, ja ir pieejams līdzīgs vai identisks DNS fragments, kuru iespējams izmantot kā matricu. Ja homologs DNS fragments nav pieejams, tad divpavedienu DNS pārrāvumu iespējams salabot procesā, kas saucas nehomologā galu savienošana. Saīsinājumi – homologijas vadītā reparācija (<i>HDR</i>), nehomologā galu savienošana (<i>non-homologous end joining</i> , <i>NHEJ</i>).
Non-homologous	Nehomologā galu savienošana	Šūnas process, kurā divpavedienu DNS pārrāvums tiek salabots (reparēts) tieši ligējot DNS pavedienu galus. Atšķirībā no homologijas vadītās reparācijas, šis

Termins angļu val.	Termins latviešu val.	Skaidrojums
end joining (NHEJ)		process var notikt arī tad, ja nav pieejama homologa matricas DNS. Nehomologā galu savienošana var reparēt pārrāvumu precīzi, taču var notikt arī neprecīza reparācija, kas noved pie atsevišķu nukleotīdu zaudēšanas. Ja ir notikuši vairāki divpavedienu DNS pārrāvumi, nehomologā galu savienošana var savienot 'nepareizos' galus, t.i., bāzu pārus, kuri līdz tam nebija savienoti.
Off-target mutation	Nemērķa mutācija	Jebkura izmaiņa genomā attiecībā pret savvaļas tipa genoma sekvenci, kas notikusi genoma vietā, kas netika plānota. Nemērķa mutācijas var atgadīties genoma vietās ar identisku vai mērķa sekvencei līdzīgu sekvenci. Šīs mutācijas var būt klusējošas (nav saistītas ar izmaiņām fenotipā), vai nu tādēļ, ka mutētā DNS sekvence nekodē proteīnu, vai arī tādēļ, ka tā neizmaina kodējošās sekvences funkciju.
Site-directed nuclease (SDN)	Saitspecifiskā nukleāze	Enzīms (endonukleāze), kas rada sekvences (saita) specifiskus divpavedienu DNS pārrāvumus noteiktās genoma vietās. SDN tipiski atpazīst noteiktas DNS sekvences un šķeļ DNS molekulu vai nu šajā sekvencē, vai netālu no tās. Molekulārā līmenī mērķa sekvenci var atpazīt proteīna molekula (proteīna vadītās SDN), vai arī vadošā (<i>guide</i>) RNS molekula (RNS vadītās SDN). Dabā sastopamas un biotehnoloģijā pielietotas proteīnu vadītās SDN, piemēram, ir restrikcijas enzīmi un meganukleāzes. Ir izveidotas dažādas mākslīgas proteīnu vadītās SDN, kurās nukleāzes domēns, kas nepieciešams DNS šķelšanai ir saistīts ar DNS saistīšanas domēnu, kas atpazīst noteiktas DNS sekvences, piemēram, cinka pirkstu nukleāzes (ZFN) un transkripcijas aktivatoriem līdzīgās efektornukleāzes (TALEN). Proteīnu vadīto SDN pielietojumam lielākais izaicinājums ir nepieciešamība veidot jaunu proteīna molekulu katrai mērķa DNS sekvencei, kas parasti ir ilgstošs un ne vienmēr sekmīgs process. RNS vadīto SDN piemērs dabā ir CRISPR-Cas sistēma. To veido proteīna modulis, kas ietver nukleāzi, kurš saista vadošo RNS, kuras sekvence ir tā, kas vada nukleāzi uz komplementārās DNS sekvences atrašanās vietu genomā. RNS vadītās SDN izveidošana noteiktai DNS mērķa sekvencei prasa tikai jaunas vadošās RNS molekulas izveidošanu, kas ir daudz vienkāršāks un efektīvāks process.

2.1. Ievads. Jaunās selekcijas metodes Eiropas Savienībā

Eiropas Savienībā liela uzmanība tiek pievērsta jaunu tehnoloģiju attīstībai visās jomās, tai skaitā arī lauksaimniecībā un augu un dzīvnieku selekcijā¹. Ņemot vērā lauksaimniecības biotehnoloģijas plašo izplatību pasaulē, komerciālo produktu pieejamību, kā arī zinātnisko progresu jaunu metožu izveidē ES jau 2011. g. tika nodefinētas jomas, kurām jāpievērš pastiprināta uzmanība, it īpaši saistībā ar ES ĢMO likumdošanas ietvara piemērotību jauno tehnoloģiju regulēšanā (JRC 2011):

1. Oligonukleotīdu virzītā mutāģenēze (angl. *Oligonucleotide Directed Mutagenesis*, ODM);
2. Cinka pirkstu nukleāžu tehnoloģija (angl. *Zinc Finger Nuclease Technology*, ZFN) kas ietver 3 dažādus variantus - ZFN 1, ZFN 2 un ZFN 3;
3. Cisģenēze un intraģenēze;
4. Potēšana uz potcelma;
5. Agro infiltrācija;
6. RNS atkarīgā DNS metilācija (RdDM);
7. Atgriezeniskā selekcija;
8. Sintētiskā genomika.

2012. gadā EPNI publicēja divus zinātniskos atzinumus par cisģenēzes un intraģenēzes (EFSA 2012a), kā arī par saitspecifisko nukleāžu 3 (SDN-3) riska novērtējumu (EFSA 2012b). 2014. un 2015. gadā trīs EK zinātniskās komitejas – Veselības un vides risku zinātniskā komiteja (angl. *Scientific Committee on Health and Environmental Risks*, SCHER), Jauno un nesen identificēto veselības risku zinātniskā komiteja (angl. *Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks*, SCENIHR) un Patērētāju drošības zinātniskā komiteja (angl. *Scientific Committee on Consumer Safety*, SCCS) - sagatavoja vēl trīs atzinumus par sintētisko bioloģiju pievēršot īpašu uzmanību sintētiskās bioloģijas ietvaram un definīcijai², riska novērtēšanas metodoloģijai³, kā arī drošības aspektiem un pētniecības prioritātēm⁴. 2017. g. aprīlī Eiropas Komisijas Zinātniskā atbalsta mehānisma augsta līmeņa grupa (angl. *High Level Group of the Scientific Advice Mechanism*, HG SAM) publicēja Paskaidrojošo ziņojumu 02/2017 “New Techniques in Agricultural Biotechnology”, kurā sniedza pārskatu par jaunajām tehnoloģijām, kā arī salīdzinājumu gan ar konvencionālo selekciju, gan ar esošajām ģenētiskās modifikācijas metodēm (High Level Group of Scientific Advisors, 2017).

Vienlaicīgi ES turpinājās tiesas process, kura iniciatori bija *Confédération paysanne* un *Conseil d'État* (Francija), kura mērķis bija noskaidrot, vai organismi, kas iegūti ar mutāģenēzes palīdzību, ir ĢMO, un vai uz tiem attiecas tās pašas prasības, kas uz ĢMO saskaņā ar ĢMO direktīvu⁵. 2018. g. 25. jūlijā tika pieņemts tiesas spriedums⁶, kurā norādīts, ka ar mutāģenēzi

¹ https://ec.europa.eu/food/plant/gmo/modern_biotech_en

² https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/docs/scenihr_o_044.pdf

³ https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/docs/scenihr_o_048.pdf

⁴ https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/docs/scenihr_o_050.pdf

⁵ <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32001L0018>

⁶ <https://curia.europa.eu/jcms/upload/docs/application/pdf/2018-07/cp180111en.pdf>

iegūti organismi ir ĢMO un uz tiem attiecas ĢMO direktīva. Tiesas spriedumā gan norādīts, ka ĢMO direktīva neattiecas uz organismiem, kas iegūti ar konvencionāli pielietotām mutagēzes metodēm, kuras laika gaitā ir apliecinājušas savu drošību. Tomēr tiesas spriedums dod rīcības brīvību dalībvalstīm lemt par ĢMO direktīvas piemērošanu organismiem, kas iegūti ar konvencionālās (radiācijas, ķīmiskās un tml.) mutagēzes palīdzību. Vienlaicīgi ES dalībvalstīs nav vienota viedokļa par šī lēmuma interpretāciju un, piemēram, Francijā ir “viedoklis”, ka ir jānošķir *in vivo* un *in vitro* mutagēze. Tādējādi *in vitro* mutagēze, kas veikta izmantojot ķīmiskos savienojumus, vai radiāciju būtu pakļauta ĢMO Direktīvai 2001/18/EC. Pret šo viedokli izsakās daudzas citas dalībvalstis, kā arī zinātniskās biedrības tai pašā Francijā, jo šim dalījumam nav zinātniskā pamatojuma, turklāt tā praktiska ieviešana nozīmētu, ka liela daļa selekcijā izmantoto šķirņu un selekcijas līniju tiktu klasificēti kā ĢMO, jo tie kādā brīdī ir bijuši pakļauti mutagēnu iedarbībai (Bartsch et al. 2020).

ES tiesas spriedums mutagēzes jautājuma izraisīja neizpratni un sašutumu zinātnieku vidū gan ES (Editorial 2018; Schulman et al. 2020), gan ārpus tās robežām. Ņemot vērā, ka vairums pasaules valstu attiecībā uz genoma rediģēšanu ar saitspecifiskajām nukleāzēm piemēro, vai gatavojas piemērot atvieglotu reģistrēšanas kārtību⁷, ES nostāja nešķiet pietiekami zinātniski pamatota (Schiemann et al. 2020). Diskusija par ES Tiesas spriedumu bija pietiekami aktīva, lai Eiropas Parlaments pieņemtu lēmumu pieprasīt Eiropas Komisijai pētījumu par šo jautājumu⁸. Savukārt Eiropas Komisija šo jautājumu tālāk novirzīja EPNI, pieprasot tai sagatavot zinātnisko atzinumu par jaunajām genomikas metodēm⁹. Līdztekus tam, EPNI pārziņā ir arī vairāki citi atzinumi, kas saistīti ar jaunajām genoma rediģēšanas metodēm, sintētisko bioloģiju un gēnu dziņu (angl. *drive*) organismiem.

Šajā pārskatā tiks apskatītas saitspecifiskās nukleāzes (SDN) balstoties uz EPNI atzinumu par drošības novērtējumu augiem, kas veidoti izmantojot Zn pirkstu nukleāzes 3 un citas saitspecifiskās nukleāzes ar līdzīgu funkciju (EFSA 2012b), Eiropas Komisijas ekspertu sagatavoto ziņojumu par jaunajām metodēm lauksaimniecības biotehnoloģijā (High Level Group of Scientific Advisors, 2017), kā arī 2020. g. publicēto EPNI zinātnisko atzinumu par SDN-1, SDN-2 un ODM metodēm (EFSA 2020, melnraksts pieejams¹⁰).

2.2. Saitspecifiskās nukleāzes 1, 2 un 3

Saitspecifiskās nukleāzes ir apkopojošs nosaukums enzīmiem, kuriem piemīt spēja atpazīt noteiktas DNS secības un tās šķelt. Eiropas Komisijas Augsta līmeņa zinātniskais padomdevējs 2017. g. izstrādāja dokumentu, kurā dota saitspecifisko nukleāžu darba definīcija: “*an enzyme (endonuclease) that creates site-specific double-strand breaks (DSBs)*”

⁷ <https://crispr-gene-editing-regs-tracker.geneticliteracyproject.org/>

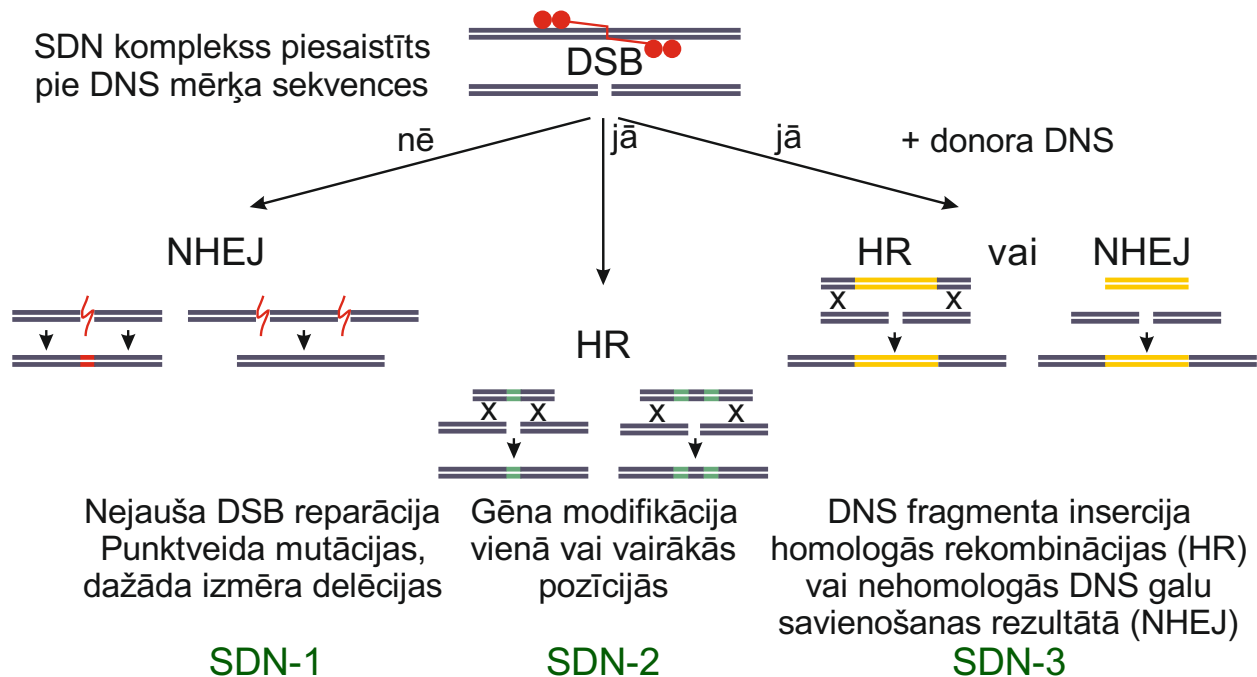
⁸ https://ec.europa.eu/food/plant/gmo/modern_biotech/new-genomic-techniques_en

⁹ EC to EFSA mandate M-2020-0016 (EFSA register of questions, <http://registerofquestions.efsa.europa.eu/roqFrontend/login?2>)

¹⁰

https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/consultation/consultation/Scientific_opinion_SDN1_2_ODM_for_PC.pdf

at defined sequences. SDN typically recognizes a specific DNA sequence and “cleaves” DNA within such a sequence or nearby. The recognition of the DNA target is mediated by the protein molecule itself (in protein-directed SDNs) or by an associated guide RNA molecule (in RNA-directed SDNs)” (High Level Group of Scientific Advisors, 2017). Saitspecifisko nukleāžu darbības scenāriji attēloti 3. attēlā.

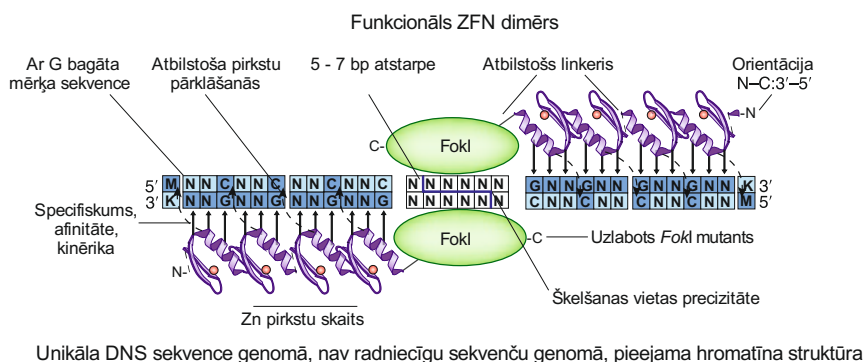


3. attēls. Saitspecifisko nukleāžu darbības scenāriji. Attēls adaptēts no (EFSA 2012b). DSB – divpavediena DNS pārrāvums (angl. *double stranded DNA break*), HR – homologā rekombinācija, NHEJ – nehomologā DNS galu savienošana (angl. *non-homologous end joining*).

2.3. Galvenie saitspecifisko nukleāžu veidi

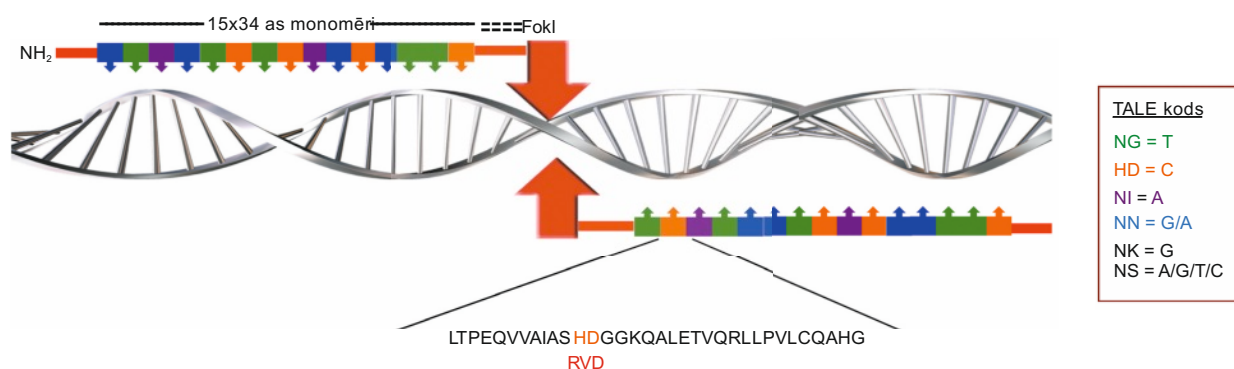
Saitspecifiskās endonukleāzes jeb baktēriju restrikcijas enzīmi bija pazīstamas jau no 20. gadsimta 70-tajiem gadiem, taču to specifiskums lielākoties ir nepietiekams, lai veiktu izmaiņas lielos un kompleksos genomos. Vēloties uzlabot SDN specifiskumu, sākotnēji zinātnieki izveidoja mākslīgus enzīmus, kas saturēja DNS saistīšanās domēnu vai nu no cinka pirkstu transkripcijas faktoriem (cinka pirkstu nukleāzes, angl. *zinc finger nucleases*, ZFN), vai no baktēriju transkripcijas aktivatoriem līdzīgajiem efektorproteīniem (transkripcijas aktivatoram līdzīgās efektor-nukleāzes, angl. *transcription activator-like effector nucleases*, TALEN), bet DNS šķelšanas domēnu no baktērijas *Flavobacterium okeanoikoites* IIS tipa restrikcijas endonukleāzes *FokI*. Mākslīgi izveidotajiem enzīmiem DNS saistīšanās specifiskumu bija iespējams mainīt ar proteīnu inženierijas palīdzību. ZFN saistīšanās specifiskums ir atkarīgs no Zn pirkstu proteīnu domēna, pie kam katrs no šiem domēniem spēj specifiski atpazīt 3 nukleotīdus DNS molekulā, un vairākus šos domēnus iespējams apvienot

vienā proteīna molekulā. Tipiskā variantā viena ZFN molekula satur četrus Zn pirkstu domēnus, kas kopā atpazīst 12 nukleotīdus garu DNS sekvenci. Par cik ZFN ir aktīvi dimēru formā, kopējais atpazīto nukleotīdu sekvences garums var būt 24 nukleotīdi (skat. 4. attēlu).



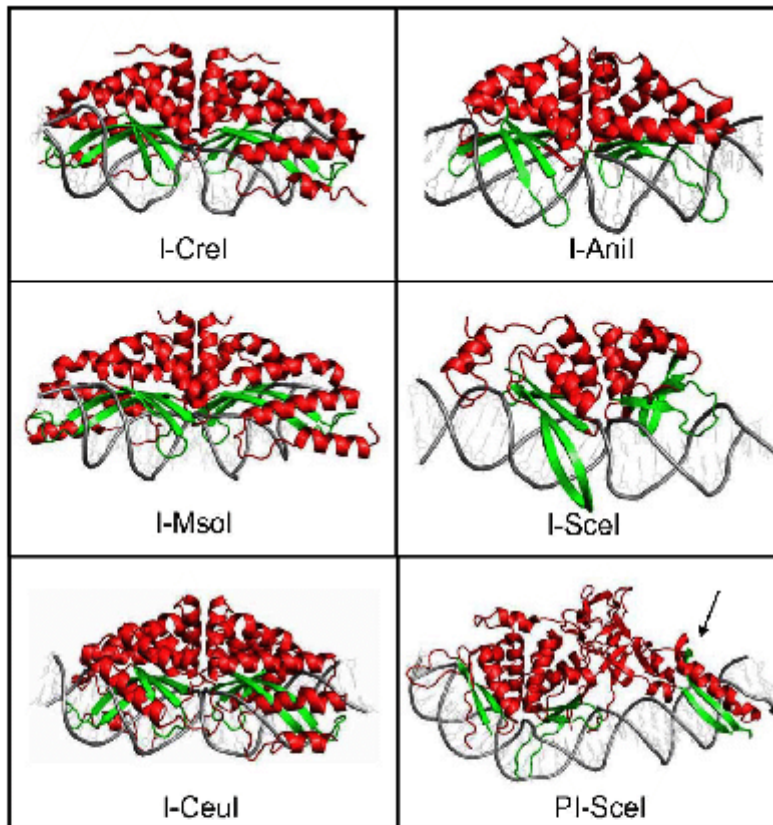
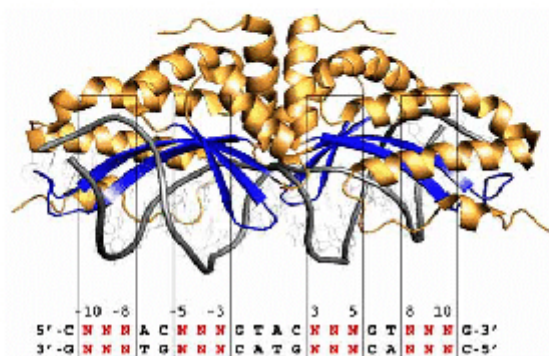
4.attēls. ZFN DNS atpazīšanas un šķelšanas shēma, kurā norādīti galvenie tehniskie izaicinājumi ZFN veidošanā (adaptēts no Isalan (2012)). Pie divpavedienu DNS molekulas saistās ZFN dimērs, kura katrs monomērs satur četrus cinka pirkstu domēnus un vienu *FokI* DNS šķelšanas domēnu. DNS sekvences, kas saista cinka pirkstu domēnus, ir iekrāsotas zilā krāsā, bet svarīgākie nukleotīdi – tumši zilā krāsā.

TALEN savukārti ir cilvēka veidoti enzīmi, kuri sastāv no *FokI* DNS šķelšanas domēna un baktēriju TALE (angl. *transcription activator-like effector*) domēna. TALE domēns ir raksturīgs augiem patogēnajām baktērijām, kuras infekcijas procesa laikā pārnes auga šūnās TALE proteīnus, kuri, darbojoties kā transkripcijas faktori, piesaistās pie promoteriem augu genomā un izmaina auga transkriptomu, padarot augus uzņēmīgus pret baktēriju infekciju. TALE proteīniem ir centrālais DNS saistīšanās domēns, kas sastāv no 16 – 20 reizes atkārtotiem 34 aminoskābes gariem monomēriem. Šie monomēri ir ļoti konservatīvi, izņemot hipervariablos 12 un 13 aminoskābju atlikumus (angl. *repeat-variable di-residue*, RVD). Dažādas RVD aminoskābju kombinācijas atpazīst dažādus nukleotīdus DNS sekvencē, veidojot tā saucamo TALE kodu, piemēram, RVD, kas satur NI, HD, NG un NN aminoskābju atlikumus atpazīst attiecīgi adenoziņa, citoziņa, timīna un guanīna vai adenoziņa nukleotīdus (Curtin et al. 2012). TALEN DNS atpazīšanas un šķelšanas shēma dota 5. attēlā.



5.attēls. TALEN DNS atpazīšanas un šķelšanas shēma (adaptēts no Carlson et al. (2012)). Pie divpavedienu DNS saistās TALEN dimērs, kura katrs monomērs satur 15 gabalus 34 aminoskābes garus DNS saistīšanas domēnus, kuriem katram ir divu aminoskābju motīvs (angl. *repeat variable diresidue*, RVD), kas atpazīst noteiktu DNS nukleotīdu. Labajā pusē norādīts DNS nukleotīdu atpazīšanas kods.

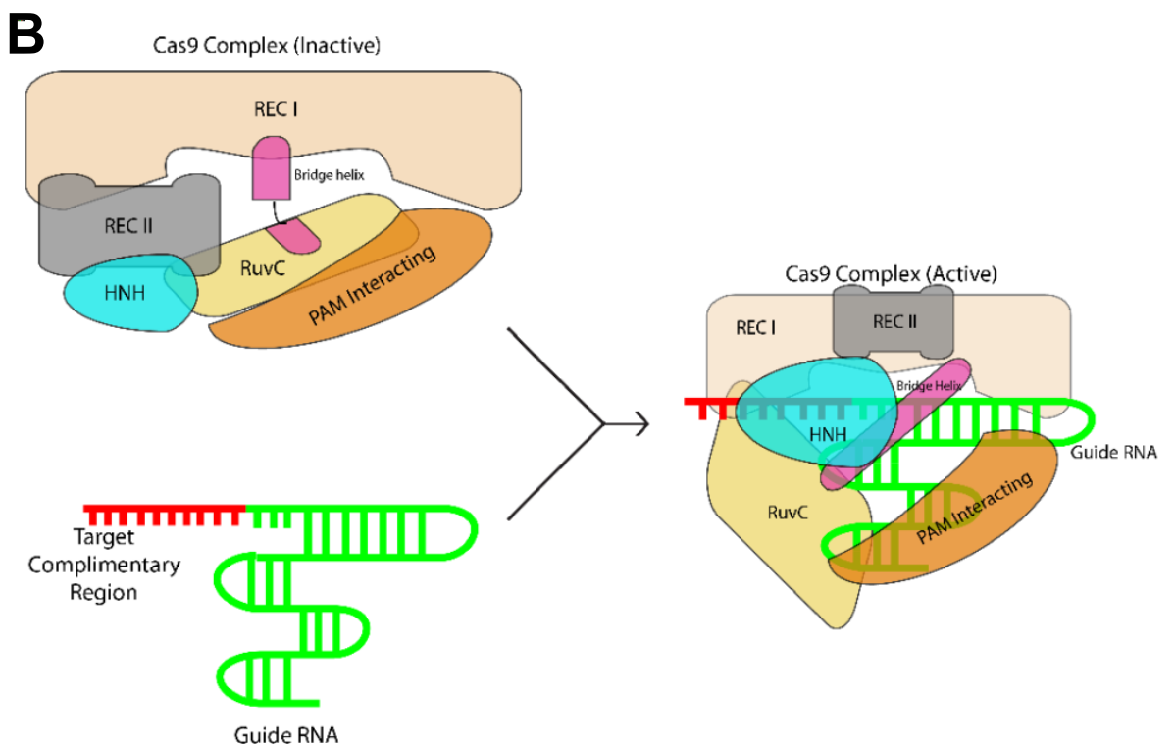
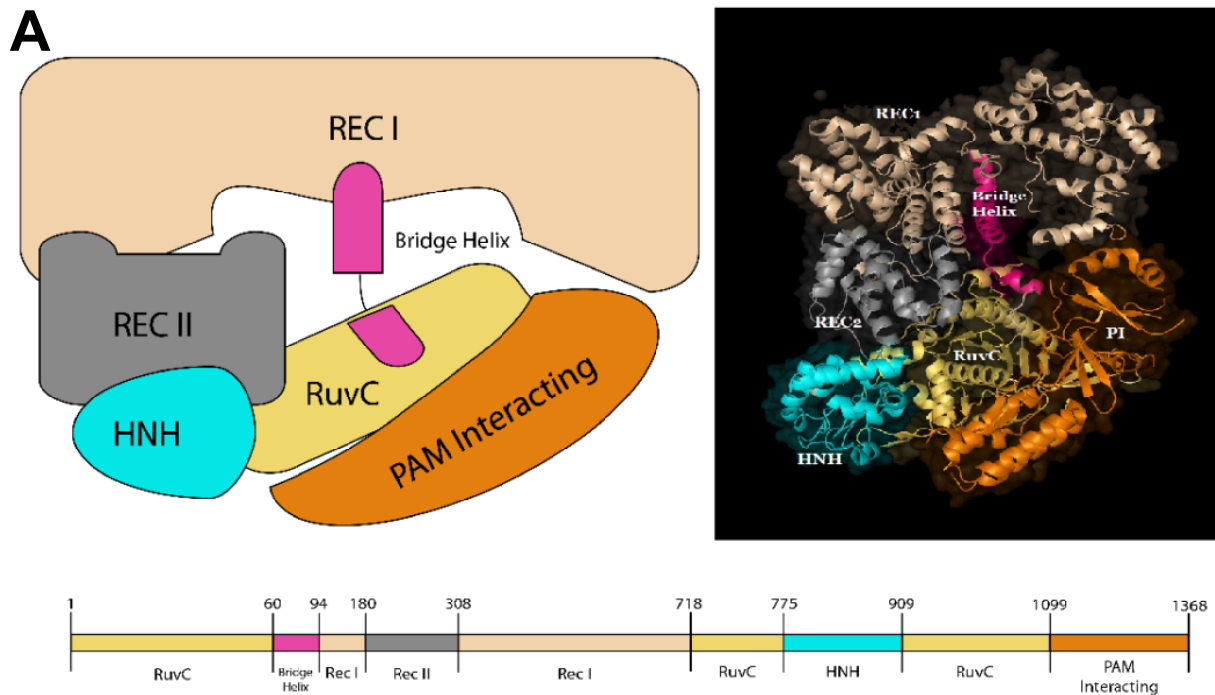
Tāpat daudzās eikariotisko organismu sugās, piemēram, maizes raugā ir sastopami enzīmi, meganukleāzes vai LAGLIDADG endonukleāzes, kuru kodējošās sekvences atrodas intronos vai inteīnos (Arnould et al. 2011). LAGLIDADG meganukleāzes var būt gan homodimēriski enzīmi, piemēram, I-Crel no aļģes *Chlamydomonas reinhardtii* hloroplastu genoma, kas saistās pie palindromiskām DNS sekvencēm genomā, gan monomēriski enzīmi ar diviem domēniem, piemēram, I-Scel no maizes rauga *Saccharomyces cerevisiae* mitohondriju genoma, kas saistās pie nepalindromiskām sekvencēm. Atšķirībā no ZFN un TALEN, meganukleāzēm nav skaidri nodalīti DNS saistīšanās un DNS šķelšanas domēni (Curtin et al. 2012). Dažādu LAGLIDADG meganukleāžu un to DNS mērķsekvenču saistīšanās shēma dota 6. attēlā.

A**B**

6.attēls. Dažādu LAGLIDADG meganukleāžu un to DNS mērķsekvenču saistīšanās shēma (A) un I-Crel meganukleāzes struktūras motīvi, kas būtiski mērķsekvenču saistīšanai (B) (adaptēts no Paques and Duchateau (2007)). A - I-Crel – intronā kodētā meganukleāze no aļģes *Chlamydomonas reinhardtii* hloroplastu genoma; I-Anil – intronā kodētā meganukleāze no sēnes *Aspergillus nidulans* mitohondriju genoma; I-Msol – intronā kodētā meganukleāze no aļģes *Monomastix* sp. hloroplastu genoma; I-Scel – intronā kodētā meganukleāze no maizes rauga *Saccharomyces cerevisiae* mitohondriju genoma; I-Ceul - intronā kodētā meganukleāze no aļģes *Chlamydomonas eugametos* hloroplastu genoma; PI-Scel – inteīna meganukleāze no maizes rauga *Saccharomyces cerevisiae* VMA ATPāzes gēna. I-Crel, I-Msol un I-Ceul proteīni saista DNS homodimēra formā, bet I-Anil, I-Scel un PI-Scel saista DNS monomēra formā. Šai meganukleāžu grupai raksturīgā proteīnu struktūra ababba ir iekrāsota zaļā krāsā. Šajā kompaktajā struktūrā katalītiskais DNS šķelšanas domēns ir ievietots divās DNS saistīšanas virsmās, ko veido ababba struktūras. Monomērajiem proteīniem ir saglabājusies

homodimēru simetriskā struktūra, bet to primārās sekvenses ir ļoti atšķirīgas. PI-SceI inteīnam ir papildus proteīnu splaisīngā domēns, kuram ir papildus RNS saistīšanās virsma (norādīta ar bultiņu). B - I-CreI meganukleāzes DNS saistīšanās domēni, kuriem var mainīt DNS saistīšanās specifiskumu, ir apvilkti. Apvilkti ir arī simetriskie nukleotīdu tripleti palindromiskajā DNS sekvencē, kuru saista proteīna homodimērs. Dažādām tripleteu sekvencēm iespējams izveidot atbilstošus DNS saistīšanās domēnus proteīnā.

Lai izveidotu ZFN, TALEN un meganukleāzes, kas spēj sašķelt noteiktas DNS sekvenses, tika izmantotas proteīnu inženierijas un mākslīgās evolūcijas metodes. Tomēr šo SDN specifiskums bija salīdzinoši ierobežots, turklāt katras jaunas DNS sekvenses šķelšanai bija jāveido jauns enzīms. 2012. gadā parādījās jauna RNS virzīta (angl. *RNA-directed*) SDN tehnoloģija, kas pazīstama arī kā CRISPR-Cas sistēma (angl. *Clustered Regularly Interspersed Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated nuclease*) (Jinek et al. 2012). CRISPR-Cas sistēma ir baktēriju adaptīvās imūnās sistēmas sastāvdaļa, kas ļauj tām atpazīt un sašķelt iepriekš sastaptas bakteriofāgu un plazmīdu molekulas. Atpazīšana balstās uz CRISPR atkārtojumu kodētās crRNS molekulas mijiedarbību ar mērķa DNS molekulu bāzu pāru formā (Marraffini and Sontheimer 2010). Šo crRNS ir iespējams aizstāt ar sgRNS (angl. *single guide*), kas ir komplementāra vēlamajai mērķa DNS sekvencei. Tādējādi dažādu DNS šķelšanas specifiskumu ir iespējams iegūt ar dažādu sgRNS molekulu palīdzību un vienu un to pašu Cas nukleāzi (7. attēls). Biežāk izmantotā ir Cas9 nukleāze no baktērijas *Streptococcus pyogenes*, taču CRISPR-Cas sistēma ir sastopama daudzās baktēriju sugās un attiecīgi ir pieejamas daudzas Cas līdzīgas nukleāzes, kas atšķiras ar DNS šķelšanas īpašībām, saistīšanās specifiskumu un tml. (Komor et al. 2017).



7.attēls. CRISPR-Cas sistēmas Cas9 proteīna struktūra (A) un DNS saistīšanās shēma kompleksā ar sgRNA (B) (attēls adaptēts no <https://sites.tufts.edu/crispr/crispr-mechanism/>). A panelī parādīta Cas9 proteīna struktūra, kas sastāv no 6 domēniem: Rec I, Rec II, tilta spirāle (angl. *bridge helix*), RuvC, HNH un PAM mijiedarbības domēns. B panelī parādīta Cas9 proteīna aktivācija, kas notiek saistoties ar sgRNA molekulu, kuras rezultātā notiek Cas9 konformācijas izmaiņas (Jinek et al. 2014).

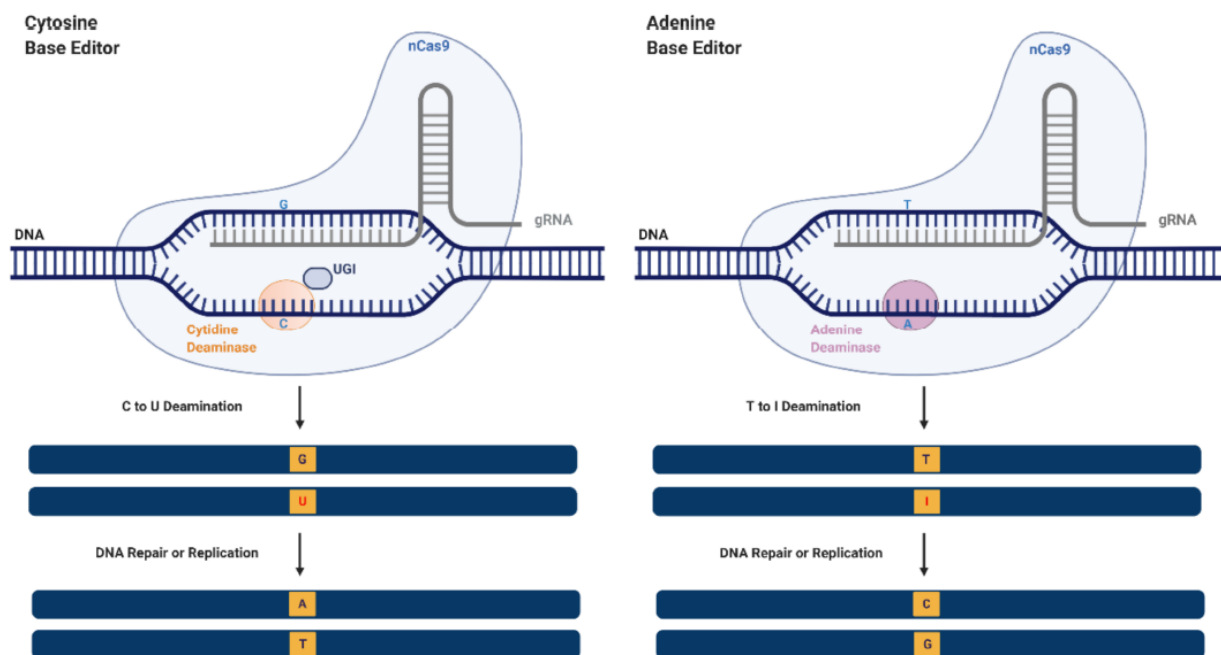
2.4. Saitspecifiskās nukleāzes un to pielietojums genoma rediģēšanā

Dažāda veida SDN ir iespējams pielietot visos trijos genoma modificēšanas scenārijos (1. attēls). Piemēram, SDN-3 scenārijam atbilst pētījums, kurā kukurūzas genomā noteiktā vietā *IPK1* lokusā, kas kodē inozitola-1,3,4,5,6-pentakisfosfāta kināzi, izmantojot ZFN, tika ievietots *PAT* gēns, kas kodē enzīmu fosfinotricīna acetiltransferāzi. Tādējādi tika panākta kukurūzas tolerance pret amonija glufosināta herbicīdiem, un vienlaicīgi tika samazināts fitātu daudzums kukurūzas graudos, jo IPK katalizē galveno soli fitāta biosintēzē. (Shukla et al. 2009). Jāpiezīmē, ka izmantojot SDN-3 scenāriju, tiek iegūti transgēni vai ģenētiski modificēti augi. SDN-1 un SDN-2 scenāriji tiek uzskatīti par genoma rediģēšanu jeb mutāģenēzes paveidu, kuru rezultātā genomos noteiktā vietā izmantojot šūnas reparācijas sistēmas tiek izveidotas nelielas delēcijas, insercijas vai nukleotīdu nomainas. ZFN, TALEN un meganukleāzes ir iespējams izmantot arī SDN-1 un SDN2. scenārijos. Piemēram, ASV uzņēmums Calyxt ir komercializējis un uzsācis Calyno sojas eļļas ražošanu ar paaugstinātu oleīnskābes saturu¹¹. Šis un līdzīgi produkti ir sīkāk aprakstīti atskaites 4.4. un 4.5. nodaļās par *FAD2KO* un *FAD3KO* soju, kuras satur TALEN inducētas delēcijas attiecīgi *FAD2-1A* un *FAD2-1B*, vai *FAD3A* gēnos. Meganukleāžu izmantošanai genoma rediģēšanā par piemēru var kalpot Benson Hill Biosystems BHB Hi-Yield kukurūza, kura aprakstīta atskaites 4.8. nodaļā.

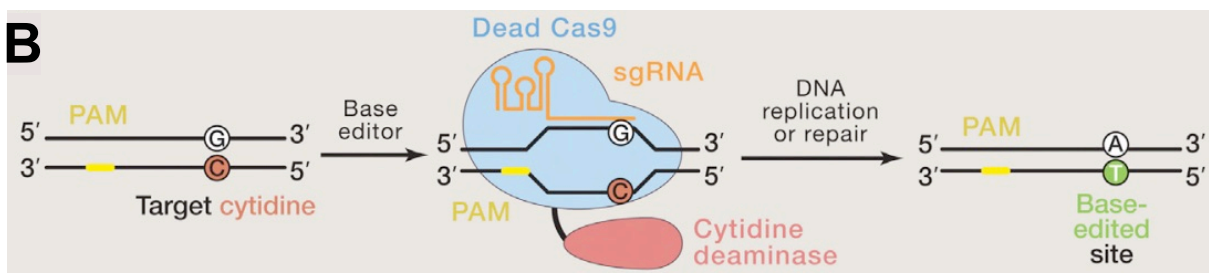
Tomēr genoma rediģēšana kļuva pieejama plašākam zinātnieku lokam tikai tad, kad parādījās CRISPR-Cas sistēmas, ka ļāva salīdzinoši vienkārši virzīt Cas9 nukleāzi uz noteiktu genoma reģionu, izmantojot komplementārās mijiedarbības ar sgRNS. Sākotnēji genoma rediģēšana tika panākta divpavedienu pārrāvumus salabot vai nu ar NHEJ (SDN-1), vai HR (SDN-2) palīdzību. Tomēr jau drīzumā parādījās Cas9 modifikācijas, kas vai nu šķēla tikai vienu DNS pavedienu (nCas9, angl. *nickase* Cas9), vai arī nešķēla nevienu DNS pavedienu (dCas9, angl. *dead* Cas9), taču saglabāja spēju piesaistīties noteiktai DNS sekvencei. Šo spēju izmantoja, piemēram, noteiktu DNS sekvenču iezīmēšanai genomā, transkripcijas aktivācijai vai epigēnētiskām modifikācijām (Komor et al. 2017; Zhang et al. 2019). Apvienojot Cas9 enzīmu, kas zaudējis spēju veidot dsDNS pārrāvumus, ar adenīna vai citozīna dezamināzes domēnu, tika iegūti tā saucamie bāžu redaktori (Kantor et al. 2020; Komor et al. 2016). Sākotnējie adenīna un citozīna bāžu redaktori veica citidīna dezamināciju par uracilu, vai attiecīgi timīna dezamināciju par inozīnu, kā rezultātā bija iespējams veikt visas tranzīciju mutācijas, C->T, T->C, A->G un G->A (Kantor et al. 2020; 8. attēls). Savukārt turpmākā pētnieciskā darba rezultātā tika izveidotas sistēmas, kas ļāva veikt transversiju mutācijas (pirimidīna nukleotīda nomainu par purīna nukleotīdu, vai otrādi) (Molla et al. 2020). Lai gan tehniski šie enzīmi nešķēl DNS, tie tomēr spēj veidot genomā iedzimstošas mutācijas, kas atbilst SDN-2 scenārijam. Papildus tam, nesen ir izveidota praimrediģēšanas sistēma, kas apvieno nCas9 nukleāzi ar uzlabotu reverso transkriptāzi, kas izmanto pegRNS (angl. *prime editing guide*, peg), lai vienlaicīgi atpazītu noteiktu genoma sekvenci un iekodētu noteiktas izmaiņas genomā (Anzalone et al. 2019; Kantor et al. 2020; 9. attēls). Oligonukleotīdu virzītā mutāģenēze (ODM) arī no tehniskā viedokļa nav saistīta ar divpavedienu pārrāvumu ienešanu genomā, tomēr tās veidotās mutācijas ir tādas pašas kā SDN-1 un SDN-2 scenārijā (EFSA 2020).

¹¹ <https://calyxt.com/first-commercial-sale-of-calyxt-high-oleic-soybean-oil-on-the-u-s-market/>

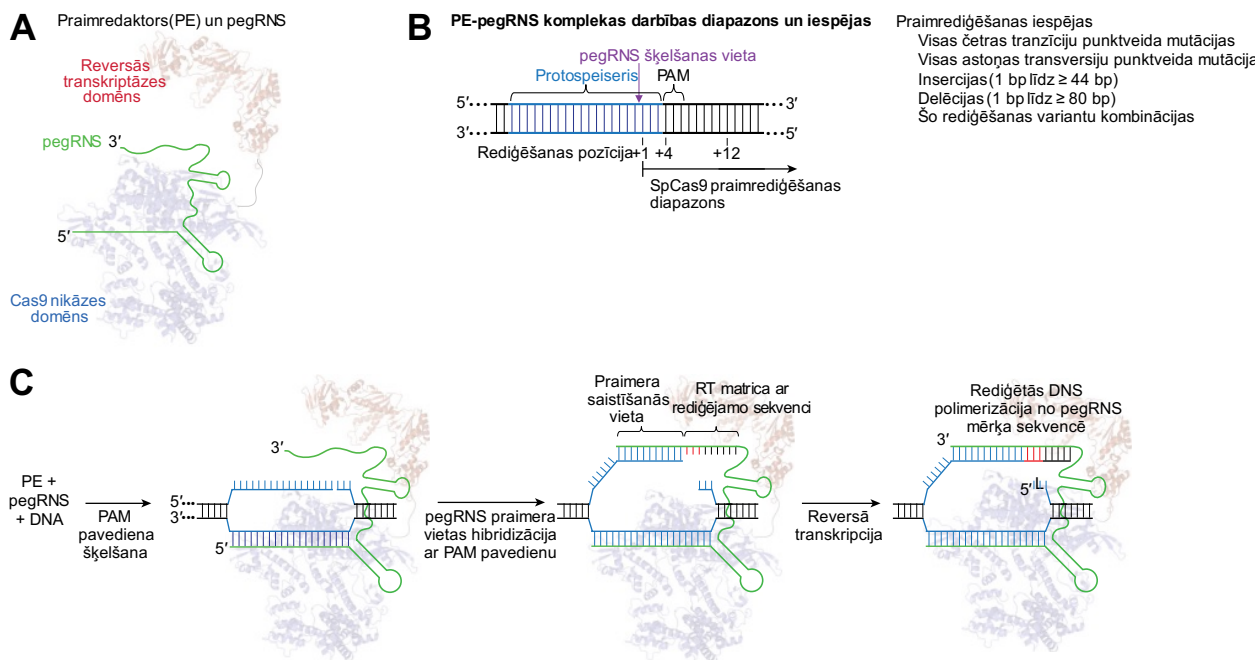
A



B



8.attēls. CRISPR-Cas9 bāzu editori un to darbības mehānisms (adaptēts no Kantor et al. (2020; Komor et al. (2017). A panelī parādīti divi galvenie bāzu editoru veidi, kas balstīti uz dCas9 kompleksu ar attiecīgi citidīna vai adenīna dezamināzēm. B panelī detalizētāk parādīts G:C bāzu pāra pārveidošana par A:T bāzu pāri izmantojot dCas9 – citidīna dezamināzes kompleksu.



9.attēls. Praimredaktoru struktūra un darbības shēma (adaptēts no Anzalone et al. (2019)). A panelis – praimrediģēšanas komplekss sastāv no nCas9 (enzīms, kas veido tikai vienpavediena DNS pārrāvumu), kuram pievienots reversās transkriptāzes domēns (spēj sintezēt DNS uz RNS matricas), kā arī pegRNS. B panelis – praimrediģēšanas kompleksa darbības mehānisms DNS līmenī, kā arī rediģēšanas veidi un diapazons. C panelis – praimrediģēšanas komplekss piesaistās pie mērķa DNS sekvences un veic vienpavediena DNS pārrāvumu PAM ķēdē. DNS 3' gals hibridizējas ar pegRNS praimera hibridizācijas saiti un kalpo par starta vietu jaunas DNS molekulas apgrieztajai transkripcijai, kas saturēs pegRNS molekulā kodēto rediģēto sekvenci.

2.5. Saitspecifisko nukleāžu riska novērtējums atbilstoši to darbības veidam

Vēsturiski pirmais ES riska novērtējums ar saitspecifisko nukleāžu palīdzību veidotiem augiem tika publicēts 2012. gadā, un tas attiecās uz augiem, kas izveidoti ar SDN-3 palīdzību (EFSA 2012b). Saskaņā ar EK mandātu šī atzinuma ietvaros tika novērtēti ar SDN-3 palīdzību veidotu augu riski cilvēka un dzīvnieku veselībai un videi, salīdzinot tos ar augiem, kas iegūti ar konvencionālās selekcijas un ģenētiskās modifikācijas metodēm, kas definētas Direktīvā 2001/18/EC. EFSA (2012b) atzinumā ir izvērtēta arī esošo EPNI ĢMO riska novērtējuma Vadlīniju piemērotība augiem, kas izveidoti ar SDN-3 metodēm. Lai arī neapšaubāmi SDN-3 augi ir uzskatāmi par ĢMO, to riska novērtējumam atkarībā no konkrētā gadījuma var būt nepieciešams mazāks datu apjoms. SDN-1 un SDN-2 riska novērtējums kļuva īpaši aktuāls pēc 2018. gada Eiropas Savienības tiesas lēmuma. 2019. gadā EPNI saņēma EK mandātu izvērtēt 1) vai EFSA (2012b) atzinuma 4. nodaļā aprakstītais riska novērtējums SDN-3 augiem pilnībā, vai daļēji, ir piemērojams arī SDN-1, SDN-2 un ODM augiem; 2) ja jā, tad izvērtēt, vai EFSA (2012b) secinājumi par SDN-3 drošību attiecas arī uz augiem, kas veidoti ar SDN-1, SDN-2 un

ODM metodēm. Jāņem vērā, ka saskaņā ar mandātu bija jāvērtē SDN-3 atzinuma 4. nodaļas piemērotība, kas pēc būtības nozīmēja, ka jāvērtē SDN-1, SDN-2 un ODM augu riski attiecībā uz cilvēka un dzīvnieku veselību un vidi, kā arī jāņem vērā salīdzinājums ar tradicionālo selekciju un parastajiem ĢMO. 2020. g. oktobrī EPNI publicēja zinātnisko atzinumu par SDN-1, SDN-2 un ODM tehnoloģiju riska novērtējumu (EFSA 2020).

2.6. SDN-3 riska novērtējums

Galvenā atšķirība no parastajiem ĢMO ir tā, ka SDN-3 metode ļauj ievietot transgēnu, intragēnu vai cisgēnu noteiktā vietā genomā. Tādējādi ir iespējams panākt, ka genomiskais konteksts, kurā tiek ievietots transgēns, intragēns vai cisgēns, nodrošina labu ievietotā gēna ekspresiju un ļauj izvairīties no nejaušas iekšējo gēnu un to regulācijas elementu inaktivācijas, kā parasto ĢMO gadījumā. No juridiskā viedokļa pievilcīga varētu likties iespēja dažādus transgēnus vienmēr ievietot vienā un tajā pašā vietā konkrētā lauksaimniecības kultūrauga genomā, tādējādi autorizācijas iegūšanai nebūs katru reizi no jauna jāraksturo insercijas vieta genomā. Galvenā bīstamība (angl. *hazard*) SDN-3 pielietošanas gadījumā ir saistīta ar izmantotajiem gēniem, šo gēnu piešķirtajām jaunajām īpašībām vai pazīmēm, kā arī ar izmaiņām recipienta auga genomā. Izmaiņas recipienta auga genomā ir ievērojami samazinātas, ņemot vērā metodes specifiskumu. Atkarībā no izmantotās SDN-3 specifiskuma pastāv iespēja, ka divpavedienu DNS pārrāvums tiks izveidots arī citā, neplānotā genoma vietā (angl. *off-target*). Šāda iespēja pastāv arī parasto ĢMO gadījumā, taču SDN-3 augu gadījumā *off-target* modifikācijas iespēja ir ievērojami samazināta, salīdzinot ar parasto ĢMO veidošanu un nespecifisko mutāģenēzi. Turklāt gadījumā, ja būs notikušas *off-target* izmaiņas genomā, tās būs tieši tādas pašas kā tradicionālajā selekcijā un tai skaitā tradicionālajā mutāģenēzē. Izvērtējot SDN-3 augu drošību, līdzīgi kā konvencionālajā selekcijā un mutāģenēzē, jāņem vērā gan izmaiņas genomā, gan organismam piešķirtās jaunās īpašības. Līdzīgi kā parasto ĢMO veidošanā, SDN-3 augu genomā var ievietot gan transgēnus, gan intra- un cisgēnus, taču no likumiskā viedokļa tam nav būtiskas nozīmes, jo uz tiem visiem attiecas ĢMO likumdošana. SDN-3 veidošanā tiek izmantotas tās pašas transformācijas metodes, kas parasto ĢMO veidošanā, taču transgēna, intragēna, vai cisgēna inserciju genomā var nodrošināt gan stabila, gan tranzienta SDN ekspresija. Stabils SDN konstrukcijas gadījumā, tā ir ievietota recipienta auga genomā, un augs ir uzskatāms par transgēnu arī attiecībā uz SDN gēna klātbūtni, taču SDN konstrukcijas no genoma ir iespējams aizvēkt izmantot ģenētisko skaldīšanos. EPNI ĢMO panelis (EFSA 2012b) uzskata, ka Vadlīnijas ĢM augu pārtikas un dzīvnieku barības risku novērtējumam (EFSA 2011), kā arī Vadlīnijas ĢM augu vides riska novērtējumam (EFSA 2010) ir pielietojamas, lai veiktu riska novērtējumu pārtikai un dzīvnieku barībai, kas iegūta no augiem, kā arī vides riska novērtējumu augiem, kas iegūta ar SDN-3 metodi. Ņemot vērā, ka būtiskākās prasības ĢM pārtikas, dzīvnieku barības un vides risku novērtējumam kopš 2012. g. ir nostiprinātas EK Īstenošanas Regulā 503/2013¹², jāatzīst, ka arī šajā Regulā noteiktās prasības ir pielietojamas SDN-3 augu riska novērtējumam. EPNI ĢMO panelis (EFSA 2012b) secināja, ka SDN-3 augu riska novērtējums veicams katram individuālam

¹² <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A32013R0503>

gadījumam atsevišķi, kā arī to, ka atsevišķos gadījumos riska novērtējumam var būt nepieciešams mazāks datu apjoms. Tādējādi SDN-3 augu riska izvērtēšanai jābūt elastīgai.

2.7. Secinājumi par SDN-1, SDN-2 un ODM

Galvenā atšķirība SDN-1 un SDN-2 augiem no SDN-3 augiem, kā arī no parastajiem ĢMO ir svešas DNS neesamība to genomā. Transgēnu, intragēnu un cisgēnu ievietošana noteiktā genoma rajonā, kā tas paredzēts SDN-3 scenārijā, nav attiecināma uz augiem, kas iegūti ar SDN-1 un SDN-2 metodēm. SDN-1 un SDN-2 metožu mērķis ir endogēno auga genoma sekvenču modificēšana noteiktā vietā. Tomēr SDN-1 un SDN-2 darbības mehānisms, līdzīgi kā SDN-3 darbības mehānisms, balstās uz divpavediena DNS pārrāvumu izveidošanu noteiktās genoma vietās, tādējādi arī SDN-1 un SDN-2 gadījumā, līdzīgi kā SDN-3 gadījumā, ir iespējamās *off-target* izmaiņas, kas atkarīgas no konkrētās izmantotās SDN specifiskuma un pielietojuma veida. Lai SDN-1 un SDN-2 augu genomos varētu veikt specifiskās, plānotās izmaiņas, tajos stabili vai tranzienti ir jāievada un jāekspresē SDN gēns(i). Ja SDN ekspresijas kasete stabili ievietota rediģētā auga genomā, tad šāds augs uzskatāms par genomiski rediģētu konkrētajā genoma vietā, bet arī par transgēnu, jo satur SDN ekspresijas kaseti, un attiecīgi šāda auga riska novērtējums jāveic saskaņā ar ES ĢMO likumdošanu ĢMO jomā. No šīs kasetes ir iespējams atbrīvoties ģenētiskās skaldīšanās ceļā. Tāpat SDN ekspresijas kasetes ir iespējams ievadīt auga šūnā uz īsu brīdi (tranzienti), vai arī šūnā ievadīt ribonukleoproteīna kompleksu, piemēram, sgRNS-Cas9.

EPNI ĢMO panelis (EFSA 2020) uzskata, ka Vadlīnijas ĢM augu pārtikas un dzīvnieku barības risku novērtējumam (EFSA 2011), kā arī Vadlīnijas ĢM augu vides riska novērtējumam (EFSA 2010) ir pietiekamas, taču tikai daļēji pielietojamas, lai veiktu riska novērtējumu pārtikai un dzīvnieku barībai, kas iegūta no augiem, kā arī vides riska novērtējumu augiem, kas iegūti ar SDN-1 un SDN-2 metodēm. Ņemot vērā, ka būtiskākās prasības ĢM pārtikas, dzīvnieku barības un vides risku novērtējumam ir nostiprinātas EK Īstenošanas Regulā 503/2013, jāatzīst, ka arī šajā regulā noteiktās prasības ir pietiekamas, taču tikai daļēji pielietojamas SDN-1 un SDN-2 augu riska novērtējumam. Visas Vadlīniju un Īstenošanas Regulas prasības, kas attiecas un transgēnu, intragēnu, vai cisgēnu klātbūtni nav attiecināmas uz SDN-1 un SDN-2 augiem. Līdzīgi kā SDN-3 augu gadījumā, arī SDN-1 un SDN-2 augu riska novērtējums jāveic katrā atsevišķā gadījumā izvērtējot nepieciešamās prasības un datu apjomu. Ņemot vērā, ka SDN-1 un SDN-2 augi nesatur transgēnus, intragēnus, vai cisgēnus, eksperimentālie dati riska novērtējumam būs pārsvarā atkarīgi no jaunizveidotās īpašības, tādējādi iespējams, ka SDN-1 un SDN-2 augu riska novērtējumam būs nepieciešams vēl mazāk datu nekā SDN-3 augiem. EPNI ĢMO panelis neatrada nekādus citus papildus bīstamības faktoros, kas atšķirtu SDN-1 un SDN-2 augus no SDN-3 augiem, kā arī no konvencionāli selekcionētiem augiem, tai skaitā ar mutaģenēzes metodēm iegūtiem augiem.

Literatūras atsauces

- High Level Group of Scientific Advisors (2017) New Techniques in Agricultural Biotechnology. European Commission, Brussels
- Anzalone AV, Randolph PB, Davis JR, Sousa AA, Koblan LW, Levy JM, Chen PJ, Wilson C, Newby GA, Raguram A, Liu DR (2019) Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature* 576:149–157
- Arnould S, Delenda C, Grizot S, Desseaux C, Paques F, Silva GH, Smith J (2011) The I-Crel meganuclease and its engineered derivatives: applications from cell modification to gene therapy. *Protein Eng Des Sel* 24:27-31
- Bartsch D, Ehlers U, Hartung F, Kahrmann J, Leggewie G, Sprink T, Wilhelm R (2020) Questions Regarding the Implementation of EU Mutagenesis Ruling in France. *Frontiers in Plant Science* 11
- Carlson DF, Fahrenkrug SC, Hackett PB (2012) Targeting DNA With Fingers and TALENs. *Mol Ther Nucleic Acids* 1:e3-e3
- Curtin SJ, Voytas DF, Stupar RM (2012) Genome engineering of crops with designer nucleases. *Plant Gen* 5:42-50
- Editorial (2018) Gene-edited plants cross European event horizon. *Nature Biotechnology* 36:776-776
- EFSA (2010) Guidance on the environmental risk assessment of genetically modified plants. *EFSA Journal* 8:1879
- EFSA (2011) Guidance for risk assessment of food and feed from genetically modified plants. *EFSA Journal* 9:2150
- EFSA (2012a) Scientific opinion addressing the safety assessment of plants developed through cisgenesis and intragenesis. *EFSA Journal* 10:2561
- EFSA (2012b) Scientific opinion addressing the safety assessment of plants developed using Zinc Finger Nuclease 3 and other Site-Directed Nucleases with similar function. *EFSA Journal* 10:2943
- EFSA (2020) Applicability of the EFSA opinion on site-directed nucleases type 3 for the safety assessment of plants developed using site-directed nucleases type 1 and 2 and oligonucleotide-directed mutagenesis. *EFSA Journal*, *in press*
- Isalan M (2012) Zinc-finger nucleases: how to play two good hands. *Nature Methods* 9:32-34
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337:816-821
- Jinek M, Jiang F, Taylor DW, Sternberg SH, Kaya E, Ma E, Anders C, Hauer M, Zhou K, Lin S, Kaplan M, Iavarone AT, Charpentier E, Nogales E, Doudna JA (2014) Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science* 343:1247997
- JRC (2011) New plant breeding techniques. State-of-the-art and prospects for commercial development. Scientific and technical reports JRC, Luxembourg
- Kantor A, McClements ME, MacLaren RE (2020) CRISPR-Cas9 DNA Base-Editing and Prime-Editing. *Int J Mol Sci* 21
- Komor AC, Badran AH, Liu DR (2017) CRISPR-Based Technologies for the Manipulation of Eukaryotic Genomes. *Cell* 168:20-36
- Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA, Liu DR (2016) Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature* 533:420-424
- Marraffini LA, Sontheimer EJ (2010) Self versus non-self discrimination during CRISPR RNA-directed immunity. *Nature* 463:568-571

- Molla KA, Qi Y, Karmakar S, Baig MJ (2020) Base Editing Landscape Extends to Perform Transversion Mutation. Trends in genetics : TIG
- Paques F, Duchateau P (2007) Meganucleases and DNA Double-Strand Break-Induced Recombination: Perspectives for Gene Therapy. Current Gene Therapy 7:49-66
- Schiemann J, Robiński J, Schleissing S, Spök A, Sprink T, Wilhelm RA (2020) Editorial: Plant Genome Editing – Policies and Governance. Frontiers in Plant Science 11
- Schulman AH, Oksman-Caldentey K-M, Teeri TH (2020) European Court of Justice delivers no justice to Europe on genome-edited crops. Plant Biotechnology Journal 18:8-10
- Shukla VK, Doyon Y, Miller JC, DeKolver RC, Moehle EA, Worden SE, Mitchell JC, Arnold NL, Gopalan S, Meng X, Choi VM, Rock JM, Wu YY, Katibah GE, Zhifang G, McCaskill D, Simpson MA, Blakeslee B, Greenwalt SA, Butler HJ, Hinkley SJ, Zhang L, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD (2009) Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. Nature 459:437-441
- Zhang Y, Malzahn AA, Sretenovic S, Qi Y (2019) The emerging and uncultivated potential of CRISPR technology in plant science. Nature Plants 5: 778-794

3. Gēnu dziņi un to iespējama pielietojums lauksaimniecībā

Gēnu dziņi (*gene drives*) eksistē dabā, bet tos var arī radīt mākslīgi laboratorijā. Dabiska gēnu dziņu sistēma (*meiotic drive*) eksistē tādiem mikroorganismiem, kā *Fusarium moniliforme*, *Neurospora sitophila* un *N. Intermedia*. Meiotiskie dziņi ir dabiski sastopami dažiem augiem - tabakai *Nicotiana tabacum* (*pollen killer*), rīsiem *Oryza sativa* (*pollen killer*), parastajai plaušķkenei *Silene latifolia* (ziedu dzimuma attiecību polimorfisms), kukurūzai *Zea mays* (Ab10 hromosoma). Meiotiskie dziņi ir dabiski sastopami dažiem kukaiņiem – *Acraea quirina*, dzeltenā drudža odam *Aedes aegypti* (COGEM, 2018).

Ir iespējams veidot uz CRISPR - Cas9 gēnu dziņu sistēmu balstītu nezāļu sugu populāciju nomākšanu. Šādus gēnu dziņus var izmantot fitnesa slodzes ieviešanai un izplatīšanai, kas var ierobežot nezāļu populāciju izveidošanos, sastopamību, izplatīšanos, noturību un / vai ietekmi. To var panākt ar ģenētiskām manipulācijām, kas vērstas uz nezāļu īpašībām, kas saistītas ar konkurētspēju, sēklu miera periodu un saglabāšanos, fenoloģijas un morfoloģijas rādītājiem, lai gan šo pieeju potenciālu pašlaik ierobežo nepilnīga nezāļu pazīmju molekulāri ģenētiskās bāzes izpratne. Viena no iespējām ir izmantot pundura formas veidojošo gēnu *Rht-1* homologus, kas jau ir izmantoti kviešu audzēšanā, radniecīgās nezālēs. Ja šos gēnus var ievadīt populācijās, tie var samazināt nezāļu konkurētspēju. Centieni varētu būt vērsti arī uz meiotisko dziņu sistēmām, kas izmaina dzimuma attiecību divmāju nezāļu sugās, piemēram, *Amaranthus* spp., kas noved pie izmainītas sievišķo un vīrišķo augu proporcijas. Citi mēģinājumi ietekmēt augu reprodukciju un auglību varētu būt vērsti uz ģenētiskām manipulācijām, kas traucē, piemēram, gametoģenēzē, lai ierobežotu ziedputekšņu vai olšūnu ražošanu, kā rezultātā samazinās un / vai tiek traucēta gametu veidošanās (Neve, 2018).

Eiropā līdz šim ir veikti tikai daži lauka izmēģinājumi ar gēnu dziņiem vai genomiski redīgētiem augiem. Zinātniskajā literatūrā ir aprakstīts izmēģinājums Apvienotajā Karalistē ar eļļas augu sējas idru *Camelina sativa*, kurai bija izveidots paaugstināts oleīnskābes saturs, izmantojot SDN-1 scenāriju. Šiem augiem bija inaktivēts FAD2 Δ 12-desaturāzes gēns, kas pārvērš mononepiesātināto oleīnskābi par divkārtnepiesātinātu linolskābi. Lauka izmēģinājumos šiem augiem tika novērota punduru forma un nevēlamas fenotipiskās

izpaušmes salīdzinājumā ar to, kā šie augi auga iepriekš siltumnīcā. Tas norāda uz lauka izmēģinājumu nepieciešamību, lai gan saņemt atļauju šādu izmēģinājumu veikšanai ES var būt samērā apgrūtināši (Faure and Napier, 2018). Kompānija VIB ir reģistrējusi lauka izmēģinājumus Eiropas Savienībā ar CRISPR kukurūzu. Šī kukurūza nav paredzēta kultivēšanai lauksaimniecībā, bet gan klimata ietekmes uz augiem noteikšanai (<https://vib.be/news/permit-crispr-maize-field-trial-aims-measure-climate-stress>).

Gēnu dziņu sistēmu pielietojums lauksaimniecībā var būt saistīts ne tikai ar nezāļu populāciju ierobežošanu, bet arī ar augu kaitēkļu populāciju ierobežošanu. Viens no variantiem nākotnē dažādu kaitēkļu populāciju ierobežošanai ir izmantot ģenētiski modificētus organismus, kas izveidoti balstoties uz gēnu dziņa sistēmām, kuru iedzimtība **nenotiek** pēc Mendēļa likumiem – gēnu dziņa organismu jeb gēnu sastopamība katrā paaudzē pieaug pat tādā gadījumā, ja nav izdzīvošanas priekšrocību. Viens no kaitēkļiem, kura ierobežošanai varētu izmantot gēnu dziņa sistēmas, ir punktspārnu augļmuša *Drosophila suzuki*.

Drozofilas ir augļu mušiņas, kuras bieži ir redzamas vasarā, kad ir daudz pieejamu pārgatavojušos un jau pūstošu augļu un ogu. Augļu mušām ir vairākas sugas, no kurām viena, punktspārnu augļmuša, ir kļuvusi par bīstamu kaitēkli vairākās Eiropas valstīs. Tās latīniskais nosaukums ir *Drosophila suzuki*, bet angļu valodā - *spotted wing drosophila*. Tēviņi ir 2.6 līdz 2.8 mm gari, un tiem ir melns punktveida plankums tuvu katra spārna galam. Mātītes ir 3.2 līdz 3.4 mm garas, un tām nav šo punktveida plankumu (EPPO, 2011b).

Atšķirībā no citām drozofilām šī augļmuša, izmantojot zobainu dējekli, dēj olas zem mizas ogās un augļos, kas vēl tikai nogatavojas. Vienā dējekļa dūriena vietā mātīte iedēj vienu līdz trīs olas, bet savas dzīves laikā tā var izdēt līdz 300 olām. Tā kā vienu augli olu dēšanai var izmantot vairākas mātītes, tad vienā auglī var attīstīties līdz pat 60-70 pēcnācējiem. Izšķīlušies kāpuri (līdz 3,5 mm gari) un vēlāk arī kūniņas attīstās augļu un ogu iekšpusē, izraisot būtiskus bojājumus, kam var sekot puve. Kūniņas var attīstīties arī augļu un ogu ārpusē. Dzīves cikls ir īss – viena līdz divas nedēļas, atkarībā no klimatiskajiem apstākļiem. Japānā šim kaitēklim var būt līdz pat 13 paaudzēm viena gada laikā, Amerikā, Kalifornijā – trīs līdz 10 paaudzes. Tādējādi tiek radīti būtiski ražas zudumi. Līdz 1930.-iem gadiem šis kaitēklis bija sastopams tikai Japānā, bet pēdējās desmitgadēs tas ir invazīvi izplatījies visos kontinentos, izņemot Antarktīdu. Tas ir konstatēts Sibīrijas dienvidos Krievijā (2003), Spānijā (2010), Itālijā (2010), Francijā (2010), Slovēnijā (2011). Ir aprēķināts, ka Kalifornijā, Amerikas Savienotajās Valstīs, laika periodā no 2008. gada līdz 2014. gadam punktspārnu augļmušas radītie kaitējumi ir radījuši 39 miljonus dolāru lielus zaudējumus, bojājot 20 līdz 100 % ražas (Buchman et al 2018; EPPO, 2011a, EPPO, 2011b). Pēdējos gados šis kaitēklis ir konstatēts jau vairākās mums ģeogrāfiski tuvākās valstīs: Polijā (2014), Zviedrijā (2014), Ukrainā, 2014, Somijā (2019) (<https://gd.eppo.int/taxon/DROSSU/distribution>). Tam patīk klimats ar augstu mitrumu un mērenām temperatūrām. Aukstas ziemas neietekmē kaitēkļa izdzīvošanu, jo tas ir ieviesies gan Ķīnas ziemeļos, gan Hokaido dienvidu daļā (EPPO, 2011b).

Kultūraugi, kurus šī augļmuša bojā visbiežāk, ir sekojoši: avenas, kazenes, zemenes, saldie ķirši, persiki un aprikozes. Retāk tiek bojāti āboli, plūmes un vīnogas. Tas var invadēt arī savvaļas augus, piemēram, mellenes. Šie augļi un to tirdzniecība tiek uzskatīti par galvenajiem kaitēkļa pārneses ceļiem no vienas valsts uz citu, jo novākšanas laikā bojājumi var būt vēl neizteikti un nepamanāmi. Kaitēkļa attīstība turpinās transporta laikā. Vēlāk, jau citā valstī, bojātie augļi un ogas var nonākt kompostā, no kurienes pieaugušie īpatņi var invadēt vietējos

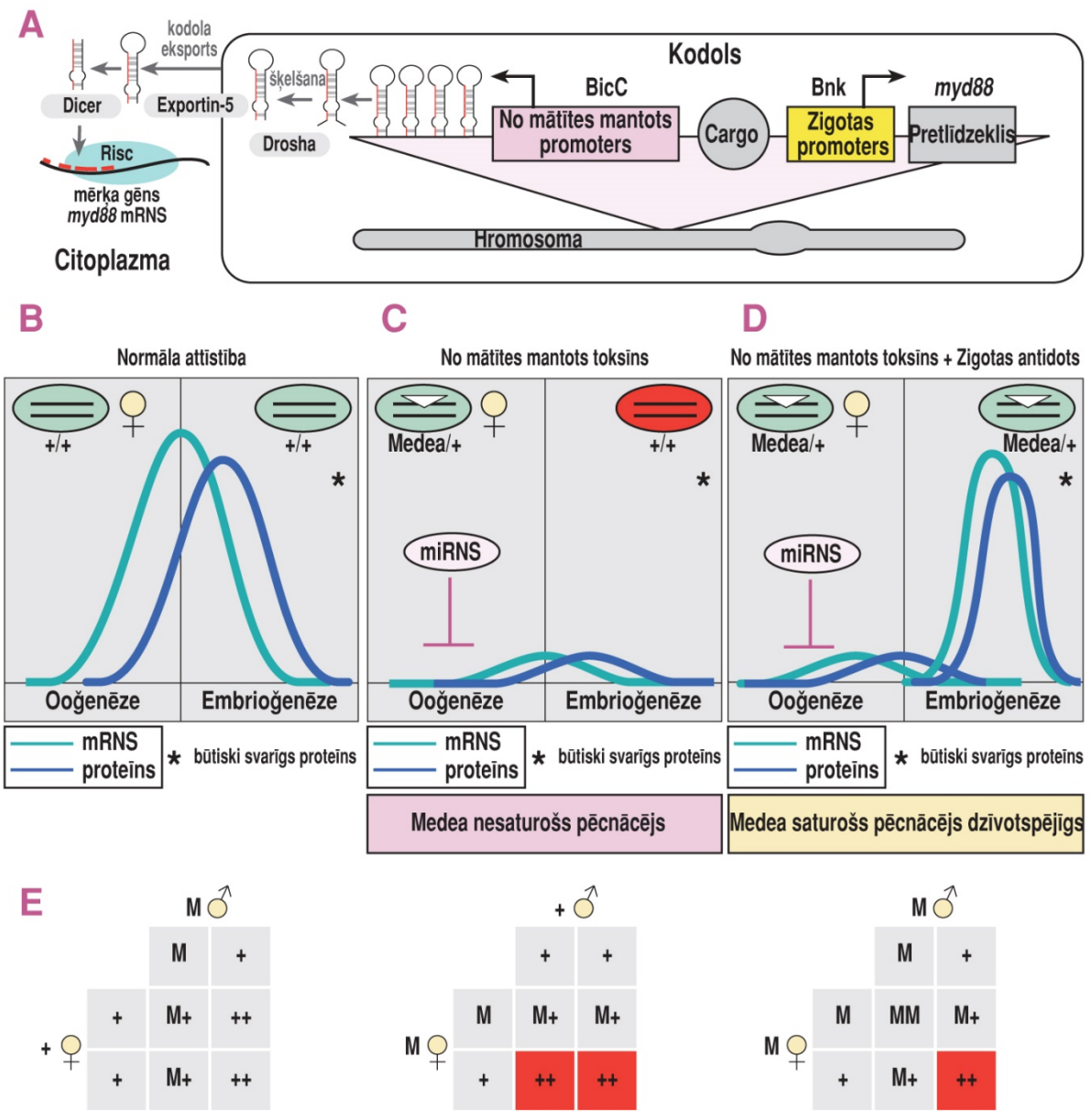
dārzus. Tirdzniecība ar augu stādāmo materiālu tiek uzskatīta par zema riska izplatības ceļu (EPPO, 2011a, EPPO, 2011b).

Pašlaik pieejamās *D. suzukii* ierobežošanas metodes balstās uz plaša spektra insekticīdiem, no kuriem neviens Latvijā nav reģistrēts lietošanai pret augļmušām (VAAD, 2020). Valstīs, kur šādi līdzekļi, piemēram, malatjons, ir reģistrēti, novērota variabla efektivitāte, apgrūtinoša lietošana augļu nogatavošanās laikā, kā arī iespējama *D. suzukii* rezistences rašanās (Buchman et al 2018). Spānijā ir konstatēti punktspārnu augļmušas dabiskie ienaidnieki - parazitoīdi, spožlapsenes *Pachycrepoideus vindemmiae* un tumšlapsenes *Trichopria cf. drosophilae*, kas savā attīstībā izmanto augļmušas kūniņas un būtiski samazina pieaugušo īpatņu izveidošanos bojātajos augļos un ogās. Pētījumā tika konstatēts, ka dabiski ar šiem parazitoīdiem bija invadētas 4 līdz 10 % drozofilu kūniņu, bet laboratorijas apstākļos līdz pat 83 %. Atklāti arī plēsīgi kukaiņi no koku laupītājblakšu dzimtas (*Orius laevigatus*) un spīļastes *Labidura riparia*, kas barojas ar augļmušas olām vai kāpuriem. Laboratorijas apstākļos šie plēsīgie kukaiņi nogalināja līdz pat 76 % no drozofilu olām un kāpuriem (Gabarra et al., 2015). Tomēr bioloģiskās kontroles preparāti vēl netiek plaši izmantoti (Buchman et al 2018).

Viena no vislabāk izstrādātajām sistēmām *D. suzukii* ierobežošanai ir *Medea* sistēma (*Medea – Maternal Effect Dominant Embryonic Arrest*). *Medea* sistēma balstās uz toksīna – pretlīdzekļa kombinācijas ekspresiju (Buchman et al 2018). *Medea* sistēma ir dabiski sastopama dabā. Tā ir atklāta miltu vabolei *Tribolium castaneum*, kur tā regulē populācijas blīvumu, kā arī pelēm *Mus musculus*, kur tā izraisa smagu kombinētu anēmiju un trombocitopēniju (citēts pēc. COGEM, 2018).

Punktspārnu augļmušai *Medea* sistēmā microRNS (miRNS) “toksīns” tiek ekspresēts oogenēzē sievišķajiem īpatņiem, kuriem ir *Medea* sistēma, savukārt “pretlīdzeklis” ekspresējas agrīnās embriogēzes stadijās pēcnācējiem, kuriem ir šī sistēma (10. attēls). Toksīnu kodējošais gēns tiek pārmantots visiem pēcnācējiem no mātes, kurai ir *Medea* sistēma, kas izpaužas kā miRNS vadīta svarīga ebrioniskā gēna apspiešana, kas izraisa normālas embriogēzes attīstības pārtraukšanu. Pēcnācēji, kas pārmanto *Medea* sistēmu, saņem pretlīdzekli, ko veido šī svarīgā embrioniskā gēna kopija, kas ir rezistenta pret miRNS, atļaujot notikt normālai attīstībai. Pēcnācēji, kuriem nav *Medea* sistēma, nevar normāli attīstīties un iet bojā. Balstoties uz šādu iedzimtību, *Medea* sistēma konkrētajā kaitēkļu populācijā ātri izplata pati sevi un ikvienu tajā ievietoto gēnu (Cargo). Šāds ievietotais gēns varētu būt gēns, kas izraisa uzņēmību pret kādu konkrētu ķīmisku vielu, un kuru aktivē konkrēti vides apstākļi, piemēram, temperatūra vai diapauze (Buchman et al 2018). Viena no šādām sistēmām tika radīta jau 2007. gadā citai drozofilas sugai – *Drosophila melanogaster* (Chen et al., 2007). Tika izmantots gēns *myd88*, kuru pārmanto pa mātes līniju. Šis gēns ir nepieciešams agrās embrija attīstības stadijās, lai nodrošinātu dorzoventrālu attīstību. Ar divu miRNS palīdzību, kas ekspresējas mejozes laikā, šī gēna darbība tiek apturēta. Pretlīdzeklis ir miRNS-nejutīgs *myd88* transgēns, kurš aktivējas zigotas stadijā (Chen et al., 2007). 2018. gadā šāda sistēma tika radīta punktspārnu augļmušai, izmantojot četras miRNS molekulas, kas iedarbojas uz *myd88* gēnu. Iedzimtība nakamajās paaudzēs bija 87 līdz 100 %. Tiek uzskatīts, ka *Medea* sistēmas izmantošanas gadījumā dabā būs nepieciešams izlaist daudz mazāk laboratorijā pavairoto īpatņu nekā sterilo kukaiņu tehnoloģijas (*sterile insect technique*) gadījumā, kas plaši tiek izmantota Vidusjūras augļmušas *Ceratitidis capitata* ierobežošanai (Buchman et al 2018). Sterilo kukaiņu tehnoloģija ir videi draudzīga kukaiņu apkarošanas metode, kas ietver mērķa kaitēkļa masveida audzēšanu un sterilizāciju, izmantojot starojumu,

kam seko sistemātiska sterilu tēviņu izplatīšana noteiktā vietā, kur tie pārojas ar savvaļas mātītēm, kurām šādas pārošanās rezultātā nav pēcnācēju, un tādējādi kaitēkļu populācija samazinās (<https://www.iaea.org/topics/sterile-insect-technique>).

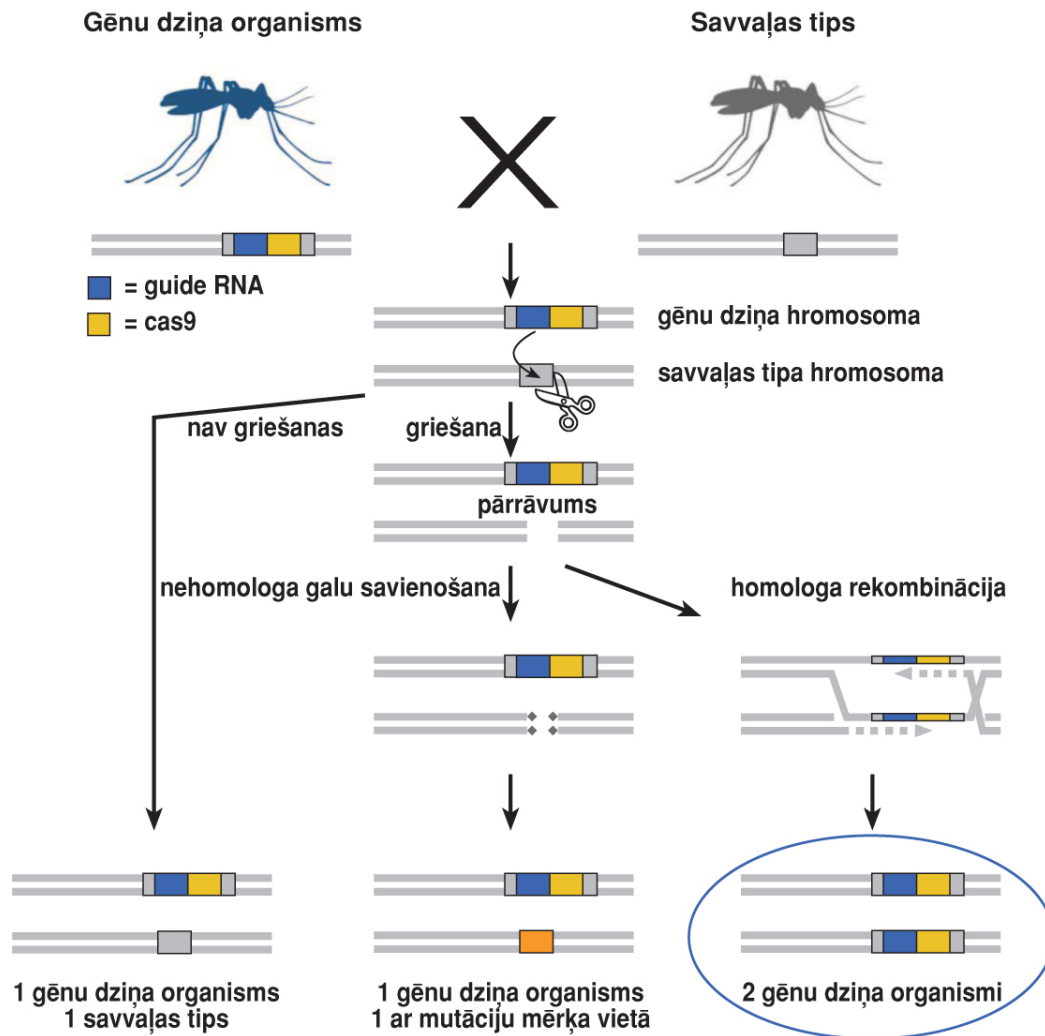


10.attēls. Mākslīgā Medea sistēma *D. sukii*. (A) *D. sukii* Medea transgēns tika izveidots, lai saturētu miRNS "toksīnu", kas iedarbojas uz gēna myd88 5' UTR sekvenci, kura ekspresiju nodrošina specifisks no mātes pārmantots BicC promotors, un "pretlīdzekli", kas sastāv no *D. sukii* myd88 kodējoša reģiona, kura ekspresiju nodrošina agrīnai embrioloģiskajai stadijai atbilstošs Bnk promotors, kā arī divus atsevišķus transformācijas marķierus. Šie marķieri ir eGFP, kuru kontrolē acu krāsai specifisks 3xP3 promotors, un dsRed, kuru kontrolē bieži sastopams hr5-IE1 promotors. (B) Normālas attīstības gadījumā no mātes mantotais myd88 tiek uzkrāts embrijā, kur tas ir nepieciešams normālai attīstībai. (C) Medea sistēmas miRNS toksīns iedarbojas uz myd88 mRNS ooģenēzes laikā, kavējot normālu uzkrāšanos embrijā un izraisot embrija nāvi tiem pēcnācējiem, kas nav pārmantojuši Medea sistēmu. (D) Embrijiem, kuriem ir Medea sistēmas kopija, ekspresējas tāds myd88 variants, kas nav jutīgs pret miRNS toksīnu, kas ekspresējas agrīnās embriogēnes stadijās, kas rezultējas ar miRNS izraisītu

letalitāti. (E) Ja krusto heterozigotiskus *Medea* vīrišķos īpatņus ar savvaļas tipa sievišķajiem īpatņiem, visi pēcnācēji izdzīvo, jo no sievišķā īpatņa mantotais toksīns netiek ekspresēts (kreisajā pusē). Ja krusto heterozigotiskus *Medea* sievišķos īpatņus ar savvaļas tipa vīrišķajiem īpatņiem, 50 % pēcnācēju, kas nav pārmantojuši *Medea* sistēmu, iet bojā (vidū). Krustojot heterozigotiskus sievišķos īpatņus ar heterozigotiskiem vīrišķajiem īpatņiem, 75 % pēcnācēju pārmanto *Medea* sistēmu vai nu no tēva, vai mātes, un izdzīvo, kamēr tie, kas nepārmanto, neizdzīvo (labajā pusē). Attēls adaptēts no Buchman et al (2018). Paskaidrojumi attēlā redzamajiem apzīmējumiem: Dicer – endoribonukleāze Dicer, kas šķel pre-microRNS īsākos fragmentos, kurus sauc par microRNS (miRNS); Risc – RNS inducēts gēna izslēgšanas komplekss; Drosha – ribonukleāze, kas darbojas microRNS processinga sākuma stadijās. Exportin-5 - proteīns, kurš eksportē pre-microRNS ārā no kodola uz citoplazmu; Cargo – jebkurš mērķa gēns, kuru var ievietot *Medea* sistēmā.

Līdz ar *Medea* sistēmu eksistē vēl arī citas gēnu dziņu sistēmas, piemēram, tādas, kas balstītas uz CRISPR/CAS sistēmu¹³. Tā ir pašlaik plaši izmantota gēnu rediģēšanas sistēma, ar kuras palīdzību rada endonukleāžu dziņu sistēmu. Šīs sistēmas priekšrocība ir tāda, ka tiek izmantota viegli izveidojama vadības RNS (*guide RNA*), kas atrod genomā savu vietu. Pamatelementi šai sistēmai ir CRISPR endonukleāzes gēns, viena vai vairākas vadības RNS sekvences un, atkarībā no pielietošanas veida, mērķa gēns (11. attēls). Sistēmu parasti ievieto plazmīdā, kurā abās pusēs dziņa kasetei ir mērķa sekvencai homologas sekvences, lai inducētu integrēšanos genomā (*homing*) (COGEM, 2018). Ar šīs sistēmas palīdzību ir radītas tādas mutācijas, kas izraisa izmaiņas sievišķo īpatņu dzimumorgānos, tādējādi ietekmējot vairošanos (Fang and Scott, 2016). Citos gadījumos dabā varētu palaist sterilus vīrišķos īpatņus, kas pārotos ar savvaļas sievišķajiem īpatņiem, tā rezultātā samazinot vai pilnībā iznīcinot punktspārnu augļmušas populācijas (Kalajdzic and Schetelig, 2017). Pamatā gēnu dziņa modifikācijas konkrētajā populācijā neuzskata par paliekošām jeb permanentām. Uzskata, ka vienmēr izselekcionēsies rezistentas alēles. Tomēr tas varētu prasīt ilgu laiku, kas būtu pietiekams, lai pārtrauktu konkrētā kaitēkļa populācijas attīstību (COGEM, 2018).

¹³ CRISPR/CAS - Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/ CRISPR associated protein



11.attēls. CRISPR/Cas gēnu dziņa izplatīšanās (attēls adaptēts no COGEM, 2018).

Šī jaunā tehnoloģija ir izraisījusi gan entuziasmu zinātnieku vidū, gan bažas dažādu ekspertu vidū. Kaut arī nākotnē gēnu dziņu sistēmas varētu izmantot lauksaimniecības kaitēkļu un invazīvu sugu kontrolei, apdraudētu sugu glābšanai vai slimību pārnēsātāju nomākšanai, tomēr vispirms nepieciešams novērtēt to iespējamās nevēlamās blakusparādības un izraisītās izmaiņas ekosistēmās. Eiropas pārtikas nekaitīguma iestāde pašlaik strādā pie gēnu dziņu organismu riska novērtējuma, iesaistot šajā procesā arī ES dalībvalstu iedzīvotājus, nevalstiskās organizācijas un kompetentās iestādes (EFSA, 2020).

Secinājumi

1. Gēnu dziņi (*gene drives*) eksistē dabā, bet tos var arī radīt mākslīgi laboratorijā.
2. Eiropā līdz šim ir veikti tikai daži lauka izmēģinājumi ar genomiski rediģētiem augiem.
3. Dažādu kaitēkļu un nezāļu populāciju ierobežošanai ir iespējams izmantot ģenētiski modificētus organismus, kas izveidoti balstoties uz gēnu dziņu (*gene drive*) sistēmām.
4. To iedzimtība nenotiek pēc Mendela likumiem – gēnu dziņa organismu jeb gēnu sastopamība katrā paaudzē pieaug pat tādā gadījumā, ja nav izdzīvošanas priekšrocību.

5. Viens no kaitēkļiem, kura ierobežošanai varētu izmantot gēnu dziņa sistēmas, ir punktspārnu augļmuša *Drosophila suzukii*.
6. Viena no vislabāk izstrādātajām sistēmām *D. suzukii* ierobežošanai ir *Medea* sistēma (*Medea – Maternal Effect Dominant Embryonic Arrest*).
7. Līdz ar *Medea* sistēmu eksistē vēl arī citas gēnu dziņu sistēmas, piemēram, tādas, kas balstītas uz CRISPR/CAS sistēmu.
8. Pašlaik Eiropas Savienībā ir aktuāls jautājums par šo organismu riska novērtējumu.

Izmantotā literatūra

- Buchman A., Marshall J.M., Ostrovski D., Yang T., Akbari O.S. 2018. Synthetically engineered *Medea* gene drive system in the worldwide crop pest *Drosophila suzukii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115(18): 4725-4730.
- COGEM (Netherlands Commission on Genetic Modification). 2018. Gene drives: Experience with gene drive systems that may inform an environmental risk assessment. Rudelsheim P.L.J. and Smets G. Perseus BVBA. <https://cogem.net/app/uploads/2019/07/CGM-2018-03-Report-Gene-Drives-met-kaft.pdf>
- Chen C.H., Huang H., Ward C.M., Su J.T., Schaeffer L.V., Guo M., Hay B.A. 2007. A synthetic maternal-effect selfish genetic element drives population replacement in *Drosophila*. *Science* 316: 597-600.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2020. New advances in biotechnology. https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/new-advances-biotechnology?utm_medium=email&utm_source=fp&utm_campaign=genedrive2020
- EPPO (European and Mediterranean plant protection organization). 2011a. Pest risk analysis for: *Drosophila suzukii*. <https://pra.eppo.int/organism/DROSSU>
- EPPO (European and Mediterranean plant protection organization). 2011a. Mini data sheet on *Drosophila suzukii*.
- Fang Li, Maxwell J. Scott. 2016. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the white and Sex lethal loci in the invasive pest, *Drosophila suzukii*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 469(4): 911-916.
- Faure JD, Napier JA: Europe's first and last field trial of gene-edited plants? *eLife* 2018, 7:e42379 <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.42379>.
- Gabarra R., Riudavets J., Rodríguez G.A., Pujade-Villar J., Arnó J. 2015. Prospects for the biological control of *Drosophila suzukii*. *BioControl* 60:331–339.
- Kalajdzic P., Schetelig M.F. 2017. CRISPR/Cas-mediated gene editing using purified protein in *Drosophila suzukii*. *Entomol Exp Appl* 164: 350-362.
- Neve P. 2018. Gene drive systems: do they have a place in agricultural weed management?. *Pest. Manag. Sci.*, 74: 2671-2679.

4. EUGINIUS datu bāzē esošās informācijas analīze par genomiski rediģētiem organismiem

EUGINIUS (EUropean GMO INItiative for a Unified database System) jeb Eiropas vienotas ĢMO datu bāzes iniciatīva ir brīvpieejas online datubāze. Uz projekta atskaites iesniegšanas brīdī EUGINIUS datu bāzē ir informācija par 30 organismiem, kas iegūti ar genoma rediģēšanas metodēm. Šos organismus var iedalīt vairākās grupās atbilstoši tam, kāda veida izmaiņas ir veiktas – viena nukleotīda insercijas, delēcijas vai nomaiņas, īsas nukleotīdu delēcijas (līdz 50 bp), lielākas insercijas un delēcijas (4. tabula). Vairāki no šiem kultūraugiem tiek kultivēti un izmantoti pārtikā un dzīvnieku barībā ASV un Kanādā jau vairākus gadus, kur tie netiek regulēti kā ĢMO, piemēram, rapsi 5715 ir atļauts audzēt un izmantot pārtikā un dzīvnieku barībā Kanādā kopš 2013. gada, savukārt 2019. g. ir uzsākta FAD2KO sojas eļļas izplatīšana ASV tirgū ar preču zīmi “Calyno™ High Oleic Soybean Oil”.

Tālākajās apakšnodaļās ir dota detalizēta analīze par deviņiem genomiski rediģētiem kultūraugiem, kas varētu būt aktuāli Latvijas tautsaimniecībai – rapsi, kartupeļiem, soju, kviešiem un kukurūzu.

4.tabula

Informācijas apkopojums ar EUGINIUS datu bāzē esošajiem organismiem, kas izveidoti ar genoma rediģēšanas metodēm¹⁴

Ģenētiskā modifikācija	Veids	Suga	Nosaukums (izstrādātājs)
Viena nukleotīda variācijas (<i>Single nucleotide variation - SNV</i>)	Gēna izslēgšana	<i>Brassica napus</i> (rapsis)	BnALS-57 jeb 5715 (Cibus)
	Izturība pret herbicīdiem	<i>Brassica napus</i> (rapsis)	5715 canola (Cibus)*
Vairāku atsevišķu nukleotīdu aizvietošana	Izturība pret herbicīdiem (2 SNV)	<i>Brassica napus</i> (rapsis)	CLB1 canola (BASF)*
	Gēna izslēgšana ar divām punktveida mutācijām	<i>Oryza sativa</i> (rīsi)	OsALS-R rice (Iowa State University - ISU)
Viena nukleotīda insercija	Gēna izslēgšana	<i>Thlaspi arvense</i> (tīruma naudulis)	FAE1-4 Pennycress (ISU) FAE1-5 Pennycress (ISU)

¹⁴ Tabula adaptēta no European Network of GMO Laboratories darba grupas “Working group on Method Performance Requirements” materiāliem.

Ģenētiskā modifikācija	Veids	Suga	Nosaukums (izstrādātājs)
Viena nukleotīda delēcija	Gēna izslēgšana	<i>Solanum tuberosum</i> (kartupelis)	Low PPO5 potato (J.R. Simplot)
Īsa nukleotīdu delēcija (līdz 50 bp)	Gēna izslēgšana (4 bp)	<i>Thlaspi arvense</i> (tīruma naudulis)	FAE1-3 Pennycress (ISU)
	Vairāku allēļu izslēgšana (1-14 bp)	<i>Agaricus bisporus</i> (divsporu atmatene)	PPO Mushroom (PSU)
	Vairāku allēļu izslēgšana	<i>Solanum tuberosum</i> (kartupelis)	PPO Potato (Calyxt)*
	Vairāku allēļu izslēgšana (2-22 bp)	Sējas idra (<i>Camelina sativa</i>)	GE-BADC Camelina (Yield10 Bioscience Inc.)
	Gēna izslēgšana	Saldais apelsīns (<i>Citrus sinensis</i>)	LOB1 Orange (University of Florida - UOF)
	Vairāku gēnu izslēgšana (4-43 bp)	<i>Glycine max</i> (soja)	FAD2 KO Soybean (Calyxt)* FAD3 KO Soybean (Calyxt)*
	Vairāku allēļu izslēgšana	<i>Triticum aestivum</i> (kvieši)	MLO_KO Wheat (Calyxt)*
	Vairākas delēcijas vienā gēnā	<i>Zea mays</i> (kukurūza)	ZFN-12 maize (DOW AgroSciences)
	Vairāku allēļu izslēgšana (4-17 bp)	<i>Solanum tuberosum</i> (kartupelis)	Vinv Potato (Calyxt)*
	Vairāku allēļu izslēgšana (1,2 un 7 bp delēcija un 1 bp insercija)	<i>Brassica napus</i> (rapsis)	CP1 (Christian-Albrechts-University of Kiel)
	Vairāku gēnu izslēgšana (izmainīti daži bp)	<i>Oryza sativa</i> (rīsi)	Ting rice (ISU)
	Vairākas delēcijas vienā gēnā	<i>Zea mays</i> (kukurūza)	ZmCCT9 KO (China Agricultural University)
Lielas insercijas	Informācija ir konfidenciāla	<i>Zea mays</i> (kukurūza)	BHB Hi-Yield Maize (BHB)
Lielas delēcijas	Gēna izslēgšana	<i>Solanum lycopersicum</i> (tomāts)	J2 Tomato (Universities Liège & Paris-Saclay)
	Gēna izslēgšana	<i>Zea mays</i> (kukurūza)	CRISPR-Cas Waxy Corn (Pioneer Hi-Bred International)*

Ģenētiskā modifikācija	Veids	Suga	Nosaukums (izstrādātājs)
Inaktivēts gēns	Gēna izslēgšana (mērķis ir viens gēna eksons)	<i>Setaria viridis</i> (zaļā sarene)	193-31 <i>Setaria viridis</i> (Donald Danforth Plant Science Center)

*-Detalizēta informācija dota tālākajās apakšnodaļās.

4.1. Genomiski rediģētais rapsis “5715” jeb “SU Canola”

ĢMO	Suga	Īpašības	Kompānija/ Attīstītājs
5715, SU Canola	<i>Brassica napus</i> (rapsis)	Herbicīdu tolerance	Cibus US LLC

Vispārējs apraksts

Rapsis 5715 jeb SU Canola ir izveidots konvencionālās selekcijas ceļā, krustojot divas rapša līnijas BnALS-57 un SP Cougar CL, kuras satur herbicīdu tolerances mutāciju PM2. Tā ir viena nukleotīda nomaiņa G>T, kas *ahas1* un *ahas3* gēna 557. kodonā izraisa triptofāna (kodons TGG) nomaiņu uz leicīnu (kodons TTG) (Hattori et al., 1995). Literatūrā norādīts arī, ka PM2 ir lokalizēta 574. kodonā, kas atbilst tai paši aminoskābes pozīcijai, bet kodonu numerācija ir noteikta relatīvi salīdzinājumā ar *Arabidopsis thaliana* sekvenci, kas tiek izmantota proteīnu sekvenču salīdzināšanai (Tan et al., 2005). Iegūtā rapša līnija ir rezistenta pret 2. grupas herbicīdiem (piemēram, imidazolinonu un sulfonilurīnvielu) (CFIA, 2013).

Gēns *ahas1* ir lokalizēts rapša C genomā un *ahas3* – A genomā. Jaunizveidotā rapša līnijas BnALS-57 satur mutāciju *ahas1* gēnā, un komerciāli pieejamā Clearfield rapša šķirne SP Cougar CL – *ahas3* gēnā. Abi gēni kodē acetohidroksiskābes sintāzi (AHAS), kas pazīstama arī kā acetolaktāta sintāze (ALS). AHAS katalizē pirmo sazarotās ķēdes aminoskābju (valīna, leicīna un izoleicīna) sintēzes soli. Mutācija PM2 noved pie AHAS enzīma konformācijas izmaiņām, kā rezultātā samazinās imidazolinona un sulfonilurīnvielas afinitāte pret to (Health Canada, 2013).

Jaunā mutantā līnija BnALS-57 tika izveidota no savvaļas tipa rapša līnijas BN2, pielietojot oligonukleotīdu vadīto mutaģenēzi (angļu val. *oligonucleotide-directed mutagenesis*) ar Cibus kompānijas izstrādāto *Rapid Trait Development System™* (RTDS™) pieeju (Gocal, 2014). RTDS protokols apvieno metodes, tajā skaitā audu kultivēšanas pieeju, kas panāk augstāku augu šūnu jutīgumu uz mutaģenēzi. BN2 protoplasti tika kultivēti *Imazethapyr* (imidazolinona grupas herbicīda) klātbūtnē, un tālāk atlasīti dzīvotspējīgie kallusi, kuros tika apstiprināta *ahas1* viena nukleotīda mutācija. Lai gan šūnas tika pakļautas oligonukleotīdu vadītajai mutaģenēzei, līnijas izveidotāji uzskata, ka ieviestā mutācija ir veidojusies kā spontāns somaklonāls variants audu kultivēšanas procesā, nevis kāda RTDS protokolā izmantotā oligonukleotīda tiešas ietekmes rezultātā. Reģenerētās mutantās rapša līnijas *ahas1* un *ahas3* gēnu analīze apstiprināja, ka tikai *ahas1* gēnā bija atrodama viena ieviestā mutācija. Netika novērotas izmaiņas promotera vai kādos citos genoma reģionos, kas varētu ietekmēt gēna ekspresiju (Health Canada, 2013).

Komerčiālā Clearfield rapša šķirne SP Cougar CL, kas satur PM2 mutāciju *ahas3* gēnā, ir izveidota konvencionālās selekcijas ceļā ar mikrosporu mutāģenēzi un tās pamatā ir eļļas rapša šķirne Topas (Swanson et al., 1989).

Rapša līnijai 5715 13 no 57 analizētajiem uzturvērtību raksturojošajiem analītiem uzrādīja statistiski nozīmīgu atšķirību salīdzinājumā ar izmantoto kontroles šķirni BY5525, tomēr tie atbilda Ekonomiskās sadarbības un attīstības organizācijas (ESAO) normām rapsim. Rapša līnijas ar analogu *ahas3* mutāciju jau eksistē un ir atzītas par nekaitīgām izmantošanai pārtikā, jo ir parādīts, ka mutantais AHAS3 nelīdzinās nevienam no zināmajiem proteīnu toksīniem, gremošanas traktā tiek šķelts un karstumā tiek inaktivēts, kā arī iespēja, ka tas vispār varētu nokļūt cilvēka organismā, patērējot rapšu eļļu, ir niecīga. Tā kā *ahas1* ir 99,7% identisks *ahas3* gēnam, arī mutantā AHAS1 toksiskuma potenciāls visticamāk ir līdzīgs AHAS3. Padziļināta *in silico* analīze apstiprināja, ka AHAS1 neuzrāda līdzību ar zināmiem toksīniem. Balstoties uz pieejamo informāciju, 5715 rapsis tiek uzskatīts par drošu eļļas ražošanai un izmantošanai lopbarībā (CFIA, 2013; Health Canada, 2013).

Detalizēta informācija par 5715 rapša līniju atrodama EUGENIUS datu bāzē (https://euginius.eu/euginius/pages/gmo_detail.jsf?gmoname=5715).

Rapša reproduktīvā bioloģija un saistība ar redīgēto pazīmju iedzimtību

Rapsim *Brassica napus* ir allotetraploīds genoms ($2n = 4x = 38$, AACC), kas veidojies rāceņa *Brassica rapa* ($2n = 2x = 20$, AA) un dārza kāposta *Brassica oleracea* ($2n = 2x = 18$, CC) krustošanās rezultātā (Song et al., 2020). Abu rapša 5715 iegūšanā izmantoto līniju krustošanas un atkrustošanas rezultātā abu mutāciju ieviestā herbicīdu tolerance tika nostiprināta F4 paaudzē. Sekvenēšana apstiprināja, ka abas mutācijas katrā gēnā ir homozigotiskā stāvoklī. Herbicīdu tolerance saglabājās arī tālākajās auga paaudzēs, kas norāda, ka iegūtā pazīme ir stabila (Health Canada, 2013).

5715 jeb SU Canola herbicīdu rezistences veidošanā iesaistītie ģenētiskie elementi doti 5. tabulā.

5.tabula

5715 jeb SU Canola herbicīdu rezistences veidošanā iesaistītie ģenētiskie elementi

(<http://bch.cbd.int/database/record.shtml?documentid=110268>).

Ģenētiskais elements	Izcelsme	Funkcija
<i>ahas3</i> gēna promotors	<i>Brassica napus</i>	Endogēnais acetohidroksiskābes sintāzes 3 gēna promotors iniciē gēna ekspresiju
<i>ahas3</i> gēns	<i>Brassica napus</i>	Endogēnais acetohidroksiskābes sintāzes 3 gēns ar mutācijām, kas kodē herbicīdu rezistentu enzīma formu
<i>ahas3</i> gēna terminators	<i>Brassica napus</i>	Endogēnais acetohidroksiskābes sintāzes 3 gēna terminators signalizē par kodējošās daļas transkripcijas beigām
<i>ahas1</i> gēna promotors	<i>Brassica napus</i>	Endogēnais acetohidroksiskābes sintāzes 1 gēna promotors iniciē gēna ekspresiju
<i>ahas1</i> gēns	<i>Brassica napus</i>	Endogēnais acetohidroksiskābes sintāzes 1 gēns ar mutācijām, kas kodē herbicīdu rezistentu enzīma formu

Ģenētiskais elements	Izcelsme	Funkcija
<i>ahas1</i> gēna terminators	<i>Brassica napus</i>	Endogēnais acetohidroksiskābes sintāzes 1 gēna terminators signalizē par kodējošās daļas transkripcijas beigām
RTDS™ oligonukleotīdi mutaģenēzei	Sintētiskas sekvenses	Mērķēta mutāciju ieviešana

Autorizācijas

Saskaņā ar Kanādas Pārtikas inspekcijas aģentūras CFIA (angļu val. *Canadian Food Inspection Agency*) lēmumu DD 2013-100 5715 rapsi kopš 04.12.2013. ir atļauts neierobežoti audzēt (angl. val. *unconfined release*) un izmantot lopbarībā Kanādā (CFIA, 2013). Tāpat Kanādas veselības organizācija (angļu val. *Health Canada*) kopš 06.11.2013. 5715 rapsi ir atzinusi par drošu izmantošanai pārtikā (Health Canada, 2013).

Iespējamās metodes detekcijai

Lai pierādītu, ka pētāmais materiāls (pārtika, dzīvnieku barība) satur 5715 jeb SU Canola rapsi, varētu tikt izmantotas uz polimerāzes ķēdes reakciju (PĶR) balstītas metodes:

- 1) Sangerā sekvenēšana – sākotnēji ar PĶR tiktu amplificēti PM2 mutāciju ietverošie genoma rajoni, kas pēc tam tiktu sekvenēti abos virzienos, lai noteiktu mutācijas statusu;
- 2) mērķēta jaunākās paaudzes sekvenēšana, kas vienlaikus uzrādītu interesējošās mutācijas abos gēnos. Metode ir salīdzinoši laikietilpīga;
- 3) *duplex* TaqMan reālā laika PĶR, kuras pamatā ir delēcijas rajonam specifiski praimeri un divas dažādas zondes savvaļas tipa alēles un mutācijas detektēšanai;
- 4) digitālā polimerāzes ķēdes reakcija (dPĶR) – nākamās paaudzes reālā laika PĶR, kurā varētu tikt izmantoti tie paši praimeri un zondes, kas klasiskajā reālā laika PĶR (iepriekšējais punkts), taču metode sola augstāku precizitāti;
- 5) Kvantitatīvai delēciju noteikšanai ir nepieciešama arī rapša genoma standarta noteikšana. EU references metožu datubāzē aprakstītas četras TaqMan kvantitatīvā reālā laika PĶR metodes rapša genoma gēniem:
 - QT-TAX-BN-001 metode endogēnā acil-ACP tioesterāzes gēna (*FatA*) noteikšanai. *FatA* ir lokalizēts *Brassica napus*, kā arī *B. rapa* and *B. juncea* A genomā. Metode netiek rekomendēta kvantitatīvai ĢMO analīzei (Jacchia et al., 2018).
 - QT-TAX-BN-002 metode *Brassica napus* endogēnā kruciferīna uzglabāšanas proteīnu kodējošā gēna (*BnC1*) noteikšanai. Metode netiek rekomendēta kvantitatīvai ĢMO analīzei (Jacchia et al., 2018).
 - QT-TAX-BN-003 metode *Brassica napus* endogēnā kruciferīna uzglabāšanas proteīnu kodējošā gēna (*BnC1*) noteikšanai (Jacchia et al., 2019).
 - QT-TAX-BN-012 metode *Brassica napus*, kā arī *B. juncea*, *B. rapa* un *B. oleracea* endogēnā kruciferīna uzglabāšanas proteīnu kodējošā gēna (*BnC1*) noteikšanai. Metode netiek rekomendēta kvantitatīvai ĢMO analīzei (Jacchia et al., 2018).

Atsauces

- CFIA. Decision Document DD 2013-100: Determination of the Safety of Cibus Canada Inc.'s Canola (*Brassica napus* L.) Event 5715. 2013. <https://www.inspection.gc.ca/plant-varieties/plants-with-novel-traits/approved-under-review/decision-documents/dd-2013-100/eng/1427383332253/1427383674669> Pēdējās izmaiņas ierakstā: 10.07.2020.
- Gocal G. Non-transgenic trait development in crop plants using oligo-directed mutagenesis: Cibus' rapid trait development system. 2014. NABC (North American Agricultural Biotechnology Council) Report 26: New DNA-Editing Approaches: Methods, Applications and Policy for Agriculture: 97-106. <https://hdl.handle.net/1813/51428>
- Hattori J, Brown D, Mourad G, et al. An acetohydroxy acid synthase mutant reveals a single site involved in multiple herbicide resistance. *Mol Gen Genet*. 1995;246(4):419-425.
- Health Canada. Novel Food Information - Cibus Canola Event 5715 (Imidazolinone and Sulfonylurea Herbicide Tolerant). 2013. <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/food-nutrition/genetically-modified-foods-other-novel-foods/approved-products/novel-food-information-cibus-canola-event-5715-imidazolinone-sulfonylurea-herbicide-tolerant.html> Pēdējās izmaiņas ierakstā: 26.05.2016.
- Jacchia S, Kagkli DM, Lievens A, et al. Identification of single target taxon-specific reference assays for the most commonly genetically transformed crops using digital droplet PCR. *Food Control*. 2018;93:191-200.
- Jacchia S, Sacco MG, Savini C, et al. Event-specific Method for the Quantification of Oilseed Rape MS11 Using Real-time PCR. Validation Report. 2019. <https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries/EURL-VL-03-16-VR.pdf>
- Song JM, Guan Z, Hu J, et al. Eight high-quality genomes reveal pan-genome architecture and ecotype differentiation of *Brassica napus*. *Nat Plants*. 2020;6(1):34-45.
- Swanson EB, Herrgesell MJ, Arnoldo M, Sippell DW, Wong RS. Microspore mutagenesis and selection: Canola plants with field tolerance to the imidazolinones. *Theor Appl Genet*. 1989;78(4):525-530.
- Tan S, Evans RR, Dahmer ML, Singh BK, Shaner DL. Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future. *Pest Manag Sci*. 2005;61(3):246-257.

4.2. Genomiski rediģētais rapsis "CLB-1"

GMO	Suga	Īpašības	Kompānija/ Attīstītājs
CLB-1	<i>Brassica napus</i> (rapsis)	Herbicīdu tolerance	BASF

Vispārējs apraksts

CLB-1 rapša līnijai ar mutāciju ir inaktivēts *ahas3* gēns, kā rezultātā rapsis ir rezistents pret imidazolinona grupas herbicīdiem, piemēram, *Imazamox* un *Imazapyr* (CFIA, 2014).

Gēns *ahas3* ir lokalizēts rapša A genomā, un kodē acetohidroksiskābes sintāzi (AHAS), kas pazīstama arī kā acetolaktāta sintāze (ALS). AHAS katalizē pirmo sazarotās ķēdes aminoskābju (valīna, leicīna un izoleicīna) sintēzes soli. Rapsis CLB-1 tika izveidots ar oligonukleotīdu vadītās mutāģenēzes (angļu val. *oligonucleotide-directed mutagenesis*) palīdzību izmantojot GRON tehnoloģiju (angļu val. *gene repair oligonucleotides* – gēnu labošanas oligonukleotīdi). GRON ir sekvenču specifisks oligonukleotīds, kas satur nelielu (piemēram, viena nukleotīda) sekvenču nesakritību ar mērķa sekvenču pozīcijā, kurā vēlas ieviest mutāciju. GRON komplementāri piesaistās mērķa sekvenču, un šūnas endogēnie DNS labošanas mehānismi, balstoties uz GRON ietvertu informāciju, izdara labojumu saimniekorganisma genomā, ieviešot mutāciju. Dažādi GRON tika ievadīti eļļas rapša līnijas BNO2 protoplastos ar PEG transformāciju, secīgi ieviešot dažādas mutācijas, tālāk atlasot mutantus ar vēlamajām herbicīdu tolerances īpašībām. CLB-1 tika izveidots ieviešot divas aminoskābju substitūcijas *ahasL1A* gēnā, kas kodē AHAS lielo subvienību. Vispirms tika ieviesta alanīna nomaiņa uz treonīnu 122. pozīcijā (A122T). Pēc tam tika ieviesta serīna nomaiņa uz asparagīnu 653. pozīcijā (S653N). Abu nomainīto aminoskābju pozīciju numerācija ir noteikta relatīvi salīdzinājumā ar *Arabidopsis thaliana* proteīnu. Mutantā gēna apzīmējums ir *ahasL1A-A122(At)T/S653(At)N*. Mutāciju rezultātā AHAS kļūst nejūtīga pret imidazolinona herbicīdiem, un nodrošina sazarotās ķēdes aminoskābju sintēzi arī šo herbicīdu klātbūtnē. DNS sekvenēšana apstiprināja sagaidāmo mutāciju klātbūtni gēnā, kā arī neuzrādīja analogu mutāciju klātbūtni *ahasL1C* gēnā, kam ir augsta sekvenču līdzība ar *ahasL1A*. CLB-1 AHAS uzrādīja līdzvērtīgu enzimatisko aktivitāti līnijām bez mutācijām, kā arī ievērojami zemāku herbicīdu jutību. Ar dažiem izņēmumiem (lignocerīnskābe, alfa-tokoferols un vitamīns B6) CLB-1 līnija neuzrādīja nozīmīgas atšķirības uzturvērtību raksturojošo rādītāju līmeņos salīdzinājumā ar nemodificētajām rapša līnijām. *In silico* analīze uzrādīja, ka mutantā AHASL1A aminoskābju sekvenču neuzrāda nozīmīgu līdzību ar kādu no zināmajiem toksīniem. *In vitro* apstrāde ar pepsīnu un tripsīnu parādīja, ka kopējais (mutantais un savvaļas tipa) AHASL1A proteīns no CLB-1 rapša sēklīm tika sašķelts 5 minūšu laikā, kas norāda, ka cilvēka gremošanas traktā šis proteīns tiktu ātri sašķelts, kā arī tas tiek inaktivēts pēc vienas minūtes apstrādes 100 °C temperatūrā, kas norāda uz to, ka AHASL1A mutantais proteīns rapšu eļļas iegūšanas procesā tiks denaturēts. Balstoties uz pieejamo informāciju, CLB-1 rapsis tiek uzskatīts par drošu eļļas ražošanai un izmantošanai lopbarībā (CFIA, 2014; Health Canada, 2014).

Detalizēta informācija par CLB-1 rapša līniju atrodama EUGENIUS datu bāzē

(https://euginius.eu/euginius/pages/gmo_detail.jsf?gmoname=CLB1).

Rapša reproduktīvā bioloģija un saistība ar rediģēto pazīmju iedzimtību

Rapsim *Brassica napus* ir allotetraploīds genoms ($2n = 4x = 38$, AACCC), kas veidojies rāceņa *Brassica rapa* ($2n = 2x = 20$, AA) un dārza kāposta *Brassica oleracea* ($2n = 2x = 18$, CC) krustojšanās rezultātā (Song et al., 2020). Gēns *ahas3* ir lokalizēts rapša A genomā. Ģenētiskās analīzes apstiprināja, ka CLB-1 rapša mutācijas *ahas3* gēnā saglabājās nākamajās auga paaudzēs un iedzimst saskaņā ar klasiskajiem iedzimtības principiem (CFIA, 2014).

CLB-1 rapša herbicīdu rezistences veidošanā iesaistītie ģenētiskie elementi doti 6. tabulā.

6.tabula

CLB-1 rapša herbicīdu rezistences veidošanā iesaistītie ģenētiskie elementi
<https://bch.cbd.int/database/record.shtml?documentid=110263>

Ģenētiskais elements	Izcelsme	Funkcija
AHAS3 gēna promoters	<i>Brassica napus</i>	Endogēnais acetohidroksiskābes sintāzes 3 gēna promoters iniciē gēna ekspresiju
AHAS3 gēns	<i>Brassica napus</i>	Endogēnais acetohidroksiskābes sintāzes 3 gēns ar mutācijām, kas kodē herbicīdu rezistento enzīma formu
AHAS3 gēna terminators	<i>Brassica napus</i>	Endogēnais acetohidroksiskābes sintāzes 3 gēna terminators signalizē par kodējošās daļas transkripcijas beigām
GRON oligonukleotīdi	Sintētiskas sekvenses	Mērķa sekvencai komplementāri oligonukleotīdi ar vienas līdz dažu bāžu nesakrītību mutācijas mērķa pozīcijā un modificētiem gala nukleotīdiem, uz ko balstoties šūnas iekšējie DNS labošanas mehānismi ievieš mutācijas mērķa sekvenču

Autorizācijas

Saskaņā ar Kanādas Pārtikas inspekcijas aģentūras (angļu val. *Canadian Food Inspection Agency*) lēmumu DD2014-101 CLB-1 rapsi kopš 14.02.2014. ir atļauts neierobežoti audzēt (angl. val. *unconfined release*) un izmantot lopbarībā Kanādā (CFIA, 2014). Tāpat Kanādas veselības organizācija (angļu val. *Health Canada*) kopš 12.02.2014. CLB-1 rapsi ir atzinusi par drošu izmantošanai pārtikā (Health Canada, 2014).

Iespējamās metodes detekcijai

Lai pierādītu, ka pētāmais materiāls (pārtika, dzīvnieku barība) satur CLB-1 rapsi, varētu tikt izmantotas uz polimerāzes ķēdes reakciju (PĶR) balstītas metodes:

- 1) Sangera sekvenēšana – sākotnēji ar PĶR tiktu amplificēts mutāciju ietverošais genoma rajons, kas pēc tam tiktu sekvenēts abos virzienos, lai noteiktu mutācijas statusu;
- 2) mērķēta jaunākās paaudzes sekvenēšana, kas vienlaikus uzrādītu abas interesējošās mutācijas. Metode ir salīdzinoši laikietilpīga;
- 3) *duplex* TaqMan reālā laika PĶR, kuras pamatā ir delēcijas rajonam specifiski praimeri un divas dažādas zondes savvaļas tipa alēles un mutācijas detektēšanai;
- 4) digitālā polimerāzes ķēdes reakcija (dPĶR) – nākamās paaudzes reālā laika PĶR, kurā varētu tikt izmantoti tie paši praimeri un zondes, kas klasiskajā reālā laika PĶR (iepriekšējais punkts), taču metode sola augstāku precizitāti;
- 5) Kvantitatīvai delēciju noteikšanai ir nepieciešama arī rapša genoma standarta noteikšana. EU references metožu datubāzē aprakstītas četras TaqMan kvantitatīvā reālā laika PĶR metodes rapša genoma gēniem:
 - QT-TAX-BN-001 metode endogēnā acil-ACP tioesterāzes gēna (*FatA*) noteikšanai. *FatA* ir lokalizēts *Brassica napus*, kā arī *B. rapa* and *B. juncea* A genomā. Metode netiek rekomendēta kvantitatīvai ĢMO analīzei (Jacchia et al., 2018).

- QT-TAX-BN-002 metode *Brassica napus* endogēnā kruciferīna uzglabāšanas proteīnu kodējošā gēna (*BnC1*) noteikšanai. Metode netiek rekomendēta kvantitatīvai ĢMO analīzei (Jacchia et al., 2018).
- QT-TAX-BN-003 metode *Brassica napus* endogēnā kruciferīna uzglabāšanas proteīnu kodējošā gēna (*BnC1*) noteikšanai (Jacchia et al., 2019).
- QT-TAX-BN-012 metode *Brassica napus*, kā arī *B. juncea*, *B. rapa* un *B. oleracea* endogēnā kruciferīna uzglabāšanas proteīnu kodējošā gēna (*BnC1*) noteikšanai. Metode netiek rekomendēta kvantitatīvai ĢMO analīzei (Jacchia et al., 2018).

Atsauces

CFIA. Decision Document DD2014-101: Determination of the Safety of BASF Canada Inc.'s Canola (*Brassica napus*) Event CLB-1. 2014. <https://www.inspection.gc.ca/plant-varieties/plants-with-novel-traits/approved-under-review/decision-documents/dd2014-101/eng/1454107718197/1454107776755>

Jacchia S, Kagkli DM, Lievens A, et al. Identification of single target taxon-specific reference assays for the most commonly genetically transformed crops using digital droplet PCR. *Food Control*. 2018;93:191-200.

Jacchia S, Sacco MG, Savini C, et al. Event-specific Method for the Quantification of Oilseed Rape MS11 Using Real-time PCR. Validation Report. 2019. <https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries/EURL-VL-03-16-VR.pdf>

Health Canada. Novel food information: Canola (*Brassica napus*) Event CLB-1. 2014. <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/food-nutrition/genetically-modified-foods-other-novel-foods/approved-products/clearfield-canola-clb-1.html>

Song JM, Guan Z, Hu J, et al. Eight high-quality genomes reveal pan-genome architecture and ecotype differentiation of *Brassica napus*. *Nat Plants*. 2020;6(1):34-45.

4.3. Genomiski rediģētie kartupeļi “PPO_KO potato”

ĢMO	Suga	Īpašības	Kompānija/ Attīstītājs
PPO_KO potato	(<i>Solanum tuberosum</i> L. (kartupelis))	Enzimātiskās brūnēšanas novēršana	Calyxt

Vispārējs apraksts

GE-PPO_KO kartupelim ir inaktivēts enzīms polifenoloksidāze (PPO), kā rezultātā tiek novērsta kartupeļu enzīmātiskā brūnēšana, kas pozitīvi ietekmē kartupeļu kvalitātes saglabāšanu apstrādes procesā un uzglabāšanas laikā. Kartupeļu līnija satur tikai *Solanum tuberosum* L. ģenētisko materiālu un mazu delēciju oriģinālajā *ppo* gēnā.

Pēc ražas ievākšanas kartupeļu brūnēšanai ir liels risks radīt būtiskus zaudējumus lauksaimniecības nozarē. PPO ir galvenais enzimatiskās brūnēšanas iemesls, šādas PPO katalizētas oksidācijas var sastādīt aptuveni 50% no kopējiem industriāli ievāktu dārzena un augļu zudumiem (Holderbaum et al., 2010).

PPO ir sastopama gandrīz visiem segsēkļiem un pieder pie enzīmu klases, kas spējīga piesaistīt varu (Cu), kas uzkrājoties izpaužas kā brūnēšana. PPO katalizē monofenolu konversiju uz difenoliem, un dihidroksifenolu konversiju uz hinoniem. Secīgi hinoni spēj polimerizēties, kas augā izpaužas kā sarkanu, brūnu vai melnu pigmentu uzkrāšanās (Vaidya et al., 2006, Chi et al., 2014).

GE PPO_KO kartupelis satur TALEN veidotas inaktivējošas delēcijas vairākās *ppo* gēna(u) alēlēs. Jāņem vērā, ka kartupeļi ir autotetraploīds organisms, kas satur piecas polifenoloksidāzes gēna kopijas genomā, turklāt katram gēnam var būt līdz pat četrām alēlēm. Delēcija tika ieviesta ar speciāli izveidotu TALEN konstrukciju ekspresiju. TALEN reaģents tika ievadīts kartupeļa protoplastā ar polietilēnglikola (PEG) vadītu transformāciju, kas rezultējās mērķētās delēcijās un *ppo* gēna inaktivācijā. Līnijas izveidē nav izmantoti selektīvi marķieri (USDA APHIS, 2016).

Autorizācijas

Eiropā ASV "PPO_KO potato" nav autorizēts. *United States Department of Agriculture* (USDA) atzinis, ka līniju nav nepieciešams iekļaut kā *Regulated Article* GE līniju, kas ļauj izvairīties no regulācijas, balstoties uz to, ka PPO_KO kartupeļa līnijai līdzīgs rezultāts varētu tikt sasniegts arī ar konvencionālās selekcijas metodēm un tas kā arī gala produkts (kartupeļu stādi) nesatur citas sugas introducētu ģenētisko materiālu.

(<https://www.aphis.usda.gov/aphis/ourfocus/biotechnology/permits-notifications-petitions/confirmations/confirmation-process>)

Kartupeļu reproduktīvā bioloģija un saistība ar rediģēto pazīmju iedzimtību

Kartupelis ir autotetraploīds ar 48 hromosomām, tā pilnā genoma sekvenca ir publicēta 2011. gadā. Kartupeļus pavairo veģetatīvi, tāpēc jaunie augi būs ģenētiski identiski mātes augam. Kartupeļa PPO gēni ir identificēti un raksturoti piecās formās – POTP1 (GenBank ID: M95196), POTP2 (M95197), POT32 (U22921), POT33 (U22922) un POT72 (U22923) (Chi et al., 2014).

Calyxt kompānijas publicētajā korespondencē ar USDA-APHIS, kā arī EUGENIUS datubāzē nav atrasta informācija par to, kuri PPO gēni ir inaktivēti.

Ģenētiskie elementi un to izcelsme, kas piedalās TALEN konstrukcijā PPO_KO, ir klasificēti, informācija nav publiski pieejama, dzēsta (7. tabula). Papildu informācija par PPO_KO kartupeli atrodama EUGENIUS datu bāzē:

https://euginius.eu/euginius/pages/gmo_detail.jsf?gmoname=GE-PPO+Potato.

**Ģenētiskie elementi, kas izmantoti mērķētai gēnu inaktivācijai PPO-KO kartupeļu līnijai
TALEN konstrukcijai, kas tika izmantotas PPO gēnu rediģēšanai**

Ģenētiskais elements	Izcelsme	Funkcija
TALEN konstrukcija PPO_KO potato (USDA APHIS, 2016).		
[konfidencionāla biznesa informācija, dzēsta]	[konfidencionāla biznesa informācija, dzēsta]	Promoters, kas regulē TALEN reaģenta transkripciju
TAL efektors	<i>Xanthomonas</i> spp.	34 aminoskābju garš motīvs, kas spējīgs pievienoties DNS pie pirmā <i>ppo</i> eksona.
Fokl endonukleāzes gēns	<i>Flavobacterium okeanokoites</i>	Restrikcijas endonukleāze, kas šķel kartupeļa genomisko DNS aiz TALEN saistīšanās domēna
[konfidencionāla biznesa informācija, dzēsta]	[konfidencionāla biznesa informācija, dzēsta]	Poliadenilācijas signāla sekvenca, kas regulē TALEN reaģenta mRNS produkciju

Iespējamās metodes detekcijai

Lai pierādītu, ka pētāmais materiāls (pārtika, dzīvnieku barība) satur PPO_KO potato piejaukumu, varētu tikt izmantotas uz polimerāzes ķēdes reakciju (PĶR) balstītas metodes:

- 1) Sangera sekvenēšana – sākotnēji, ar PĶR, paraugā tiktu amplificēts delēciju ietverošais genoma rajons, kas pēc tam tiktu sekvenēts abos virzienos, lai pierādītu konkrēto delēciju *ppo*;
- 2) Mērķēta jaunās paaudzes sekvenēšana – lai pierādītu deletētās sekvences PPO gēnos;
- 3) Duplex TaqMan reālā laika PĶR – izmantojot dizainētus praimerus un zondes delēcijas specifiskajam rajonam;
- 4) Digitālā polimerāzes ķēdes reakcija dPCR - izmantojot dizainētus praimerus un zondes delēcijas specifiskajam rajonam; salīdzinot ar Duplex TaqMan reālā laika PĶR, dPCR metode ir ar augstāku precizitāti.

Sīkāka informācija par neautorizētu ĢMO detekciju, interpretāciju un ziņošanu aprakstīti ENGL (*European Network of GMO Laboratories*) sagatavotajā pārskatā (Holst-Jensen et al., 2011).

Kvantitatīvai delēciju noteikšanai ir nepieciešama arī kartupeļa genoma standarta noteikšana. EUGINIUS datu bāzē ir aprakstīta TaqMan kvantitatīvā reālā laika PCR metode kartupeļu genoma UDP-glikozes pirofosforilāzes gēnam (Savini et al., 2006).

Atsauces

- Chi M., Bhagwat B., Lane W. D., et al. Reduced polyphenol oxidase gene expression and enzymatic browning in potato (*Solanum tuberosum* L.) with artificial microRNAs. *BMC plant biology*, 2014:14(1), 62.
- Holderbaum D. F., Kon T., Kudo T., et al. Enzymatic browning, polyphenol oxidase activity, and polyphenols in four apple cultivars: dynamics during fruit development. *HortScience*, 2010;45(8), 1150-1154.
- Holst-Jensen A., Bertheau Y., Alnutt T., et al. Guidance document from the European Network of GMO Laboratories (ENGL): overview on the detection, interpretation and reporting on the presence of unauthorised genetically modified materials, Institute for Health and Consumer Protection. 2011.
- Savini C, Foti N, Mazzara M, et al. Event-specific Method for the Quantification of Event EH92-527-1 Potato Using Real-time PCR - Validation Report and Protocol - Sampling and DNA Extraction of Potato. 2006. Online Publication, <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/b5f6b3aa-b620-484c-a8ad-20fe4c313bb6/language-en>
- USDA APHIS. 2016 http://www.aphis.usda.gov/biotechnology/downloads/reg_loi/16-090-01_air_inquiry_cbidel.pdf;
https://www.aphis.usda.gov/biotechnology/downloads/reg_loi/16-090-01_air_response_signed.pdf
- Vaidya B. K., Suthar H. K., Kasture S., et al. Purification of potato polyphenol oxidase (PPO) by partitioning in aqueous two-phase system. *Biochemical engineering journal*, 2006:28(2), 161-166.

4.4. Genomiski rediģētā soja "FAD2KO Soybean"

GMO	Suga	Īpašības	Kompānija/ Attīstītājs
FAD2KO Soybean	<i>Glycine max</i> (soja)	Izmainīts taukskābju sastāvs (soja ar augstu oleīnskābes saturu)	Calyxt/Collectis plant sciences

Vispārējs apraksts

FAD2KO soja (alternatīvs nosaukums GM026-18 vai soja ar augstu oleīnskābes saturu) satur delēcijas divos gēnos *FAD2-1A* un *FAD2-1B*, kas inaktivē šos gēnus, kas kodē taukskābju desaturāzes enzīmus. FAD2 taukskābju desaturāzes nosaka mononepiesātināto taukskābju daudzumu sojas eļļā un šo divu gēnu inaktivācija noved pie oleīnskābes (mononepiesātināta omega-9 taukskābe) daudzuma pieauguma līdz aptuveni 80%. Sojas sēklās to nobriešanas laikā oleīnskābe tiek pārvērsta par linolskābi desaturācijas procesā, kuru veic *FAD2* gēna kodētā D12 taukskābju desaturāze. Linolskābe tālākā desaturācijas procesā, kuru veic *FAD3*

gēna kodētā D15 taukskābju desaturāze, tiek pārvērsta par linolēnskābi (Clemente and Cahoon 2009).

Sojas eļļa dabiski satur salīdzinoši augstu daudzumu polinepiesātināto taukskābju, kas veicina eļļas bojāšanos oksidācijas procesā. Lai samazinātu polinepiesātināto taukskābju daudzumu ir iespējams pielietot sojas eļļas hidrogenāciju, taču tās rezultātā papildus veidojas cilvēka veselībai kaitīgas trans-taukskābes. Tādējādi viens no sojas selekcijas mērķiem ir veidot šķirnes ar palielinātu mononepiesātināto un samazinātu polinepiesātināto taukskābju sastāvu (Clemente and Cahoon 2009).

FAD2KO (GM026-18) sojas līnija tika izveidota ar *Agrobacterium rhizogenes* K599 saknīšu transformāciju izmantojot sojas šķirnes 'Bert' dīgļus. Genoma rediģēšana tika panākta ar TALEN enzīmus ekspresējošu T-DNS konstrukciju. Specifiskais TALEN enzīms FAD2_T04 bija izveidots par mērķi izvēloties FAD2-1A un FAD2-1B gēnu alēles (Haun et al. 2014). Abu gēnu delēcijas FAD2KO līnijā ir homozigotiskā stāvoklī. T-DNS konstrukcija saturēja 35S promoteru, divas TALEN monomērus kodējošās sekvenses, kas bija saistītas ar T2A sekvenci, kā arī *nos* terminatoru. FAD2KO soja tika iegūta ģenētiskās skaldīšanās rezultātā, atbrīvojoties no T-DNS konstrukcijas (nulle segregants). T-DNS neesamība genomā tika pārbaudīta ar PCR analīzi, kas amplificēja 3 dažādus T-DNS rajonus (Haun et al. 2014; Mathis et al. 2014).

FAD2KO soja ir saistīta ar citu genomiski rediģētu sojas veidu, FAD3KO.

Autorizācijas

ASV USDA APHIS ir atzinis, ka FAD2KO soja nav pakļauta regulācijas prasībām, ņemot vērā, ka tā nesatur DNS no citiem organismiem, kas varētu būt augu vai dzīvnieku kaitēkļi (http://www.aphis.usda.gov/biotechnology/downloads/reg_loi/collectis_air_fad2k0_soy_cb_idel.pdf). ASV FDA ir izvērtējusi Calyxt iesniegto Biotechnology Notification File No. 000164 attiecībā uz pārtiku (<https://www.fda.gov/media/120708/download>) un dzīvnieku barību (<https://www.fda.gov/media/120660/download>) un atzinusi, ka tai nav iebildumu pret šo produktu izplatīšanu tirgū (<https://www.fda.gov/media/120707/download>). 2019. g. ir uzsākta FAD2KO sojas eļļas izplatīšana ASV tirgū ar preču zīmi "Calyno™ High Oleic Soybean Oil".

FAD2KO soja nav autorizēta ES.

Sojas reproduktīvā bioloģija un saistība ar rediģēto pazīmju iedzimtību

Soja ir diploīds, pārsvarā pašapputes augs. Modernās sojas šķirnes ir homozigotiskas, tādējādi var pieņemt, ka delēcijas *FAD2-1A* un *FAD2-1B* gēnos sojas šķirnēs būs homozigotiskā stāvoklī. Turklāt augi, kas saturēja tikai vienu vai otru gēna delēcijas homozigotiskā stāvoklī uzrādīja *wt* sojai līdzīgu taukskābju profilu, un tikai sojas līnija GM026-18, kas saturēja abu gēnu delēcijas homozigotiskā stāvoklī uzrādīja paaugstinātu oleīnskābes koncentrāciju (~80%), kā arī samazinātu linolskābes (<4%) koncentrāciju (Haun et al. 2014). Tādējādi sojas selekcijas procesā būs nepieciešams saglabāt abu gēnu delēcijas homozigotiskā stāvoklī, lai

nodrošinātu pazīmes izpausmi. Ņemot vērā, ka soja ir pārsvarā pašapputes augs, sojas sēklas, ka iegūtas no līnijas GM026-18, vai no tās iegūtām šķirnēm, saturēs abu gēnu delēcijas homozigotiskā stāvoklī. Kvantitatīvi nosakot abu gēnu delēcijas sojas genomā, jāņem vērā, ka *wt* DNS sekvenču klātbūtne liecina par *wt* materiāla piejaukumu.

Detalizēta informācija par FAD2KO soju atrodama EUGENIUS datu bāzē (https://euginius.eu/euginius/pages/gmo_detail.jsf?gmoname=FAD2KO+Soybean). TALEN konstrukcijas, kas tika izmantotas FAD2-1A un FAD2-1B gēnu rediģēšanai, dotas 8. tabulā.

8.tabula

TALEN konstrukcijas, kas tika izmantotas FAD2-1A un FAD2-1B gēnu rediģēšanai (Christian et al. 2013; Haun et al. 2014)

Ģenētiskais elements	Izcelsmē	Funkcija
TALEN konstruktija FAD2_T04		
S35 promoters	Puķkāpostu mozaīkas vīruss	TALEN monomēru kodējošās daļas transkripcija
Divas TALEN monomēru kodējošās sekvences	Sintētiskas sekvences	Kodē divas sekvences specifiskus TALEN monomērus, kas dimēra formā atpazīst noteiktas DNS sekvences un veido divpavedienu DNS pārrāvumus
T2A sekvence	“Thosea asigna” vīruss	Ribosomu pārlēkšanas (angl. <i>skipping</i>) sekvence, kas ļauj abus TALEN monomērus translēt no vienas mRNS
NOS terminators	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Transkripcijas terminators TALEN ekspresijas kasetē

Iespējamās metodes detekcijai

FAD2KO Sojas noteikšanas metodes ir aprakstītas (Haun et al. 2014; Mathis et al. 2014), kā arī datu bāzē (https://euginius.eu/euginius/pages/gmo_detail.jsf?gmoname=FAD2KO+Soybean). FAD2KO Sojas noteikšanas metodes pamatojas uz abu raksturoto delēciju rajonu amplifikāciju ar PCR. Lai pierādītu, ka pētāmais materiāls (pārtika, dzīvnieku barība) satur FAD2KO soju, varētu tikt izmantotas tādas metodes kā:

- 1) Mērķēta jaunās paaudzes sekvenēšana, lai pierādītu deletētās sekvences FAD gēnos;
- 2) Duplex TaqMan reālā laika PĶR;
- 3) dPCR.

Kvantitatīvai delēciju noteikšanai ir nepieciešama arī sojas genoma standarta noteikšana. Visbiežāk kā iekšējo standartu izmanto sojas lektīna gēnu, kuru var noteikt ar

kvantitatīvā reālā laika PCR metodi
(https://euginius.eu/euginius/pages/gmo_detail.jsf?gmoname=FAD2KO+Soybean).

Atsauces

- Christian M, Qi Y, Zhang Y, Voytas DF (2013) Targeted mutagenesis of *Arabidopsis thaliana* using engineered TAL effector nucleases. *G3* (Bethesda, Md) 3:1697-1705
- Clemente TE, Cahoon EB (2009) Soybean Oil: Genetic Approaches for Modification of Functionality and Total Content. *Plant Physiology* 151:1030-1040
- Haun W, Coffman A, Clasen BM, Demorest ZL, Lowy A, Ray E, Retterath A, Stoddard T, Juillerat A, Cedrone F, Mathis L, Voytas DF, Zhang F (2014) Improved soybean oil quality by targeted mutagenesis of the fatty acid desaturase 2 gene family. *Plant Biotechnology Journal* 12:934-940
- Mathis L, Voytas DF, Zhang F, Haun W (2014) New soybean plant, plant part or plant cell comprises mutation in delta-twelve fatty acid desaturase 2 (FAD2)-1A alleles and/or FAD2-1B alleles for producing soybean oil having increased oleic acid content and reduced linoleic acid content. *Cellectis (Cect-C)* pp 2966983-A2966981

4.5. Genomiski rediģētā soja "FAD3KO Soybean"

GMO	Suga	Īpašības	Kompānija/ Attīstītājs
FAD3KO Soybean	<i>Glycine max</i> (soja)	Izmainīts taukskābju sastāvs	Calyxt/Cellectis plant sciences

Vispārējs apraksts

FAD3KO soja (alternatīvs nosaukums Gm183 vai Gm184) satur delēcijas *FAD3A* un/vai *FAD3B* un/vai *FAD3C* gēnos, kas inaktīvē šo gēnus, kas kodē taukskābju desaturāzes enzīmus. Sojas sēklās to nobriešanas laikā mononepiesātinātā oleīnskābe tiek pārvērsta par linolskābi (omega-6-taukskābe, divas divkāršās saites) desaturācijas procesā, kuru veic *FAD2* gēnu kodētā D12 taukskābju desaturāze. Tālāk linolskābe desaturācijas procesā, kuru veic *FAD3* gēnu kodētā D15 taukskābju desaturāze, tiek pārvērsta par linolēnskābi (omega-3-taukskābe, trīs divkāršās saites) (Clemente and Cahoon 2009).

Sojas eļļa dabiski satur salīdzinoši augstu daudzumu polinepiesātināto taukskābju, kas veicina eļļas bojāšanos oksidācijas procesā. Lai samazinātu polinepiesātināto taukskābju daudzumu ir iespējams pielietot sojas eļļas hidrogenāciju, taču tās rezultātā papildus veidojas cilvēka veselībai kaitīgas trans-taukskābes. Tādējādi viens no sojas selekcijas mērķiem ir veidot šķirnes ar palielinātu mononepiesātināto un samazinātu polinepiesātināto taukskābju sastāvu (Clemente and Cahoon 2009).

FAD3KO (Gm183 vai Gm184) soja tika izveidota ar *Agrobacterium rhizogenes* K599 saknīšu transformāciju.

Transformācijas procesā tika izmantots sekojošs augu materiāls:

1. Gm183 līnija tika iegūta transformējot TALEN T-DNS konstrukcijas genomiski rediģētās sojas līnijas FAD2KO (GM026-18) dīgļos. Ņemot vērā, ka FAD2KO soja jau satur homozigotiskas delēcijas *FAD2-1A* un *FAD2-1B* gēnos, šajā līnijā tika iegūtas papildus homozigotiskas delēcijas *FAD3A* gēnā, tādējādi papildus paaugstinātam oleīnskābes daudzumam tika iegūts arī samazināts linolēnskābes daudzums (Demorest et al. 2016).
2. Gm184 līnija tika iegūta transformējot TALEN T-DNS konstrukcijas sojas šķirnes 'Bert' dīgļos. Šajā līnijā tika iegūta homozigotiska delēcija *FAD3A* gēnā (Demorest et al. 2016).

Abos gadījumos genoma rediģēšana tika panākta ar TALEN enzīmus ekspresējošu T-DNS konstrukciju. Specifiskais TALEN enzīms FAD3_T02.1 bija izveidots, par mērķi izvēloties galvenokārt *FAD3A* gēnu, kas ir ekspresēts augstākā līmenī sojas sēklās. TALEN konstrukcijas mērķsekvenču bija atrodamas arī *FAD3B* un *FAD3C* gēnos, taču tā atšķīrās no *FAD3A* gēna mērķsekvenču ar vairākiem SNP (Demorest et al. 2016). *FAD2-1A*, *FAD2-1B* un *FAD3A* gēnu delēcijas FAD3KO līnijā GM183 ir homozigotiskā stāvoklī. T-DNS konstrukcija saturēja 35S promoteru, divas TALEN monomērus kodējošās sekvenču, kas bija saistītas ar T2A sekvenci, kā arī *nos* terminatoru. FAD3KO soja tika iegūta ģenētiskās skaldīšanās rezultātā, atbrīvojoties no T-DNS konstrukcijas (nulles segregants). T-DNS neesamība genomā tika pārbaudīta ar PCR analīzi, kas amplificēja 3 dažādus T-DNS rajonus (Haun et al. 2014; Mathis et al. 2014).

FAD3KO soja ir iegūta no genomiski rediģētās sojas FAD2KO.

Autorizācijas

2020. g. ASV USDA APHIS ir atzinis, ka FAD3KO soja nav pakļauta regulācijas prasībām, ņemot vērā, ka tā nesatur DNS no citiem organismiem, kas varētu būt augu vai dzīvnieku kaitēkļi (https://www.aphis.usda.gov/biotechnology/downloads/reg_loi/15-071-01air.pdf). FAD3KO sojas eļļu ASV tirgū paredzēts izplatīt ar preču zīmi "High oleic low linolenic (HOLL)".

FAD3KO soja nav autorizēta ES.

Sojas reproduktīvā bioloģija un saistība ar rediģēto pazīmju iedzimtību

Soja ir diploīds, pārsvarā pašapputes augs. Modernās sojas šķirnes ir homozigotiskas, tādējādi var pieņemt, ka delēcijas *FAD2-1A*, *FAD2-1B* un *FAD3A* gēnos sojas šķirnēs būs homozigotiskā stāvoklī. Turklāt augi, kas saturēja tikai vienu, otru, vai trešo gēna delēcijas homozigotiskā stāvoklī uzrādīja *wt* sojai līdzīgu taukskābju profilu, un tikai sojas līnija Gm183, kas saturēja visu gēnu delēcijas homozigotiskā stāvoklī uzrādīja paaugstinātu oleīnskābes koncentrāciju (~82.2%), kā arī samazinātu linolskābes (2.7%) un linolēnskābes (2.5%) koncentrāciju (Demorest et al. 2016). Tādējādi sojas selekcijas procesā būs nepieciešams saglabāt visu gēnu delēcijas homozigotiskā stāvoklī, lai nodrošinātu pazīmes izpausmi. Ņemot vērā, ka soja ir pārsvarā pašapputes augs, sojas sēklas, kas iegūtas no līnijas Gm183, vai no tās iegūtām šķirnēm, saturēs visu gēnu delēcijas homozigotiskā stāvoklī. Kvantitatīvi nosakot

gēnu delēcijas sojas genomā, jāņem vērā, ka *wt* DNS sekvenču klātbūtne liecina par *wt* materiāla piejaukumu.

Detalizēta informācija par FAD3KO soju atrodama EUGENIUS datu bāzē (https://euginius.eu/euginius/pages/gmo_detail.jsf?gmoname=FAD3KO+Soybean). TALEN konstrukcijas, kas tika izmantotas FAD3A gēnu rediģēšanai, dotas 9. tabulā.

9.tabula

TALEN konstrukcijas, kas tika izmantotas *FAD3A* gēnu rediģēšanai (Christian et al. 2013; Demorest et al. 2016; Haun et al. 2014)

Ģenētiskais elements	Izcelsme	Funkcija
TALEN konstruktija FAD2_T02.1		
S35 promoters	Puķkāpostu mozaīkas vīruss	TALEN monomēru kodējošās daļas transkripcija
Divas TALEN monomēru kodējošās sekvences	Sintētiskas sekvences	Kodē divas sekvences specifiskus TALEN monomērus, kas dimēra formā atpazīst noteiktas DNS sekvences un veido divpavedienu DNS pārrāvumus
T2A sekvenca	“Thosea asigna” vīruss	Ribosomu pārlēkšanas (angl. <i>skipping</i>) sekvenca, kas ļauj abus TALEN monomērus translēt no vienas mRNS
NOS terminators	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Transkripcijas terminators TALEN ekspresijas kasetē

Iespējamās metodes detekcijai

FAD3KO Sojas noteikšanas metodes ir aprakstītas (Demorest et al. 2016; Mathis et al. 2014), kā arī EUGENIUS datu bāzē (https://euginius.eu/euginius/pages/gmo_detail.jsf?gmoname=FAD3KO+Soybean). Tās pamatojas uz abu raksturoto delēciju rajonu amplifikāciju ar PCR. Lai pierādītu, ka pētāmais materiāls (pārtika, dzīvnieku barība) satur FAD3KO soju, varētu tikt izmantotas tādas metodes kā:

- 1) Mērķēta jaunās paaudzes sekvenēšana, lai pierādītu deletētās sekvences *FAD* gēnos;
- 2) Duplex TaqMan reālā laika PĶR;
- 3) dPCR.

Kvantitatīvai delēciju noteikšanai ir nepieciešama arī sojas genoma standarta noteikšana. Visbiežāk kā iekšējo standartu izmanto sojas lektīna gēnu, kuru var noteikt ar kvantitatīvā reālā laika PCR metodi (https://euginius.eu/euginius/pages/gmo_detail.jsf?gmoname=FAD3KO+Soybean).

Atsauces

- Christian M, Qi Y, Zhang Y, Voytas DF (2013) Targeted mutagenesis of *Arabidopsis thaliana* using engineered TAL effector nucleases. *G3* (Bethesda, Md) 3:1697-1705
- Clemente TE, Cahoon EB (2009) Soybean Oil: Genetic Approaches for Modification of Functionality and Total Content. *Plant Physiology* 151:1030-1040
- Demorest ZL, Coffman A, Baltes NJ, Stoddard TJ, Clasen BM, Luo S, Retterath A, Yabandith A, Gamo ME, Bissen J, Mathis L, Voytas DF, Zhang F (2016) Direct stacking of sequence-specific nuclease-induced mutations to produce high oleic and low linolenic soybean oil. *BMC Plant Biology* 16:225
- Haun W, Coffman A, Clasen BM, Demorest ZL, Lowy A, Ray E, Retterath A, Stoddard T, Juillerat A, Cedrone F, Mathis L, Voytas DF, Zhang F (2014) Improved soybean oil quality by targeted mutagenesis of the fatty acid desaturase 2 gene family. *Plant Biotechnology Journal* 12:934-940
- Mathis L, Voytas DF, Zhang F, Haun W (2014) New soybean plant, plant part or plant cell comprises mutation in delta-twelve fatty acid desaturase 2 (FAD2)-1A alleles and/or FAD2-1B alleles for producing soybean oil having increased oleic acid content and reduced linoleic acid content. *Collectis (Cect-C)* pp 2966983-A2966981

4.6. Genomiski rediģētie kvieši "MLO_KO Wheat"

ĢMO	Suga	Īpašības	Kompānija/ Attīstītājs
MLO_KO Wheat	<i>Triticum aestivum</i> (kvieši)	Patogēnu rezistence – izturība pret miltrasu	Calyxt

Vispārējs apraksts

MLO_KO Wheat satur delēcijas *MLO* gēnā, kas inaktivē šo gēnu, tādējādi nodrošinot plaša spektra (rases nespecifisku) izturību pret miltrasas patogēnu *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (*Bgt*) (Wang et al. 2014).

MLO gēns ir viens no pirmajiem klonētajiem un molekulāri raksturotajiem augu slimību izturības gēniem (Buschges et al. 1997). Recesīvas, homozigotiskas mutācijas miežu *MLO* gēnā, t.i., *mlo/mlo* genotips, nodrošina ilglaicīgu (angl. *durable*), plaša spektra rases nespecifisku izturību pret miežu miltrasas patogēnu *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (*Bgh*), kas tiek plaši pielietota miežu selekcijā pasaulē (Piffanelli et al. 2004), kā arī Latvijā (Dreiseitl and Rashal 2004; Kokina et al. 2008). Homologās mutācijas citās augu sugās arī nodrošina izturību pret atbilstošiem miltrasas patogēniem (Acevedo-Garcia et al. 2014), taču poliploīdās augu sugās, kā piemēram, heksaploīdajos maizes kviešos (*Triticum aestivum* L.), vienlaicīga visu *MLO* gēna alēļu inaktivācija ir sarežģīta. Piemēram, izmantojot TILLING metodi tika iegūtas

mutācijas visās trijās *MLO* gēna homeoalēlēs, taču tās nespēja nodrošināt pilnīgu miltrasas izturību (Acevedo-Garcia et al. 2017).

MLO_KO Wheat tika izveidota izmantojot TALEN konstrukcijas ekspresiju ziemas kviešu šķirnē Kenong199 un vasaras kviešu šķirnē Bobwhite. TALEN ekspresijas kasete sastāvēja no divām TALEN sekvencēm, kas bija specifiskas sekvencēm *MLO* gēna otrajā eksonā. Transformēto augu selekcijai tika izmantota *bar* gēna ekspresijas kasete. Abas ekspresijas kasetes saturēja kukurūzas *P-ubi1* promoteru un *nos* terminatora sekvenci no *Agrobacterium*. Abas konstrukcijas tika ievadītas kviešu embrijos ar biolītiskās bombardēšanas metodi. Tika iegūts T0-3 augs, kurā *MLO* gēnā bija novērojamas delēcijas A, B un D genoma kopijā heterozigotiskā stāvoklī. Pašapputes un skaldīšanās ceļā tika iegūti augi, kuri nesaturēja T-*MLO* un *bar* gēna kasetes, kā arī saturēja homozigotiskas delēcijas A, B un D genomu *MLO* gēnā (Wang et al. 2014).

Autorizācijas

MLO_KO Wheat nav autorizēti nevienā pasaules valstī.

Kviešu reproduktīvā bioloģija un saistība ar rediģēto pazīmju iedzimtību

Maizes kvieši (*Triticum aestivum*) ir pārsvarā pašapputes augs, kas satur poliploidizācijas ceļā apvienotus A, B un D genomus. A, B un D genomi ir samērā līdzīgi, taču ne identiski, un vairošanās procesā veidojas gamētas, kas satur par vienu A, B un D genoma kopijai. Modernās kviešu šķirnes ir homozigotiskas, tādējādi var pieņemt, ka delēcijas A, B un D genomu *MLO* gēnos būs homozigotiskā stāvoklī. Turklāt miltrasas izturību nodrošina tikai pilnīga *MLO* gēna inaktivācija, tādējādi kviešu selekcijas procesā būs nepieciešams saglabāt visas *MLO* delēcijas homozigotiskā stāvoklī, lai nodrošinātu pazīmes izpausmi. Ņemot vērā, ka kvieši ir pārsvarā pašapputes augs, kviešu sēklas, kas iegūtas no līnijas *MLO_KO* Wheat, vai no tās iegūtām šķirnēm, saturēs *MLO* gēna delēcijas homozigotiskā stāvoklī A, B un D genomos. Kvantitatīvi nosakot gēnu delēcijas kviešu genomā, jāņem vērā, ka *wt MLO* sekvenču klātbūtne liecina par *wt* materiāla piejaukumu.

Detalizēta informācija par *MLO_KO* Wheat atrodama EUGENIUS datu bāzē (https://euginus.eu/euginus/pages/gmo_detail.jsf?gmoname=MLO_KO+Wheat). TALEN konstrukcijas, kas tika izmantotas *MLO* gēnu rediģēšanai, ir dotas 10. tabulā.

TALEN konstrukcijas, kas tika izmantotas MLO gēnu rediģēšanai (Wang et al. 2014).

Ģenētiskais elements	Izcelsme	Funkcija
TALEN konstrukcija T-MLO (Wang et al. 2014)		
<i>P-ubi1</i>	Kukurūza (<i>Zea mays</i>)	Kukurūzas <i>UBI-1</i> gēna promoters, pirmais eksons un introns veic TALEN monomēru kodējošās daļas transkripciju
Divas TALEN monomēru kodējošās sekvences	Sintētiskas sekvences	Kodē divus sekvences specifiskus TALEN monomērus, kas dimēra formā atpazīst noteiktas DNS sekvences un veido divpavedienu DNS pārrāvumus
NOS terminators	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Transkripcijas terminators TALEN ekspresijas kasetē
pAHC20 konstrukcija ar <i>bar</i> gēnu (Christensen and Quail 1996)		
<i>P-ubi1</i>	Kukurūza (<i>Zea mays</i>)	Kukurūzas <i>UBI-1</i> gēna promoters, pirmais eksons un introns veic TALEN monomēru kodējošās daļas transkripciju
<i>Bar</i>	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Fosfinotricīna acetiltransferāze, ko kodē <i>bar</i> gēns, inaktivē herbicīdu amonija glufosinātu un kalpo kā selekcijas marķieris transformēto augu atlasei
NOS terminators	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Transkripcijas terminators TALEN ekspresijas kasetē

Iespējamās metodes detekcijai

MLO_KO Wheat *MLO* gēna delēciju noteikšanas metodes ir aprakstītas (Wang et al. 2014). Tās pamatojas uz abu raksturoto delēciju rajonu amplifikāciju ar PCR. Lai pierādītu, ka pētāmais materiāls (pārtika, dzīvnieku barība) satur MLO_KO Wheat, varētu tikt izmantotas tādas metodes kā:

- 1) Mērķēta jaunās paaudzes sekvenēšana, lai pierādītu deletētās sekvences *MLO* gēnos;
- 2) Duplex TaqMan reālā laika PQR;
- 3) dPCR.

Kvantitatīvai delēciju noteikšanai ir nepieciešama arī kviešu genoma standarta noteikšana. EUGINIUS datu bāzē ir aprakstīta TaqMan kvantitatīvā reālā laika PCR metode kviešu D genoma WAXY gēnam (https://euginius.eu/euginius/pages/gmo_detail.jsf?gmoname=MLO_KO+Wheat).

Atsauces

Acevedo-Garcia J, Kusch S, Panstruga R (2014) Magical mystery tour: MLO proteins in plant immunity and beyond. *New Phytologist* 204:273-281

- Acevedo-Garcia J, Spencer D, Thieron H, Reinstädler A, Hammond-Kosack K, Phillips AL, Panstruga R (2017) mlo-based powdery mildew resistance in hexaploid bread wheat generated by a non-transgenic TILLING approach. *Plant Biotechnology Journal* 15:367-378
- Buschges R, Hollricher K, Panstruga R, Simons G, Wolter M, Frijters A, Van Daelen R, Van Der Lee T, Diergarde P, Groenendijk J, Topsch S, Vos P, Salamini F, Schulze-Lefert P (1997) The barley Mlo gene: A novel control element of plant pathogen resistance. *Cell* 88:695-705
- Christensen AH, Quail PH (1996) Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Research* 5:213-218
- Dreiseitl A, Rashal I (2004) Powdery mildew resistance genes in Latvian barley varieties. *Euphytica* 135:325-332
- Kokina A, Legzdina L, Berzina I, Bleidere M, Rashal I, Rostoks N (2008) Molecular marker-based characterization of barley powdery mildew MLO resistance locus in European varieties and breeding lines. *Latvian Journal of Agronomy* 11:77-83
- Piffanelli P, Ramsay L, Waugh R, Benabdelmouna A, D'Hont A, Hollricher K, Jorgensen JH, Schulze-Lefert P, Panstruga R (2004) A barley cultivation-associated polymorphism conveys resistance to powdery mildew. *Nature* 430:887-891
- Wang Y, Cheng X, Shan Q, Zhang Y, Liu J, Gao C, Qiu J-L (2014) Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat Biotech* 32:947-951
- USDA APHIS. 2015. https://www.aphis.usda.gov/biotechnology/downloads/reg_loi/15-352-01_air_inquiry_cbidel.pdf

4.7. Genomiski rediģētie kartupeļi “GE-Vinv Potato”

GMO	Suga	Īpašības	Kompānija/ Attīstītājs
GE-Vinv Potato	<i>Solanum tuberosum</i> (kartupelis)	Samazināta aukstuma inducētā cukuru uzkrāšanās un ar tiem saistītā akrilamīda veidošanās augstā apstrādes temperatūrā	Calyxt

Vispārējs apraksts

GE-Vinv Potato līnijai ir inaktivēts vakuolārās invertāzes gēns *Vinv*, kā rezultātā šie kartupeļi ir labāk uzglabājami un patērētājam drošāki (Clasen et al. 2016).

Kartupeļus uzglabājot aukstumā, viena no nevēlamajām blakusparādībām ir aukstuma inducētā pasaldināšanās (angl. val. *cold-induced sweetening* – CIS), kas izpaužas kā cukuru

uzkrāšanās kartupeļu bumbuļos. Apstrādājot šādus kartupeļus augstā temperatūrā, to produkti kļūst tumši un rūgti, turklāt augstā apstrādes temperatūrā kartupeļos uzkrātie reducējošie cukuri (piemēram, monosaharīdi glikoze un fruktoze) reaģē ar brīvajām aminoskābēm (piemēram, asparagīnu), veidojot potenciāli kancerogēnu savienojumu akrilamīdu (Tareke et al 2002). Reducējošo cukuru uzkrāšanos kartupeļos ietekmē dažādi vielmaiņas procesi, tajā skaitā cietes metabolisms (Sowokinos 2001). Invertāzes ir enzīmi, kas hidrolizē cietes sadalīšanās produktu saharozi par glikozi un fruktozi (Roitsch and Gonzalez, 2004). Viens no invertāžu veidiem ir vakuolārās invertāzes (VInv), kam ir nozīmīga loma reducējošo cukuru veidošanās procesā tieši aukstumā uzglabātos kartupeļos. Ir parādīts, ka VInv ekspresijas nomākšana ar transgēnas RNS interferences metodi (RNAi) samazina cukuru, kā arī tumšā pigmenta veidošanos aukstumā uzglabātos kartupeļos (Bhaskar et al. 2010; Zhu et al. 2016).

GE-Vinv Potato tika izveidota, izmantojot TALEN konstrukciju ekspresiju. Līnijas izveidē netika izmantoti selektīvi marķieri. TALEN konstrukciju izveide tika balstīta uz VInv 1. eksona sekvenci, kas tika iegūta no kartupeļu šķirnes *Solanum tuberosum* L. cv. Ranger Russet genoma. Lai gan kartupeļa genomā ir tikai viens VInv gēns, kartupeļa genoms ir tetraploīds un satur vairākas gēna alēles, kā arī tam raksturīgs augsts heterozigotiskums. VInv starta kodonam tuvā 600 bp rajona sekvenēšana uzrādīja trīs alēļu tipus A1, A2 un A3 aptuvenā attiecībā 1 : 2 : 1 (1 kopija : 2 kopijas : 1 kopija). Lai panāktu visu VInv alēļu inaktivāciju, balstoties uz dažādo alēļu savstarpēji vienādajām (angl. val. – *consensus*) sekvencēm tika izveidoti trīs dažādi TALEN pāri, kas mērķēti VInv kodējošās sekvences pirmo 200 bp trīs dažādos rajonos. TALEN kodējošās sekvences tika klonētas plazmīdā, kas satur Nos promoteru un terminatoru. TALEN kodējošās plazmīdas VInv_T1, VInv_T2 un VInv_T3 ar polietilēnglikola (PEG) mediēto transformāciju tika individuāli ievadītas kartupeļu protoplastos, kur tika īslaicīgi (angl. val. – *transiently*) ekspresētas, rezultātā ieviešot VInv gēnā inaktivējošas delēcijas. Mutācijas saturoši augi tika reģenerēti no protoplastu kultūrām iegūstot kallusus. No kallusiem attīstījušies dzinumi tika subklonēti un sadalīti divās paralēlās populācijās – pavairošanai un kartupeļu bumbuļu iegūšanai. Rezultātā tika iegūtas dažādas kartupeļu līnijas ar vienu līdz četrām mutantām VInv alēlēm (18 līnijās tika konstatēta vismaz viena mutanta alēle), turklāt septiņās līnijās netika konstatētas TALEN ekspresijas kasetes DNS integrācija kartupeļa genomā. Viena no iegūtajām līnijām **GE-Vinv St116-1** saturēja mutācijas visās četrās VInv alēlēs (4 bp delēcijas alēlēs A1, A2(1) un A2(2), un 17 bp delēciju alēlē A3). Delēcijas ieviesa nobīdi gēna nolasīšanas rāmī, pilnībā inaktivējot VInv. No līnijas St116-1 iegūtajos kartupeļos pēc uzglabāšanas aukstumā reducējošo cukuru glikozes un fruktozes līmenis bija zem metodes detekcijas robežas (<0,1 mg/g) un akrilamīda līmenis no tiem iegūtajos čipsos par 73,3 % zemāks salīdzinājumā ar savvaļas tipa Ranger Russet kartupeli. St116-1 līnijā gan tika konstatēta TALEN ekspresijas kasetes elementu klātbūtne auga genomā. Līnijām, kurām VInv gēns bija inaktivēts daļēji (inaktivētas bija trīs vai divas VInv alēles), arī tika novērots pazemināts cukuru līmenis (Clasen et al. 2016). Patents WO/2014/096972 apraksta nakteņu dzimtas (*Solanum*), tai skaitā kartupeļa (*Solanum tuberosum*) sugas auga, auga daļas vai auga šūnas ar vismaz divām mutantām VInv alēlēm un bez eksogēnas DNS sekvences iekļaušanas genomā iegūšanu (WO/2014/096972).

Detalizēta informācija par GE-Vinv St116-1 kartupeļu līniju atrodama EUGENIUS datu bāzē

(https://euginius.eu/euginius/pages/gmo_detail.jsf?gmoname=GE-Vinv+Potato).

Kartupeļa reproduktīvā bioloģija un saistība ar rediģēto pazīmju iedzimtību

Kartupeļi (*Solanum tuberosum*) pārsvarā tiek pavairoti veģetatīvi, tāpēc jaunie augi būs ģenētiski identiski mātes augam. Kartupeļa genomam piemīt augsts heterozigotiskums, tas ir komplekss un autotetraploīds. Citām savvaļas un kultivētajām kartupeļu šķirnēm genoms var būt no diploīda (2x) līdz pentaploīdam (5x) (Kyriakidou et al., 2020). *WInv* gēns katrā hromosomu komplektā ir pārstāvēts vienu reizi, taču tam var būt dažādas alēles. Pētījumi parāda, ka nav nepieciešams inaktivēt visas *WInv* alēles, lai novērotu reducējošo cukuru un akrilamīda līmeņa pazemināšanos kartupeļos un to produktos (Clasen et al. 2016). Atšķirīgs mutanto alēļu daudzums apgrūtinātu kvantitatīvo rediģētā kartupeļa klātbūtnes izvērtēšanu gatavos produktos.

Informācija par TALEN ekspresijas plazmīdu, kas tika izmantota *WInv* gēna rediģēšanai, dota 11. tabulā.

11.tabula

TALEN ekspresijas plazmīda, kas tika izmantota *WInv* gēna rediģēšanai (Clasen et al. 2016)

Ģenētiskais elements	Izcelsme	Funkcija
<i>Nos</i> promoters	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Nopalāna sintāzes gēna (<i>Nos</i>) promoters iniciē TALEN kodējošās daļas transkripciju
N terminālais rajons	Sintētiska sekvenca	DNS saistīšanās reģionam N galā pieguļošais rajons, kas modulē TALEN aktivitāti
TALEN monomēru kodējošās sekvences	Sintētiskas sekvences	Kodē divas sekvences specifiskus TALEN monomērus, kas dimēra formā atpazīst noteiktas DNS sekvences un veido divpavediena DNS pārrāvumus
C terminālais rajons	Sintētiska sekvenca	DNS saistīšanās reģionam C galā pieguļošais rajons, kas modulē TALEN aktivitāti
Fokl endonukleāzes gēns	<i>Flavobacterium okeanokoites</i>	TALEN katalītiskais domēns, kas šķel divpavediena DNS
<i>Nos</i> terminators	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Nopalāna sintāzes gēna (<i>Nos</i>) terminators signalizē par TALEN kodējošās daļas transkripcijas beigām

Autorizācijas

GE-Vinv Potato nav autorizēti nevienā pasaules valstī.

Iespējamās metodes detekcijai

Lai pierādītu, ka pētāmais materiāls (pārtika, dzīvnieku barība) satur GE-Vinv Potato, varētu tikt izmantotas uz polimerāzes ķēdes reakciju (PĶR) balstītas metodes:

- 1) Sangera sekvenēšana – sākotnēji ar PĶR tiktu amplificēts delēciju ietverošais genoma rajons, kas pēc tam tiktu sekvenēts abos virzienos, lai noteiktu konkrēto delēciju.

Iespējamās problēmas – viena auga genomā dažādās gēna alēlēs var būt dažāda izmēra delēcijas (piemēram, vienam augam *Vlnv* var būt gan 4 bp, gan 17 bp delēcijas), kā arī delēcijas auga genomā var būt heterozigotiskā stāvoklī, kas varētu apgrūtināt rezultātu interpretāciju;

- 2) mērķēta jaunākās paaudzes sekvenēšana, kas vienlaikus uzrādītu visas interesējošās mutācijas. Metode ir salīdzinoši laikietilpīga;
- 3) *duplex* TaqMan reālā laika PĶR, kuras pamatā ir delēcijas rajonam specifiski praimerī un zondes;
- 4) digitālā polimerāzes ķēdes reakcija (dPĶR) – nākamās paaudzes reālā laika PĶR, kurā varētu tikt izmantoti tie paši praimerī un zondes, kas klasiskajā reālā laika PĶR (iepriekšējais punkts), taču metode sola augstāku precizitāti. Viena no pieejām dPĶR metodes dizainam, lai detektētu un kvantificētu ar TALEN *Vlnv* gēnā ieviestās NHEJ (angl. val. *nonhomologous end joining* – nehomologa gala savienojuma) mutācijas varētu būt GEF-dPĶR (angl. val. *gene-editing frequencies* – gēnu rediģēšanas frekvence). Metode balstās uz divām dažādām fluorescenti iezīmētām zondēm, kas mērķētas uz vienu un to pašu delēciju ietverošā genoma rajona amplikonu. Viena zonde būtu NHEJ-nejutīga (mērķēta uz amplikona rajonu, ko neskar NHEJ mutācija) un otra NHEJ-jutīga (mērķēta uz tā paša amplikona rajonu, kurā varētu būt NHEJ mutācija). Savvaļas tipa alēles gadījumā tiks detektēta fluorescences no abām zondēm kā dubulti pozitīvu signālu klasteris. Mutācijas gadījumā NHEJ-jutīgā zonde nespēs pilnvērtīgi piesaistīties DNS sekvencai, un, ja visas alēles saturēs mutāciju, tiks novērots tikai NHEJ-nejutīgās zondes signāla klasteris. Ja delēcija būs tikai daļā alēļu, atsevišķi tiks novērots gan dubulti pozitīvu savvaļas alēļu klasteris, gan NHEJ-nejutīgās zondes signāls (Mock et al., 2016);
- 5) Kvantitatīvai delēciju noteikšanai ir nepieciešama arī kartupeļa genoma standarta noteikšana. EU references metožu datubāzē aprakstīta TaqMan kvantitatīvā reālā laika PĶR metode QT-TAX-ST-010 kartupeļu genoma UDP-glikozes pirofosforilāzes gēnam <https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods/> (Savini et al. 2006).

Atsauces

- Bhaskar PB, Wu L, Busse JS, et al. Suppression of the vacuolar invertase gene prevents cold-induced sweetening in potato. *Plant Physiol.* 2010;154(2):939-948.
- Clasen BM, Stoddard TJ, Luo S, et al. Improving cold storage and processing traits in potato through targeted gene knockout. *Plant Biotechnol J.* 2016;14(1):169-176.
- Kyriakidou M, Achakkagari SR, Gálvez López JH, et al. Structural genome analysis in cultivated potato taxa. *Theor Appl Genet.* 2020;133(3):951-966.
- Mock U, Hauber I, Fehse B. Digital PCR to assess gene-editing frequencies (GEF-dPCR) mediated by designer nucleases. *Nat Protoc.* 2016;11(3):598-615.
- Roitsch T, González M. Function and regulation of plant invertases: sweet sensations, *Trends in Plant Science.* 2004;9(12):606-613.
- Savini C, Foti N, Mazzara M, Charles Delobel C, Van Den Eede G. Event-specific Method for the Quantification of Event EH92-527-1 Potato Using Real-time PCR - Validation Report

and Protocol - Sampling and DNA Extraction of Potato. 2006. Online Publication, <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/b5f6b3aa-b620-484c-a8ad-20fe4c313bb6/language-en>

Sowokinos JR. Biochemical and molecular control of cold-induced sweetening in potatoes. *Am J Potato Res.* 2001;78:221-236.

Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, Eriksson S, Törnqvist M. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *J Agric Food Chem.* 2002;50(17):4998-5006.

WHO WO/2014/096972 Potatoes with reduced cold-induced sweetening. <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2014096972&tab=PCTBIBLIO>

Zhu X, Richael C, Chamberlain P, et al. Vacuolar invertase gene silencing in potato (*Solanum tuberosum* L.) improves processing quality by decreasing the frequency of sugar-end defects. *PLoS One.* 2014;9(4):e93381.

4.8. Genomiski rediģētā kukurūzas “BHB Hi-Yield Maize”

ĢMO	Suga	Īpašības	Kompānija/ Attīstītājs
BHB Hi-Yield Maize	<i>Zea mays</i> (kukurūza)	Paaugstināta ražība	Benson Hill Biosystems

Vispārējs apraksts

“BHB Hi-Yield” kukurūzai piemīt palielināta fotosintēzes efektivitāte un/vai kapacitāte, kas rezultātā palielina kukurūzas ražu. “BHB Hi-Yield” kukurūza ir veidota ģenētiskās rekombinācijas ceļā, ko veicināja augā ievadītā meganukleāze, kas veidoja divpavedienu DNS pārrāvumus un DNS matricu, ko izmanto šūnas reparācijas sistēma divpavedienu DNS pārrāvuma salabošanai. Reparācijas un rekombinācijas rezultātā DNS matricas ģenētiskais materiāls tika ievietots šūnas genomā, kā rezultātā augi ieguva palielinātas fotosintēzes efektivitātes un/vai kapacitātes pazīmi. Rekombināciju veicināja DNS matricas abās pusēs novietotā kukurūzas genomiskā DNS, kas bija homologa meganukleāzes šķeltajam genoma rajonam. Gan meganukleāzi kodējošā DNS, gan matricas DNS, kuru iekššūnas DNS reparācijas sistēma izmantoja homologajā rekombinācijā tika nogādātas kukurūzas šūnās ar biolītiskās bombardēšanas palīdzību. Meganukleāzes ir divpavedienu DNS pārrāvumus veidojošas saitspecifiskas nukleāzes, kuru gēni ir dabiski atrodami mikroorganismos un eikariotu šūnu mitohondriju un hloroplastu genomos, un kuras ir iespējams pielāgot noteiktu DNS sekvenču atpazīšanai un šķelšanai (Stoddard, 2014), skat. arī 2.3. nodaļu.

Informācija par BHB Hi-Yield Maize genomā ievietotajiem gēniem ir uzskatāma par konfidenciālu, attiecīgi tā nav pieejama EUGENIUS datubāzē, kā arī USDA APHIS mājas lapā (http://www.aphis.usda.gov/biotechnology/downloads/reg_loi/15-013-01air_resp.pdf; http://www.aphis.usda.gov/biotechnology/downloads/reg_loi/15-013-01air.pdf). ISAAA

ĢMO datubāzē <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/default.asp>, šāds ĢMO nav minēts, acīmredzot tādēļ, ka tas vēl nav autorizēts nevienā pasaules valstī.

Meklējot papildus informāciju zinātniskajā literatūrā par BHB Hi-Yield kukurūzu, tika konstatēts, ka informācija par šādu ĢMO nav atrodama ne Scopus, ne Web of Knowledge literatūras datu bāzēs. Meklējot uzņēmumu *Benson Hill Biosystems* adreses laukā Scopus datubāzē, tika atrastas 10 publikācijas, kuru autori ir saistīti ar šo uzņēmumu. Publikācijas bija saistītas ar augu selekciju un genoma raksturojumu un genoma rediģēšanas tehnoloģiju attīstību, taču tajās nebija aprakstīta konkrētā Hi-Yield kukurūzas līnija. Web of Knowledge Derwent Innovations Index patentu datubāzē atrodami 23 patenti, kurus iesniedzis uzņēmums (angl. *assignee*) *Benson Hill Biosystems*. Šie patenti ir saistīti ar dažādu gēnu sekvenču ievietošanu lauksaimniecības augu, tai skaitā kukurūzas genomā, kā arī ar noteiktu metožu izmantošanu šo manipulāciju veikšanai (skat. pievienoto sarakstu). Divi no šiem patentiem ir saistīti ar fotosintēzes sistēmas efektivitātes un/vai kapacitātes uzlabošanu lauksaimniecības augu kultūrās, it īpaši tādās, kas izmanto C4 fotosintēzes sistēmu. (Gray & Begemann; Gray & Priest). Nepieciešamības gadījumā ir iespējams izmantot patentos minētās polinukleotīdu secības, lai veidotu specifiskas detekcijas sistēmas, tomēr jāņem vērā, ka autorizācijas pieprasīšanai ES ir nepieciešams iesniegt arī informāciju par kvantitatīvu notikumspecifisku (angl. *event-specific*) ĢMO noteikšanas metodi.

Autorizācijas

BHB Hi-Yield Maize nav autorizēti nevienā pasaules valstī. USDA APHIS atbildot uz Benson Hill Biosystems jautājumu (http://www.aphis.usda.gov/biotechnology/downloads/reg_loi/15-013-01air.pdf), apstiprināja, ka BHB Hi-Yield kukurūza nesatur DNS sekvences no augu kaitēkļiem, tā nav iegūta ar kaitēkļu palīdzību, kā arī nepastāv paaugstināta iespēja BHB Hi-Yield kukurūzai kļūt par nezāli (http://www.aphis.usda.gov/biotechnology/downloads/reg_loi/15-013-01air_resp.pdf), tādējādi uz BHB Hi-Yield kukurūzu neattiecas ASV federālais regulējums par augu kaitēkļiem (7 CFR, 360).

Kukurūzas reproduktīvā bioloģija un saistība ar rediģēto pazīmju iedzimtību

Kukurūza (*Zea mays*) ir svešapputes augs, kas domesticēts Amerikā no vienas vai vairākām savvaļas *Zea* ģints sugām, kas kopā tiek sauktas par teosinte. Kukurūzas genoma pētījumi liecina, ka tā ir sens tetraploīds (Gaut, 2001), kā arī to, ka pastāv ļoti lielas ģenētiskas atšķirības starp kukurūzas inbred līnijām, kas var būt viens no cēloņiem novērotajai heterozei (Springer et al., 2009). Heterozes efekts kukurūzā tiek plaši pielietots selekcijā un šķirnes sēklu audzēšanā (Andorf et al., 2019), un tas arī ir galvenais iemesls, kādēļ zemnieki katru gadu pērk F1 sēklu. ĢM kukurūza nav izņēmums, un lielākā daļā gadījumu transgēns(i) ģenētiski modificētajā augā atrodas hemizigotiskā stāvoklī, bet skaldās saskaņā ar Mendēļa likumiem iegūtajā kukurūzas graudu ražā, kuru veido F2 graudi. Tas jāņem vērā kvantitatīvi nosakot transgēnu klātbūtni kukurūzas sēklā sēšanai (F1), kukurūzas augos laukā (F1) un kukurūzas

graudos, kas ir gan F2 paaudzes sēklu maisījums, bet var būt arī dažādu šķirņu un līniju maisījums, ja lauksaimniecības produkcijas krava satur graudus no dažādām saimniecībām.

Detalizēta informācija par BHB Hi-Yield kukurūzu atrodama EUGENIUS datu bāzē (https://euginius.eu/euginius/pages/gmo_detail.jsf?gmoname=BHB+Hi-Yield+Maize). Meganukleāzes konstrukcijas, kas tika izmantotas kukurūzas genoma rediģēšanai, dotas 12. tabulā.

12.tabula

Meganukleāzes konstrukcijas, kas tika izmantotas kukurūzas genoma rediģēšanai, nav sīkāk aprakstītas, taču saskaņā ar USDA APHIS iesniegto informāciju satur sekojošus elementus

Ģenētiskais elements	Izcelsme	Funkcija
Plazmīda 1		
Viens vai vairāki kukurūzas genomiskā DNS fragmenti	<i>Zea mays</i>	Konfidenciāla informācija
Klonēšanas saits	Sintētiska sekvenca	Sekvences klonēšanai
pMDC99 plazmīdu vektors ar modifikācijām	Sintētiska sekvenca	Plazmīdu vektors klonēšanai
<i>aph3</i> gēns	<i>Escherichia coli</i> K12	Kanamicīna rezistence selekcijai <i>E. coli</i>
pVS1 replikons	<i>Pseudomonas fluorescens</i> plazmīda pVS1	Replikācijas oridžins <i>Agrobacterium</i> šūnās
pBR322 replikācijas oridžins	<i>E. coli</i>	Plazmīdas replikācija <i>E. coli</i>
Plazmīda 2		
Konfidenciāla informācija	<i>Zea mays</i>	Virza tranzientu meganukleāzes gēna ekspresiju
Meganukleāzes gēns	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Veido divpavedienu pārrāvumus DNS molekulā noteiktā vietā, lai varētu notikt saitspecifiska vēlamās sekvences integrācija
Konfidenciāla informācija	<i>Zea mays</i>	Meganukleāzes gēna transkripcijas terminators
Klonēšanas saits	Sintētiska sekvenca	Sekvences klonēšanai
pMDC99 plazmīdu vektors ar modifikācijām	Sintētiska sekvenca	Plazmīdu vektors klonēšanai
<i>aph3</i> gēns	<i>Escherichia coli</i> K12	Kanamicīna rezistence selekcijai <i>E. coli</i>

Ģenētiskais elements	Izcelsme	Funkcija
pVS1 replikons	<i>Pseudomonas fluorescens</i> plazmīda pVS1	Replikācijas oridžins <i>Agrobacterium</i> šūnās
pBR322 replikācijas oridžins	<i>E. coli</i>	Plazmīdas replikācija <i>E. coli</i>

Iespējamās metodes detekcijai

BHB Hi-Yield Maize detekcijas metodes nav aprakstītas. Lai pierādītu, ka pētāmais materiāls (pārtika, dzīvnieku barība) satur BHB Hi-Yield Maize, varētu tikt izmantotas tādas metodes kā:

- 1) Mērķēta jaunās paaudzes sekvenēšana, lai pierādītu genomā ievietotās sekvences;
- 2) Duplex TaqMan reālā laika PQR;
- 3) dPCR.

Kvantitatīvai inserciju noteikšanai ir nepieciešama arī kukurūzas genoma standarta noteikšana. EUGINIUS datu bāzē ir aprakstītas vairākas kvantitatīvā reālā laika PCR metodes kukurūzas genoma gēnu noteikšanai (https://euginius.eu/euginius/pages/gmo_detail.jsf?gmoname=BHB+Hi-Yield+Maize).

Benson Hill Biosciences izgudrojumu saraksts

1. Begemann M, inventor; BENSON HILL BIOSYSTEMS INC (BENS-Non-standard), assignee. Increasing crop yield by transforming plant with coding sequence encoding RING/U-box superfamily protein (which is expressed from bundle sheath cell-preferred promoter) patent WO2019239373-A1.
2. Begemann M, inventor; BENSON HILL BIOSYSTEMS INC (BENS-Non-standard), assignee. Increasing crop yield involves transforming plant with one coding sequence encoding DUF2996 domain-containing protein, where coding sequence encoding DUF2996 domain-containing protein shares identity with amino acids patent WO2019215648-A1.
3. Begemann M, inventor; BENSON HILL BIOSYSTEMS INC (BENS-Non-standard) BENSON HILL INC (BENS-Non-standard) BENSON HILL INC (BENS-Non-standard), assignee. Increasing crop yield for increasing plant growth and yield through expression of ferredoxin-thioredoxin reductase gene in plant, which involves transforming plant with one ferredoxin-thioredoxin reductase protein-encoding sequence patent WO2019012483-A1; CA3069634-A1; IN202037001535-A; EP3652308-A1; CN111164206-A; AR113336-A1; BR112020000690-A2.
4. Begemann M, inventor; BENSON HILL BIOSYSTEMS INC (BENS-Non-standard) BENSON HILL INC (BENS-Non-standard) BENSON HILL INC (BENS-Non-standard) BENSON HILL INC (BENS-Non-standard) BENSON HILL INC (BENS-Non-standard), assignee. Increasing crop yield, by transforming plant with ATP-binding cassette transporter protein-encoding

- sequence patent WO2018215915-A1; CA3064511-A1; IN201937047872-A; CN110799526-A; EP3630801-A1; US2020208168-A1; BR112019024479-A2.
5. Begemann M, Gray BN, inventors; BENSON HILL BIOSYSTEMS INC (BENS-Non-standard), assignee. Modifying nucleotide sequence at target site in eukaryotic cell genome, by introducing DNA-targeting RNA or DNA polynucleotide encoding DNA-targeting RNA containing nucleotide sequence complementary to target DNA sequence into cell patent US2018148735-A1; US10113179-B2.
 6. Begemann M, Gray BN, inventors; BENSON HILL BIOSYSTEMS INC (BENS-Non-standard), assignee. Modifying a nucleotide sequence at a target site in the genome of a eukaryotic cell comprises introducing into eukaryotic cell a DNA-targeting RNA, or a DNA polynucleotide encoding a DNA-targeting RNA patent US2019338296-A1.
 7. Begemann M, Gray BN, inventors; BENSON HILL BIOSYSTEMS INC (BENS-Non-standard), assignee. Modifying nucleotide sequence in genome of eukaryotic or prokaryotic cell, by introducing DNA-targeting RNA, and clustered regularly interspaced short palindromic repeats associated endonuclease in *Prevotella* and *Francisella* 1 in cell patent US2019071688-A1.
 8. Begemann M, Gray BN, inventors; BENSON HILL BIOSYSTEMS INC (BENS-Non-standard) BENSON HILL BIOSYSTEMS INC (BENS-Non-standard) BENSON HILL BIOSYSTEMS INC (BENS-Non-standard) BENSON HILL INC (BENS-Non-standard) BENSON HILL INC (BENS-Non-standard) BENSON HILL INC (BENS-Non-standard), assignee. Modifying nucleotide sequence at target site in genome of eukaryotic cell involves introducing deoxyribonucleic acid-targeting ribonucleic acid, or deoxyribonucleic acid polynucleotide patent US2019048357-A1; WO2019030695-A1; US10316324-B2; AR112676-A1; CA3072312-A1; AU2018315731-A1; KR2020062184-A; EP3665279-A1; CN111373040-A.
 9. Begemann M, Gray BN, inventors; BENSON HILL BIOSYSTEMS INC (BENS-Non-standard) BENSON HILL BIOSYSTEMS INC (BENS-Non-standard) BENSON HILL BIOSYSTEMS INC (BENS-Non-standard), assignee. Modifying nucleotide sequence at target site in genome of eukaryotic or prokaryotic cell used for producing plant, involves introducing e.g. DNA-targeting RNA and monopolin complex subunit polypeptide or polynucleotide encoding polypeptide patent US2017233756-A1; WO2017141173-A2; WO2017141173-A3; US9896696-B2; EP3307884-A2; AR107632-A1; AU2017220789-A1; CA3014988-A1; IN201837030402-A; KR2018107155-A; BR112018016408-A2; CN109312316-A; JP2019504649-W; MX2018009761-A1; PH12018501722-A1.
 10. Begemann M, January E, inventors; BENSON HILL BIOSYSTEMS INC (BENS-Non-standard), assignee. Modified AGPase large subunit protein comprises one or more non-native amino acid residues selected from lysine at position 249 and glycine at position 252, asparagine at position 312 and glycine at position 317, or arginine at position 599 patent WO2019123246-A1; WO2019123246-A4; AR113962-A1.
 11. Brutnell TP, Bryant DW, Mockler TC, Wang L, inventors; BENSON HILL BIOSYSTEMS INC (BENS-Non-standard) BENSON HILL BIOSYSTEMS INC (BENS-Non-standard) BENSON HILL BIOSYSTEMS INC (BENS-Non-standard) BENSON HILL BIOSYSTEMS INC (BENS-Non-standard) BENSON HILL INC (BENS-Non-standard) BENSON HILL BIOSYSTEMS INC (BENS-Non-standard), assignee. Expressing gene of interest in plant used to modulate growth and increase yield, by transforming plant cell with DNA construct comprising promoter sequence, and regenerating transformed plant patent WO2016014809-A1; AR101331-A1; CA2955025-A1; IN201637044784-A; EP3172225-A1; US2017218387-A1;

- BR112017001229-A2; US2018030467-A9; CN108064301-A; US10407670-B2; US2019345506-A1; US10717770-B2.
12. Brutnell TP, Gray BN, Mockler TC, Wang L, inventors; BENSON HILL BIOSYSTEMS INC (BENS-Non-standard) BENSON HILL BIOSYSTEMS INC (BENS-Non-standard), assignee. Improving plant growth in a plant of interest by modulating the expression of a nucleotide sequence encoding a transcription factor polypeptide patent WO2016007640-A1; AR101167-A1; CA2954172-A1; EP3166965-A1; IN201637044427-A; CN106661584-A; US2017198298-A1; BR112017000376-A2.
 13. Chen X, Wu X, inventors; BENSON HILL BIOSYSTEMS INC (BENS-Non-standard), assignee. Transforming callus derived from mature embryos of *Setaria*, by inducing callus growth from mature embryos, co-cultivating *Agrobacterium* cells with callus tissue, culturing infected cells, and regenerating transformed tissue patent WO2016022787-A1; US2017226523-A1; BR112017002330-A2.
 14. Gray BN, inventor; BENSON HILL BIOSYSTEMS INC (BENS-Non-standard) BENSON HILL INC (BENS-Non-standard), assignee. Increasing crop yield using DNA construct, involves transforming a plant with one quinone oxidoreductase protein-encoding sequence, where quinone oxidoreductase protein-encoding sequence has identity with nucleotide sequence patent WO2019102351-A1; CA3083071-A1; AR113892-A1.
 15. Gray BN, inventor; BENSON HILL BIOSYSTEMS INC (BENS-Non-standard) BENSON HILL INC (BENS-Non-standard) BENSON HILL INC (BENS-Non-standard), assignee. Increasing crop yield involves transforming a plant with glutaredoxin protein-encoding sequence, where glutaredoxin protein-encoding sequence comprises sequence selected from group of nucleobases patent WO2019035003-A1; AR112782-A1; CA3073019-A1; CN111108206-A; IN202037007169-A; EP3668987-A1.
 16. Gray BN, inventor; BENSON HILL BIOSYSTEMS INC (BENS-Non-standard) BENSON HILL BIOSYSTEMS INC (BENS-Non-standard) BENSON HILL BIOSYSTEMS INC (BENS-Non-standard), assignee. Increasing crop yield by transforming a plant with adenosine diphosphate-glucose pyrophosphorylase small subunit (AGPaseSS) protein-encoding sequence or increasing the expression of AGPaseSS protein-encoding sequence in a plant patent WO2017221112-A1; CA3028946-A1; IN201837048186-A; EP3475429-A1; CN109642238-A; BR112018076440-A2.
 17. Gray BN, Begemann M, inventors; BENSON HILL BIOSYSTEMS INC (BENS-Non-standard) BENSON HILL BIOSYSTEMS INC (BENS-Non-standard) BENSON HILL BIOSYSTEMS INC (BENS-Non-standard) BENSON HILL INC (BENS-Non-standard), assignee. Increasing crop yield comprises transforming plant that utilizes C4 photosynthesis with at least one sodium bicarbonate cotransporter (ictB) coding sequence patent WO2016182847-A1; AR104540-A1; CA2985201-A1; IN201737040868-A; EP3294759-A1; US2018148733-A1; BR112017024024-A2; US2018355367-A1; US2020032286-A1; US10590430-B2.
 18. Gray BN, Priest HD, inventors; BENSON HILL BIOSYSTEMS INC (BENS-Non-standard) BENSON HILL BIOSYSTEMS INC (BENS-Non-standard) BENSON HILL BIOSYSTEMS INC (BENS-Non-standard) BENSON HILL BIOSYSTEMS INC (BENS-Non-standard), assignee. Increasing crop yield in a monocot or dicot plant comprises transforming a plant with thioredoxin protein-encoding sequence which is expressed from a mesophyll-preferred promoter patent WO2018002851-A1; CA3029126-A1; IN201837048545-A; CN109563519-A; BR112018077178-A2; EP3478846-A1; US2020165622-A1.
 19. Gray BN, Priest HD, inventors; BENSON HILL BIOSYSTEMS INC (BENS-Non-standard) BENSON HILL BIOSYSTEMS INC (BENS-Non-standard) BENSON HILL BIOSYSTEMS INC

- (BENS-Non-standard) BENSON HILL BIOSYSTEMS INC (BENS-Non-standard), assignee. Increasing crop yield by transforming plant with photosystem I reaction center subunit N protein-encoding sequence patent WO2017221115-A1; IN201837048188-A; CA3034672-A1; EP3475428-A1; CN109642239-A; US2019233839-A1; BR112018076446-A2.
20. Gray BN, Priest HD, inventors; BENSON HILL BIOSYSTEMS INC (BENS-Non-standard) BENSON HILL BIOSYSTEMS INC (BENS-Non-standard) BENSON HILL BIOSYSTEMS INC (BENS-Non-standard), assignee. Increasing crop yield involves transforming plant with one PAL protein-encoding sequence, and increases plant growth through expression of phenylalanine ammonia lyase gene in plant, where PAL protein-encoding sequence encodes protein patent WO2017216704-A1; CA3027254-A1; IN201837046848-A; CN109311953-A; BR112018075865-A2; EP3468986-A1; US2020149058-A1.
21. Mockler TC, inventor; BENSON HILL BIOSYSTEMS INC (BENS-Non-standard) BENSON HILL INC (BENS-Non-standard), assignee. Plant cell used for generating plant, is stably incorporated into its genome a promoter that drives expression in plant cell operably linked to ethylene response factor as transcription factor of protein-encoding sequence patent US2019233840-A1; US10508282-B2.
22. Mockler TC, inventor; BENSON HILL BIOSYSTEMS INC (BENS-Non-standard) BENSON HILL BIOSYSTEMS INC (BENS-Non-standard) BENSON HILL BIOSYSTEMS INC (BENS-Non-standard) BENSON HILL BIOSYSTEMS INC (BENS-Non-standard), assignee. Producing transgenic crops e.g. corn and rice, and improving biotic and abiotic stress tolerance, and drought resistance by transforming plant with ethylene response factor transcription factor protein-encoding sequence patent US2018119165-A1; WO2018083584-A1; AR110012-A1; AU2017353969-A1; CA3042193-A1; US10301640-B2; IN201937017167-A; BR112019008733-A2; CN110114467-A; EP3532620-A1.
23. Wu X, inventor; BENSON HILL BIOSYSTEMS INC (BENS-Non-standard), assignee. Increasing transformation frequency for transforming callus derived from immature embryos of *Brachypodium* sp. comprises producing embryogenic callus from immature embryos of *Brachypodium* sp., and growing *Agrobacterium* cells patent US2016090602-A1.

Atsauces

- Andorf, C., Beavis, W. D., Hufford, M., Smith, S., Suza, W. P., Wang, K., . . . Lübberstedt, T. (2019). Technological advances in maize breeding: past, present and future. *Theoretical and Applied Genetics*, 132(3), 817-849. doi:10.1007/s00122-019-03306-3
- Gaut, B. S. (2001). Patterns of chromosomal duplication in maize and their implications for comparative maps of the grasses. *Genome Res*, 11(1), 55-66. doi:10.1101/gr.160601
- Gray, B. N., & Begemann, M. WO2016182847-A1; AR104540-A1; CA2985201-A1; IN201737040868-A; EP3294759-A1; US2018148733-A1; BR112017024024-A2; US2018355367-A1; US2020032286-A1; US10590430-B2.
- Gray, B. N., & Priest, H. D. WO2017221115-A1; IN201837048188-A; CA3034672-A1; EP3475428-A1; CN109642239-A; US2019233839-A1; BR112018076446-A2.
- Springer, N. M., Ying, K., Fu, Y., Ji, T., Yeh, C.-T., Jia, Y., . . . Schnable, P. S. (2009). Maize inbreds exhibit high levels of copy number variation (CNV) and presence/absence variation

(PAV) in genome content. *PLoS Genet*, 5(11), e1000734. doi:10.1371/journal.pgen.1000734

Stoddard, B. L. (2014). Homing endonucleases from mobile group I introns: discovery to genome engineering. *Mobile DNA*, 5, 15. doi:10.1186/1759-8753-5-7

4.9. Genomiski rediģētā kukurūza “CRISPR-Cas Waxy Corn”

ĢMO	Suga	Īpašības	Kompānija/ Attīstītājs
CRISPR-Cas Waxy Corn	<i>Zea mays</i> (kukurūza)	Amilozes/ amilopektīna attiecība	Pioneer Hi-Bred International

Apraksts

Iegūts ar CRISPR-Cas gēnu knockout pieeju, lai inaktivētu graudu ar cietes granulām saistītās cietes sintāzes 1 (*waxy*) gēnu, kas kodē enzīmu, kas katalizē amilozes veidošanos. Rezultātā ir iegūta speciālā kukurūza, kurā ciete ir veidota tikai no amilopektīna. CRISPR-Cas Waxy Corn ir iegūta izmantojot divas *guide* RNS, kas deletē DNS sekvenci starp divām mērķa vietām un inaktivē *waxy* gēnu. Iegūtā kukurūzas līnija ir nulles segregants, kas satur konkrēto delēciju, bet nesatur nekādu insertētu DNS (https://euginius.eu/euginius/pages/gmo_detail.jsf?gmoname=CRISPR-Cas+Waxy+Corn).

CRISPR-Cas Waxy Corn izveidošanai izmantotās plazmīdas dotas 13. tabulā.

13.tabula

CRISPR-Cas Waxy Corn izveidošanai izmantotās plazmīdas (USDA APHIS, 2015)

Ģenētiskais elements	Izcelsme	Funkcija
Plazmīda 1		
ATTL1-V1	Enterobaktēriju lambda fāgs	Modificēta Gateway™ (Thermo Fisher Scientific) klonēšanas sistēmas rekombināciju vieta, lai nodrošinātu vektora konstruēšanas procesu.
Ubi-Promoter	<i>Zea mays</i> (kukurūza)	Poliubikvitīna gēna promoters; kontrolē Cas9 kodējošās sekvenču ekspresiju.
Ubi-5UTR	<i>Zea mays</i> (kukurūza)	Poliubikvitīna gēna 5' netranslēts reģions Cas9 kodējošās sekvenču optimizētai ekspresijai.
Ubi-Intron1	<i>Zea mays</i> (kukurūza)	Poliubikvitīna gēna introns 1 Cas9 kodējošās sekvenču optimizētai ekspresijai.
SV40 Kodola lokalizācijas signāls	Simian vacuolating virus 40	Īsa peptīdu līder-sekvence, kas vada Cas9 proteīna lokalizāciju šūnas kodolā.

Ģenētiskais elements	Izcelsme	Funkcija
CAS9 EXON1	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Cas9 endonukleāzes Exon 1. Cas9 endonukleāze endogēnajā mērķa DNS sekvencē izveido divpavediena DNS pārrāvumu.
ST-LS1 intron	<i>Solanum tuberosum</i> (kartupelis)	Introns ievietots, lai nodrošinātu augiem optimizētu Cas9 endonukleāzes ekspresiju.
CAS9 EXON2	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Cas9 endonukleāzes Exon 2. Cas9 endonukleāze endogēnajā mērķa DNS sekvencē izveido divpavediena DNS pārrāvumu.
PINII terminators	<i>Solanum tuberosum</i> (kartupelis)	Proteināzes inhibitora II gēna terminators, lai pārtrauktu Cas9 kodējošās sekvenču transkripciju.
ATTL2-V1	Enterobacteria lambda fāgs	Modificēta Gateway™ (Thermo Fisher Scientific) klonēšanas sistēmas rekombināciju vieta, lai nodrošinātu vektora konstruēšanas procesu.
KAN	<i>Escherichia coli</i>	Kanamicīna rezistences gēns, lai nodrošinātu to baktēriju klonu identifikāciju, kas satur plazmīdas, vektora konstrukcijas procesa laikā.
PUC ORI	<i>Escherichia coli</i>	Replikācijas sākuma vieta, lai nodrošinātu plazmīdu replikāciju baktēriju šūnās.
Plazmīda 2		
ATTL1	Enterobaktēriju lambda fāgs	Gateway™ klonēšanas sistēmas rekombināciju vieta, lai nodrošinātu vektora konstrukcijas procesu.
U6 PolIII promoters	<i>Zea mays</i> (kukurūza)	U6 polimerāzes III gēna promoters, lai nodrošinātu ZM-WXY-5' un GUIDE RNA transkripciju.
ZM-WXY-5'	<i>Zea mays</i> (kukurūza)	Kodē transkriptu [KBI ¹⁵], lai vadītu Cas9 endonukleāzi līdz šķelšanas vietai.
Guide RNA	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Kodē crRNA-tracrRNA saplūšanas transkriptu, kas vada Cas9 endonukleāzi līdz mērķa vietai. ZM-WXY-5' un Guide RNA kopīgi veido himērisku guide RNA.
U6 PolIII terminators	<i>Zea mays</i> (kukurūza)	U6 polimerāzes III gēna terminators, kas terminē 5' himēriskās guide RNA transkripciju.
ATTL3	Enterobaktēriju lambda fāgs	Gateway™ klonēšanas sistēmas rekombināciju vieta, lai nodrošinātu vektora konstrukcijas procesu.
KAN	<i>Escherichia coli</i>	Kanamicīna rezistences gēns, lai nodrošinātu to baktēriju klonu identifikāciju, kas satur plazmīdas, vektora konstrukcijas procesa laikā.
PUC ORI	<i>Escherichia coli</i>	Replikācijas sākuma vieta, lai nodrošinātu plazmīdu replikāciju baktēriju šūnās.

¹⁵ KBI – konfidenciāla biznesa informācija.

Ģenētiskais elements	Izcelsme	Funkcija
Plazmīda 3		
ATTL1	Enterobaktēriju lambda fāgs	Gateway™ klonēšanas sistēmas rekombināciju vieta, lai nodrošinātu vektora konstrukcijas procesu.
U6 PolIII promoters	<i>Zea mays</i> (kukurūza)	U6 polimerāzes III gēna promoters, lai nodrošinātu ZM-WXY-3' un GUIDE RNA transkripciju.
ZM-WXY-3'	<i>Zea mays</i> (kukurūza)	Kodē transkriptu [KBI], lai vadītu Cas9 endonukleāzi līdz šķelšanas vietai.
Guide RNA	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Kodē crRNA-tracrRNA saplūšanas transkriptu, kas vada Cas9 endonukleāzi līdz mērķa vietai. ZM-WXY-5' un Guide RNA kopīgi veido himērisku guide RNA.
U6 PolIII terminators	<i>Zea mays</i> (kukurūza)	U6 polimerāzes III gēna terminators, kas terminē 3' himēriskās guide RNA transkripciju.
ATTL3	Enterobaktēriju lambda fāgs	Gateway™ klonēšanas sistēmas rekombināciju vieta, lai nodrošinātu vektora konstrukcijas procesu.
KAN	<i>Escherichia coli</i>	Kanamicīna rezistences gēns, lai nodrošinātu to baktēriju klonu identifikāciju, kas satur plazmīdas, vektora konstrukcijas procesa laikā.
PUC ORI	<i>Escherichia coli</i>	Replikācijas sākuma vieta, lai nodrošinātu plazmīdu replikāciju baktēriju šūnās.
Plazmīda 4		
ATTL1	Enterobaktēriju lambda fāgs	Gateway™ klonēšanas sistēmas rekombināciju vieta, lai nodrošinātu vektora konstrukcijas procesu.
Ubi-Promoter	<i>Zea mays</i> (kukurūza)	Poliubikvitīna gēna promoters; kontrolē NPTII kodējošās sekvenses ekspresiju.
Ubi-5UTR	<i>Zea mays</i> (kukurūza)	Poliubikvitīna gēna 5' netranslēts reģions NPTII kodējošās sekvenses optimizētai ekspresijai.
Ubi-Intron1	<i>Zea mays</i> (kukurūza)	Poliubikvitīna gēna introns 1 NPTII kodējošās sekvenses optimizētai ekspresijai.
NPTII	<i>Escherichia coli</i>	Neomicīna fosfotransferāzes gēns, kas nodrošina rezistenci pret aminoglikozīdu antibiotikām. Izmanto kā selekcijas marķieri augu transformācijā.
PINII TERM	<i>Solanum tuberosum</i> (kartupelis)	Proteināzes inhibitora II gēna terminators, lai pārtrauktu NPTII kodējošās sekvenses transkripciju.
ATTL2	Enterobaktēriju lambda fāgs	Gateway™ klonēšanas sistēmas rekombināciju vieta, lai nodrošinātu vektora konstrukcijas procesu.

Ģenētiskais elements	Izcelsme	Funkcija
KAN	<i>Escherichia coli</i>	Kanamicīna rezistences gēns, lai nodrošinātu to baktēriju klonu identifikāciju, kas satur plazmīdas, vektora konstrukcijas procesa laikā.
PUC ORI	<i>Escherichia coli</i>	Replikācijas sākuma vieta, lai nodrošinātu plazmīdu replikāciju baktēriju šūnās.
Plazmīda 5		
ATTL1	Enterobaktēriju lambda fāgs	Gateway™ klonēšanas sistēmas rekombināciju vieta, lai nodrošinātu vektora konstrukcijas procesu.
[KBI]	[KBI]	[KBI]
ZM-ODP2	<i>Zea mays</i> (kukurūza)	Auglības (<i>ovule</i>) attīstības proteīna 2 gēna kodējošā sekvence, lai uzlabotu transformācijas biežumu.
OS-T28 TERM	<i>Oryza sativa</i> (rīsi)	Saplūstoša gēnu pāra LOC_Os03g60090.1 un LOC_Os03g60080.1 3'UTR un starpgēnu rajons, kas terminē ZM-ODP2 kodējošās sekvenses transkripciju.
ATTL2	Enterobaktēriju lambda fāgs	Gateway™ klonēšanas sistēmas rekombināciju vieta, lai nodrošinātu vektora konstrukcijas procesu.
KAN	<i>Escherichia coli</i>	Kanamicīna rezistences gēns, lai nodrošinātu to baktēriju klonu identifikāciju, kas satur plazmīdas, vektora konstrukcijas procesa laikā.
PUC ORI	<i>Escherichia coli</i>	Replikācijas sākuma vieta, lai nodrošinātu plazmīdu replikāciju baktēriju šūnās.
Plazmīda 6		
ATTL4	Enterobaktēriju lambda fāgs	Gateway™ klonēšanas sistēmas rekombināciju vieta, lai nodrošinātu vektora konstrukcijas procesu.
[KBI]	[KBI]	[KBI]
ZM-WUS2	<i>Zea mays</i> (kukurūza)	<i>Wuschel</i> 2 gēna kodējošā sekvence, lai uzlabotu transformācijas biežumu.
ZM-IN2-1 TERM	<i>Zea mays</i> (kukurūza)	In2-1 gēna terminators, kas terminē ZM-WUS2 kodējošās sekvenses transkripciju.
AT-5_IV-2 INS	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Putative insulator sequence to limit ZM-WUS2 transcript read-through.
ATTR1	Enterobaktēriju lambda fāgs	Gateway™ klonēšanas sistēmas rekombināciju vieta, lai nodrošinātu vektora konstrukcijas procesu.
KAN	<i>Escherichia coli</i>	Kanamicīna rezistences gēns, lai nodrošinātu to baktēriju klonu identifikāciju, kas satur plazmīdas, vektora konstrukcijas procesa laikā.
PUC ORI	<i>Escherichia coli</i>	Replikācijas sākuma vieta, lai nodrošinātu plazmīdu replikāciju baktēriju šūnās.

Iespējamās metodes detekcijai

Ir pieejamas daudzas validētas reālā laika PĶR metodes kukurūzas sugas detekcijai (https://euginius.eu/euginius/pages/gmo_detail.jsf?gmoname=CRISPR-Cas+Waxy+Corn). Lai pierādītu, ka pētāmais materiāls (pārtika, dzīvnieku barība) satur CRISPR-Cas Waxy Corn, varētu tikt izmantotas tādas metodes kā:

- 1) Mērķēta jaunās paaudzes sekvenēšana, lai pierādītu deletētās sekvences *waxy* gēnā;
- 2) Duplex TaqMan reālā laika PĶR;
- 3) dPCR.

5. Detekcijā izmantojamās metodes

5.1. Detekcijā izmantojamo metožu īss raksturojums

PCR RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) metode – līdz šim sekmīgi izmantota pārtikas produktu autentifikācijas noteikšanai, piemēram, gaļas sugas izcelsmes pārbaudes. Vispirms veic PCR, bet pēc tam iegūtos amplifikācijas produktus sašķeļ ar restrikcijas enzīmiem. Pēc tam tiek veikta agarozes gēla elektroforēze. Var izmantot arī kapilāro elektroforēzi (Mafra et al., 2008).

RE-PCR - *restriction enzyme digestion suppressed PCR*. Augu genomiskā DNS tiek sašķelta ar restrikcijas enzīmiem, kuru atpazīšanas sekvenca satur gRNS–Cas9 šķelšanas vietu, tad tiek amplificēta mērķa sekvenca ar specifiskiem praimeriem, wild-type DNS neamplificēsies, bet mutētās sekvences amplificēsies (Xie and Yang, 2013).

Uz DNS denaturāciju balstītas metodes – SSCP (*single-stranded conformation polymorphism analysis* jeb vienpavediena konformācijas polimorfisma analīze) (Mafra et al., 2008), DHPLC (*Denaturing High Performance Liquid Chromatography*) (Bai et al., 2011), kā arī T7 endonukleāze I, *Surveyor Assay* (Srivastava et al., 2016; Vouillot et al., 2015).

PĶR un kušanas līknes analīze (*high resolution melting analysis*, HRMA), kurā tiek izmantotas DNS heterodupleksu kušanas līknes atšķirības. HRMA ir pierādīta kā efektīva metode mutāciju noteikšanai vairākās genoma rediģēšanas platformās (ZFN, TALEN un CRISPR) (Thomas et al., 2014; Srivastava et al., 2016).

Reālā laika PĶR ar klasiskām zondēm - plaši izmantota metode klasisko ĢMO kvalitatīvai un kvantitatīvai noteikšanai pārtikā un dzīvnieku barībā. Kopā ar HRMA šī metode ir parādīta kā efektīva CRISPR/Cas mutāciju detektēšanā rīsiem (Li et al., 20202).

Reālā laika PĶR ar saīsinātām zondēm - var sasniegt labu izšķirtspēju klasisko ĢMO detekcijā, piemēram, ar MGB zondēm (Cottenet et al., 2019).

Digitālā PĶR – jaunākajās publikācijās tā tiek uzskatīta par labāko metodi (Findlay et al., 2016). Piemērs par dPCR izmantošanu ir dots nodaļā 5.2.

Sangera sekvenēšana – sekvenēšana ir piemērota zināmu secību mērķtiecīgai noteikšanai, pat ja modifikācijas ir mazas. Īpaši no viendabīgiem paraugiem iegūtai DNS modificēto lokusu var amplificēt ar PCR un sekvenēt. Iespējams, ka tas nav piemērots heterogēniem paraugiem (Grohmann et al, 2019).

Analītiskā pirosekvenēšana - NGS metode, kuras pamatā ir sekvenēšana ar sintēzes palīdzību – jaunās ķēdes sekvenca tiek noteikta, secīgi pievienojot nukleotīdus un detektējot gaismu, kad komplementārā dezoksiribonukleotīda piesaistīšanās rezultātā atbrīvojas pirofosfāts. Pirosekvenēšana ir jutīgāka par Sangera sekvenēšanu, taču iespējams iegūt salīdzinoši īsākas sekvences. Tāpēc tā ir labi piemērota nelielu sekvenču izmaiņu noteikšanai un jau ir sekmīgi izmantota klasiskajiem ĢMO gan amplikonu sekvenču noteikšanai, gan jauktā ĢMO sastāva noteikšanā multipleksā reakcijā (Shang et al., 2020; Debode et al., 2017).

High Throughput Sequencing – amplikonu sekvenēšana; *enrichment through capture probes* (Henry et al. 2014). Plašāka informācija par dažādām sekvenēšanas pieejām ir dota 5.3. nodaļā.

Atsauces

- Bai et al., 2011. Establishment of Multiplex PCR and DHPLC Method for Detecting GMO Wheat. Journal of Triticeae Crops.
- Cottenet G, Blancpain C, Sonnard V, Chuah PF. 2019. Two FAST multiplex real-time PCR reactions to assess the presence of genetically modified organisms in food. Food Chemistry, 274: 760-765.
- Debode F., Janssen E., Bragard C., Berben G. 2017. Detection by real-time PCR and pyrosequencing of the cry1Ab and cry1Ac genes introduced in genetically modified (GM) constructs, Food Additives & Contaminants: Part A, 34:8, 1398-1409.
- Debode F., Hulin J., Charlotheaux B. et al. 2019. Detection and identification of transgenic events by next generation sequencing combined with enrichment technologies. Sci Rep 9, 15595.
- Findlay et al., 2016. Digital PCR-Based Method for Efficient and Highly Specific Screening of Genome Edited Cells. PLoS ONE 11(4): e0153901.
- Grohmann L, Keilwagen J, Duensing N, Dagand E, Hartung F, Wilhelm R, Bendiek J, Sprink T 2019. Detection and Identification of Genome Editing in Plants: Challenges and Opportunities. Front. Plant Sci. 10:236.
- Henry et al. 2014. Efficient Genome-Wide Detection and Cataloging of EMS-Induced Mutations Using Exome Capture and Next-Generation Sequencing. The Plant Cell, Vol. 26: 1382–1397.
- Jouanin A., Tenorio-Berrio R., Schaart J.G., Leigh F., Visser R.G.F., Smulders M.J.M. 2020. Optimisation of droplet digital PCR for determining copy number variation of α -gliadin

genes in mutant and gene-edited polyploid bread wheat. *Journal of Cereal Science* 92:102903.

Li R., Ba Y., Song Y., Cui J., Zhang X., Zhang D., Yuan Z., Yang L. 2020. Rapid and sensitive screening and identification of CRISPR/Cas9 edited rice plants using quantitative real-time PCR coupled with high resolution melting analysis. *Food Control*, 112:107088.

Mafra et al., 2008. Food authentication by PCR-based methods. *Eur Food Res Technol* (2008) 227:649–665.

Shang Y., Xu Y., Huang K., Luo Y., Xu W. 2020. Multiplex pyrosequencing quantitative detection combined with universal primer-multiplex-PCR for genetically modified organisms. *Food Chemistry*, 320:126634.

Srivastava et al., 2016. Detection of nucleotide-specific CRISPR/Cas9 modified alleles using multiplex ligation detection. *Sci Rep* 6, 32048.

Thomas HR, Percival SM, Yoder BK, Parant JM (2014) High-Throughput Genome Editing and Phenotyping Facilitated by High Resolution Melting Curve Analysis. *PLOS ONE* 9(12): e114632.

Vouillot L., Thélie A., Pollet N. 2015. Comparison of T7E1 and Surveyor Mismatch Cleavage Assays to Detect Mutations Triggered by Engineered Nucleases. *G3: Genes, Genomes, Genetics* 5(3): 407-415.

Xie and Yang, 2013. RNA-Guided Genome Editing in Plants Using a CRISPR–Cas System. *Molecular Plant* 6:1975–1983.

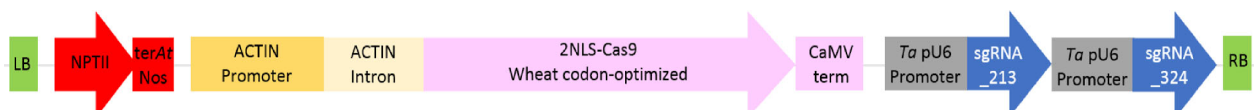
5.2. ddPQR optimizācija, lai noteiktu α -gliadīna gēnu kopiju skaita variācijas mutantos un genomiski redīgētos poliploīdos kviešos

Ievads

Kvieši ir viena no pasaulē visplašāk audzētajām pārtikas graudzālēm, un tie ir nozīmīga cilvēka ēdienkartes sastāvdaļa. Kviešu graudi satur glutēna proteīnus (glutenīnus un gliadīnus), kam ir nozīmīga loma maizes gatavošanas procesā. Gliadīni ir ūdenī nešķīstošā glutēna sastāvdaļa, bet glutenīni – šķīstošā. Daļai cilvēku pret glutēna proteīnu imunogēnajiem epitopiem novērojamas nevēlamas imūnas reakcijas, kas var izpausties piemēram, kā celiakija vai ar celiakiju nesaistīta jutība pret glutēnu. Celiakija un jutība pret glutēnu izpaužas kā hronisks iekaisums tievajās zarnās, kas var izraisīt iekaisīgo zarnu slimību, kā arī nepietiekamu uzturvielu uzņemšanu. Pasaulē celiakijas prevalence ir 0,7 - 1,4 % (Singh et al., 2018). Pagaidām glutēna nepanesamības izraisītos traucējumus var ārstēt, tikai izslēdzot no uztura glutēnu saturošus pārtikas produktus.

Viena no galvenajām proteīnu grupām, kas saistīta ar celiakijas attīstību, ir gliadīni, kas sastopami gan kviešos, gan arī citos *Triticum* ģints graudaugos. Pazemināta glutēna saturs kviešu izstrādā aprūtinā tas, ka pārtikā izmantojamajai sugai *Triticum aestivum* jeb ir viens no

sarežģītākajiem zināmajiem genomiem. Tas ir heksaploīds, satur daudz gandrīz identisku, izkaisītu sekvenču, kā arī haploīdais genoma izmērs pārsniedz 15 miljardus bāzu (Zimin et al., 2017). Gliadīnus kodējošie gēni iedalāmi četrās gēnu saimēs (α -, γ -, δ -, ω -), un katrā saimē ietilpstošie gēni kvieša genomā pārstāvēti daudzās kopijās. Piemēram, α -gliadīna gēni atkarībā no kviešu veida genomā var būt pārstāvēti vairākos desmitos līdz pat 150 kopiju (Anderson et al., 1997). Ņemot vērā kviešu sarežģīto genoma struktūru, ar tradicionālajām selekcijas metodēm līdz šim nav izdevies radīt kviešus bez glutēna imunogēnajiem epitopiem vai pilnībā bez glutēna. Zinātniskajās publikācijās aprakstīti sekmīgi mēģinājumi nomākt gliadīna gēnu ekspresiju ar RNS interferenci (Gil-Humanes et al., 2010), kā arī rediģēt kviešu gliadīnu gēnus ar CRISPR/Cas9 sistēmu (Sánchez-León et al., 2018; Jouanin et al., 2019; Jouanin et al., 2020b), tomēr pagaidām šie mēģinājumi vēl ir zinātnisko eksperimentu stadijā. Piemēram, lai ieviestu mutācijas α - un γ -gliadīna gēnos, Jouanin et al. (2019) transformēja heksaploīdo kviešu šķirni 'Felder', izmantojot četrus CRISPR/Cas9 konstruktus, kas satur sgRNS (angļu val. *single guide RNA* – vienota RNS molekula, kas satur gan sekvenču specifisko rajonu, gan Cas9 vadības sekvenču). 12. attēlā parādīts CRISPR/Cas9 T-DNS konstrukta piemērs, kas satur divas sgRNS molekulas: sgRNA_213 un sgRNA_324. Kopumā četrus konstruktus tika izmantotas sešas dažādas sgRNS molekulas dažādās kombinācijās. Izmantojot izveidotos konstruktus, šķirnes 'Felder' heksaploīdajā genomā tika ieviestas nelielas mutācijas esošajā gēna nolasīšanas rāmī, kas radītu gliadīnus, kas nav imunogēni, bet saglabātu maizes gatavošanā nepieciešamās īpašības, vai arī izjauktu nolasīšanas rāmi, padarot gēnu pilnībā nefunkcionālu, tādējādi zaudējot gan imunogenitāti, gan pārējās gēnu produktu funkcijas, kas varētu būt nozīmīgas maizes gatavošanā. Ņemot vērā, ka gliadīna gēni genomā sastopami daudzās kopijās, un nemodificētie gēni var kompensēt modificēto gēnu ekspresiju, ir būtiski panākt pēc iespējas lielāku skaita gliadīna gēnu inaktivāciju. Konstrukti tika izveidoti izmantojot informāciju par vairāk nekā 1200 α - un γ -gliadīna gēnu sekvenčām (12. attēls).



12.attēls. CRISPR/Cas9 T-DNS konstrukta piemērs. LB – kreisā robeža (*left border*), NPTII – neomicīna fosfotransferāzes II gēns (selektīvais marķieris), *terAt Nos* – *Agrobacterium tumefaciens* nopalāna sintāzes terminators, ACTIN Promoter – aktīna promoters, ACTIN Intron – aktīna introns, 2NLS-Cas9 Wheat codon-optimized – ekspresijai kviešos optimizētais II-A tipa *Streptococcus pyogenes* 2NLS-Cas9 gēns, CaMV term – puķkāpostu mozaīkas vīrusa terminators, *Ta pU6 Promoter* – ekspresijai kviešos optimizētais U6 promoters, sgRNA_213 - *single guide RNS* 213, sgRNA_324 – *single guide RNS* 324, RB – labā robeža (*right border*).

Nenobrieduši 'Felder' līnijas embriji tika transformēti, izmantojot *Agrobacterium tumefaciens* starpniecību. Transformētie audi tika atlasīti, izmantojot *nptII* (neomicīna fosfotransferāzes II gēns) selekcijas marķieri G418 antibiotikas rezistencei. Reģenerētie T0 stādi tika pārstādīti augsnē, un tajos tika testēta *nptII*, Cas9 un sgRNS klātbūtne un Cas9 ekspresija. Pozitīvie stādi tika kultivēti tālāk, un no tiem tika ievākti T1 graudi.

No visām transformētajām līnijām kopumā 117 tika konstatēta Cas9 ekspresija, t.i. līnijas bija transgēnas – saturēja “svešu” DNS. Ar visiem četriem izmantotajiem konstruktiem tika iegūti augi ar izmainītu gliadīna proteīnu profilu, tomēr tika konstatēts, ka bieži tikai neliela daļa no graudiem, kas tika iegūti no modificētā auga, saturēja sagaidāmās mutācijas. Tāpat tika novērots, ka viena un tā paša auga šūnās var būt redīgēti dažādi gēni, mutācijas dažādās šūnās var būt ieviestas dažādās genoma vietās, kas skaldās neatkarīgi viena no otras, vai arī Cas9 var būt saglabājusī aktivitāti gametās pēc mejozes. Līdz ar to arī no T0 auga iegūtie graudi var saturēt dažādas mutācijas, kā arī nākamajā paaudzē augi var būt himēri.

Nākamie soļi bezglutēna kviešu šķirnes izstrādei būtu atbrīvošanās no CRISPR/Cas9 konstrukta klātbūtnes visdaudzsoļākajās līnijās, no kurām tālāk pašapputes ceļā būtu jāiegūst līnijas ar homozigotiskām mutācijām, kuras tālāk būtu jāraksturo ar imunoloģiskām metodēm, kā arī jānovērtē ieviesto mutāciju ietekme uz maizes mīklas kvalitāti (Jouanin et al. 2019).

Zināms, ka gliadīnu gēnu kopiju skaits un sekvenca ietekmē celiakijas slimības izpausmes pakāpi. Tāpēc, lai izveidotu hipoimunogēnus kviešus ar pazeminātu gliadīnu saturu, kompleksajā kviešu genomā jāspēj precīzi novērtēt gliadīnu kodējošos gēnu kopiju skaitu. Arī iepriekš aprakstītajā Jouanin et al. (2019) pētījumā tika konstatēts, ka nelielo ar CRISPR/Cas9 konstruktiem ieviesto mutāciju precīzākai raksturošanai un skrīnēšanai būtu nepieciešams izmantot jutīgākas metodes. Mūsdienās populārākā gēnu kopiju skaita standarta kvantificēšanas metode ir reālā laika polimerāze ķēdes reakcija (RL-PĶR), taču tās precizitāte ir ierobežota, ja kopiju skaits ir augsts, vai genoma izmērs ir liels. Pēdējo gadu laikā ir attīstītas vairākas uz RL-PĶR principu balstītas digitālās PĶR (dPĶR) sistēmas, kas sola augstāku gēnu kvantificēšanas precizitāti un jutīgumu. Digitālās PĶR metodes pamatā ir kopējā reakcijas tilpuma sadalīšana daudzās paralēlās nano izmēra reakcijās, kas tiek panākts, kopējo reakcijas maisījumu sadalot sīkos pilienos vai uznesot uz speciāla čipa ar nano izmēra bedrītēm. Katrā nano izmēra reakcijā tiek amplificēta viena mērķa molekula, tādējādi iegūtos rezultātus analizējot ar atbilstošām statistiskām metodēm, ir iespējams noteikt absolūto molekulu skaitu sākuma paraugā. Jouanin et al. (2020a) pētījumā “ddPĶR optimizācija, lai noteiktu α -gliadīna gēnu kopiju skaita variācijas mutantos un genomiski redīgētos poliploīdos maizes kviešos” apraksta dPĶR protokola izstrādāšanu, optimizāciju un validēšanu α -gliadīnu gēnu kopiju relatīvā skaita novērtēšanai. Aprakstītajā pētījumā tika izmantota Bio-Rad izstrādātā uz pilieniem balstītā dPĶR platforma (*droplet digital PCR (ddPCR)*).

Metodes izstrāde

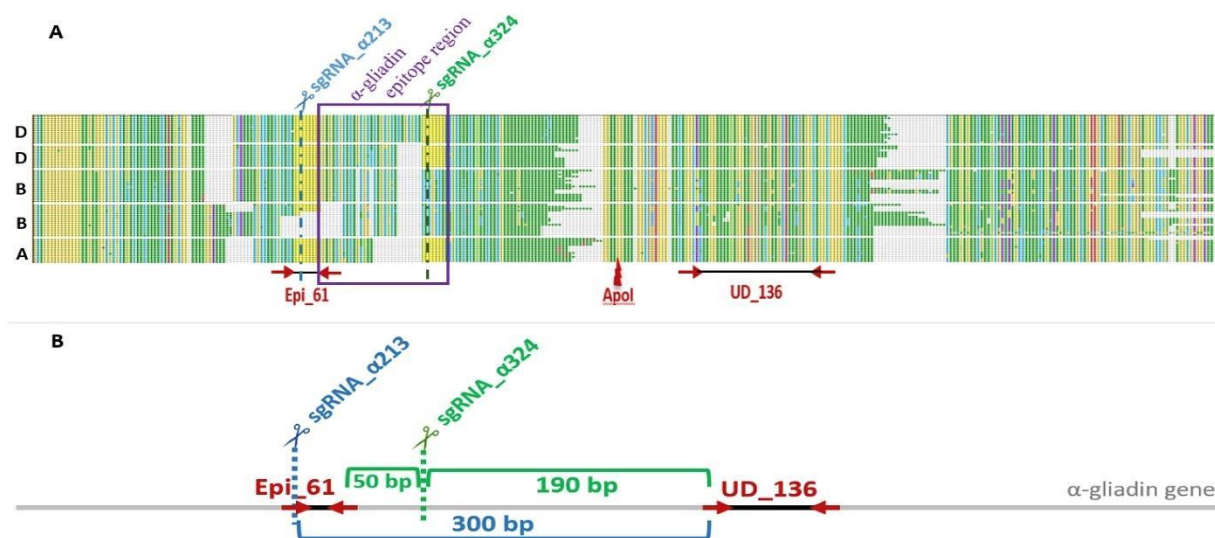
Metodes izstrādē tika izmantoti kvieši ar dažādu genoma izmēru (diploīdu, tetraploīdu, heksaploīdu), ar atšķirīgu α -gliadīna gēnu kopiju skaitu, kā arī ar dažādām α -gliadīna gēnu mutācijām, galvenokārt delēcijām:

- kviešu (*Triticum aestivum*) šķirnes ‘Chinese spring’, ‘Paragon’, ‘Felder’ ar dažādu α -gliadīna gēnu sastāvu genomā, starp kurām bija arī jau iepriekš aprakstītie ‘Felder’ kvieši ar CRISPR/Cas9 ieviestajām mutācijām α -gliadīna gēnos;

- trīs sintētiskas heksaploīdas kviešu līnijas ar AABBDD genomu, kas izveidotas krustojot angļu kviešus *Triticum turgidum* (AABB) ar savvaļas graudzāli *Aegilops tauschii* (DD), kā arī abas graudzāļu līnijas, no kurām tika izveidota heksaploīdā kviešu līnija.

Lai atdalītu genomā secīgi novietotās α -gliadīna gēnu kopijas un būtu iespējams panākt, ka katrā ddPQR nano reakcijā ir tikai viena gēna kopija, no augu lapām izdalītā DNS tika šķelta ar restriktāzi *ApoI*.

Tā kā viena lokusa ietvaros pastāv liela α -gliadīna gēnu sekvenču daudzveidība, praimeru tika izstrādāti tā, lai atbilstu lielākajai daļai zināmo α -gliadīna gēnu variantu, salīdzinot vairāk nekā 1200 sekvenču no *Triticeae* dzimtas augiem (Jouanin et al., 2019) (13. attēls).



13.attēls. α -gliadīnu gēnu sekvenču salīdzinājums, ddPQR praimeru relatīvais novietojums salīdzinājumā ar sgRNS mērķa sekvencēm un *ApoI* restriktijas pozīcija. (A) α -gliadīna gēna sekvenču (>1200) salīdzinājums (reprezentatīva daļa) pa homologajām hromosomām 6A, 6B un 6D. *ApoI* restriktijas pozīcija atrodas gēnu konservatīvajā reģionā. Praimeru Epi_61 lokalizēti CRISPR/Cas9 mērķa sekvencē un UD_136 ddPCR primeri tālāk no tās. (B) α -gliadīna gēnu, sgRNS_ α 213, sgRNS_ α 324, praimeru Epi_61 un UD_136 savstarpējais relatīvais novietojums un attālumi, kas ir minimālais sgRNS ieviestās delēcijas attālums, kas kavētu vismaz viena praimeru kompleksa piesaistīšanos, samazinot relatīvo amplikonu daudzumu salīdzinājumā ar savvaļas tipu. Praimeru, kuru saistības vieta ir tuvāk sgRNS pozīcijai, detektē dažāda izmēra insercijas un delēcijas. Praimeru, kuru saistības vieta ir tālāk no sgRNS pozīcijas, detektē lielas delēcijas. Starpība starp UD_136 un Epi_61 ģenerēto amplikonu skaita samazinājumu norāda uz mazākā izmēra mutāciju daudzumu modificētajā augā (pēc Jouanin et al., 2019; Jouanin et al., 2020).

Pētījumā tika izstrādāti tā saucamie “deģenerētie” praimeru, kam dažās pozīcijās iespējama bāžu variācija. Tomēr izstrādāt praimerus, kas vienlaikus amplificētu pilnīgi visus α -gliadīna gēnus, un kas ļautu novērtēt absolūto α -gliadīna gēnu (mutantu vai savvaļas tipa) skaitu, nebija iespējams. Tāpēc metode tika fokusēta uz relatīvā gēnu skaita noteikšanu,

paralēli salīdzinot mutantās un savvaļas līnijas. Atsevišķi tika izstrādāti praimeru šķirnes 'Fielder' CRISPR/Cas9 rediģēto līniju mazo inserciju/delēciju un lielo delēciju savstarpējai atšķiršanai un kvantificēšanai, pamatojoties uz to, ka mazā izmēra delēcijas un insercijas ietekmētu tikai sgRNS tuvāk novietotā praimeru komplekta saistīšanos un attiecīgi amplikonu produkciju, savukārt lielās delēcijas samazinātu arī tālāk novietotā praimeru komplekta amplikonu produkciju. Salīdzinot amplikonu skaitu samazināšanos starp abiem praimeru komplektiem, varētu noteikt mazo inserciju un delēciju relatīvo daudzumu.

Lai izvērtētu noteiktā kopiju skaita precizitāti, metodē par iekšējo kontroli tika izmantots gēns ar zināmu kopiju skaitu kviešu genomā. Kopumā metodes ietvaros tika izstrādāti trīs praimeru komplekti:

- praimeru, kas mērķēti uz α -gliadīna gēniem ar nelielām mērķētām mutācijām (Epi_61);
- praimeru, kas detektē un kvantificē lielākas α -gliadīna gēnu rajona delēcijas (UD_136);
- praimeru, kas mērķēti uz references gēnu *TaPFT1* (Ref_181).

Pētījuma autori jau iepriekš norādījuši, ka, ņemot vērā α -gliadīna gēnu lielo variabilitāti, PQR reakcijā tiku iegūti amplikoni ar dažādām sekvencēm (Jouanin et al., 2019), līdz ar to tradicionālā kvantificēšanas pieeja, izmantojot specifiskas zondes, nebūtu pielietojama amplikonu iekšējo sekvences atšķirību dēļ. Tāpēc metodes izstrādē tika izmantota EvaGreen fluorescentā iezīme, kas saistās pie dubultspiralizētas DNS un tādējādi ļauj detektēt visas PQR amplificētās sekvences.

Digitālā PQR metodikas izstrādāšanā liela uzmanība jāpievērš rezultātu apstrādei un interpretācijai. Šajā gadījumā dati tika analizēti ddPQR iekārtas ražotāja BioRad programmā Quantasoft Software™ ar rīku, kas paraugā nosaka absolūto kopiju skaitu (angļu val. *absolute gene copy number*), pamatā izmantojot noklusējuma uzstādījumus, atsevišķi norādot katra parauga ploīdiju. No tālākās analīzes tika izslēgti paraugi, kam bija ģenerēti mazāk nekā 10 000 pilienu. Rezultāti vizuāli tika izvērtēti 1D un 2D grafikos. Vizuāli katras nano izmēra reakcijas rezultātu reprezentē punkts, kura novietojums grafikā starp x un y asīm atkarīgs no tā fluorescences amplitūdas. Punkti ar līdzīgu fluorescences amplitūdu grafikā grupējas kopā vienā "mākonī" un dažādu punktu "mākoņu" novietojums atšķiras, atkarībā no tā vai un kādas mērķa molekulas ir pārstāvētas katrā nano izmēra reakcijā. Rezultātu grafikos tika novērtēts, cik labi izšķiramas pozitīvās un negatīvās reakcijas, kā arī reakcijas ar dažādiem amplikoniem, kas iegūti ar iepriekš minētajiem praimeru komplektiem. Pielietojot Puasona sadalījumu, tika aprēķināti dažādu amplikonu koncentrāciju absolūtie mērījumi, kas nepieciešami mērķa gēnu kopija skaita aprēķināšanai paraugā.

Metodes optimizācijas rezultāti

Digitālajā PQR liela nozīme ir pareizi izvēlētai sākotnējai DNS koncentrācijai reakcijā. Pētījumā aprēķināts, ka optimālais kopiju skaits ddPQR ir 1500 kopijas/ μ l jeb 30 000 kopijas/20 μ l reakcijā. Veicot optimizāciju ddPQR metodei α -gliadīna gēnu kvantificēšanai, tika

konstatēts, ka izmērītais kopiju skaits bija stabils robežās starp 10 un 30 ng DNS uz reakciju, tādēļ par darba koncentrāciju tika izvēlēti 10 ng ar restriktāzi apstrādātā DNS 20 µl reakcijā.

Pētījumā aprakstītās metodes optimizācijas procesā praimeru komplekti Epi_61, UD_136 un Ref_181 tika pārbaudīti gan individuālās, gan multipleksās reakcijās. Dupleksajās reakcijās, kurās tika iekļauts viens no praimeru komplektiem α -gliadīna gēnu amplificēšanai un references gēna praimeru komplekts, abu amplikonu signāli bija labi izšķirami. Tripleksajā reakcijā, kurā vienlaikus bija visi trīs praimeru komplekti, tika novērota signālu pārklāšanās. Tāpēc tālākajā metodes izstrādes gaitā tika izmantotas divas dupleksās reakcijas. Par optimālo praimeru hibridizācijas temperatūru, izmantojot temperatūras gradientu, tika noteikti 56 °C.

Metodes linearitāte tika novērtēta, izmantojot daudzveidīgu ģenētisko materiālu, kas saturēja dažāda veida hromosomu komplektus un genoma modifikācijas (pārsvarā delēcijas). Metodes jutība tika izvērtēta, analizējot augus, kas iegūti gan nejaušās, gan mērķētās mutāģenēzes ceļā.

Nosakot α -gliadīna gēnu skaitu sintētiskajās heksaploīdajās kviešu līnijās, tika konstatēts, ka tetraploīdās izejas līnijas *Triticum turgidum* (AABB) un diploīdas izejas līnijas *Aegilops tauschii* (DD) α -gliadīna gēnu skaita summa kopumā sakrīt ar kopiju skaitu sintētiskajā līnijā (AABBDD). DD genomā tika atrasti 14–17 gēna kopijas, AABB genomā 70–76 kopijas un heksaploīdajā genomā AABBDD 86–95 α -gliadīna gēnu kopijas. Kopumā metode uzrādīja labu precizitāti plašā α -gliadīna gēnu kopiju skaita amplitūdā (14-95), kas norāda uz metodes robustumu un linearitāti līdz pat gandrīz 100 gēna kopijām. Tomēr tika konstatēts, ka ar ddPQR noteikto α -gliadīna gēnu kopiju skaits dažādajiem, genomiem A, B un D var atšķirties no anotētā gēnu kopiju skaita, jo praimeru, kas ddPQR amplificē α -gliadīna gēnu fragmentus, ne visos gadījumos uzrāda pilnu sekvences sakrītību. Piemēram, tika konstatēts, ka B genomā praimeru slīktāk amplificē delēcijas rajonu, jo praimeru saistīšanās rajonā ir neliela mutācija, kas traucē praimerim precīzi saistīties ar tā mērķa sekvenci. Līdz ar to ar šo metodi novērtētais absolūtais α -gliadīna gēnu kopiju skaits būs zemāks par patieso, un metode līdz ar to ir piemērota relatīvā gēnu kopiju skaita novērtēšanai salīdzinājumā ar savvaļas tipu.

Delēciju detektēšanai un kvantificēšanai sākotnēji tika izmantotas kviešu 'Chinese Spring' līnijas ar lielu delēciju α -gliadīna gēnu reģionā vienā no homologu hromosomu pāriem. Ar ddPCR noteiktais α -gliadīna gēnu skaits heksaploīdajā genomā bez delēcijām sakrīt ar skaitu (apmēram 60), kas iepriekš bijis noteikts ar citām metodēm, savukārt līnijās ar delēcijām izmērītais α -gliadīna gēnu skaits bija mazāks (42–52). Tomēr tika konstatēts, ja delēcija neaptver visu gēna lokusu, tās var netikt detektētas, līdz ar to netiktu izmērīts patiesais delēciju līmenis.

Lai precīzāk izvērtētu ddPQR metodes pielietojamību dažāda izmēra delēciju klātbūtnes un skaita noteikšanai, pētījuma autori kviešu līnijās veica mutāģenēzi ar mērķi imitēt potenciālo hipoimunogēno kviešu izveides procesu. Tika pielietotas divas pieejas - nejaušā mutāģenēze ar gamma starojumu, kā arī uz α -gliadīna gēniem mērķētā mutāģenēze, izmantojot CRISPR/Cas9 sistēmu. Ar gamma stariem apstrādātajās līnijās, kurās ieviestās delēcijas var būt pat vairākus miljonus bāžu pāru garas, tika konstatēts par 16 - 30 kopijām

mazāk α -gliadīna gēnu salīdzinājumā ar references genoma 61 kopijām, tātad amplitūdu skaits korelē ar α -gliadīna gēnu kopiju skaitu, kas norāda, ka ddPQR metode sekmīgi spēj detektēt liela izmēra α -gliadīna gēnu delēcijas. Turklāt ar abiem delēciju detektēšanai paredzētajiem praimeru komplektiem Epi_61 un UD_136 iegūtie rezultāti sakrīt.

Pētījumā izmantotajās astoņās ar CRISPR/Cas9 modificētajās 'Fielder' līnijās α -gliadīna gēnos vidēji tika detektētas 17 maza un vidēja izmēra insercijas un delēcijas (10–50 bp), savukārt sešās no astoņām modificētajām 'Fielder' līnijām tika detektētas lielāka izmēra (>190 bp) delēcijas. Kopumā mazās insercijas un delēcijas tika konstatētas biežāk (20%) nekā lielās delēcijas (8,5%).

Secinājumi

Apskatītais pētījums ir viens no pirmajiem, kurā izvērtētā ddPQR piemērotība kopiju skaita izmaiņu kvantificēšanai lielās gēnu saimēs vai kopējā gēna kopiju skaita novērtēšanai poliploīdā organismā. Metodes linearitāte un jutība tika novērtēta, izmantojot dažāda veida ģenētisko materiālu. Ir izstrādātas divas dubleksas ddPQR sistēmas, kas spēj noteikt relatīvo α -gliadīna gēna kopiju skaitu, kā arī tajā esošās dažāda izmēra mutācijas. Izstrādātā ddPQR metode ir piemērota, lai veiktu augstas caurlaidspējas (*high throughput*) skrīningu augu līnijās, kuru genomos ir redīgēti dažādi gēni vai radniecīgu gēnu saimes, tajā skaitā, ja pielietota nejausā mutāģenēze.

Atsauces

- Anderson, O., Litts, J. & Greene, F. The α -gliadin gene family. I. Characterization of ten new wheat α -gliadin genomic clones, evidence for limited sequence conservation of flanking DNA, and Southern analysis of the gene family. *Theor Appl Genet.* 1997; 95:50–58 (1997).
- Gil-Humanes J, Pistón F, Tollefsen S, Sollid LM, Barro F. Effective shutdown in the expression of celiac disease-related wheat gliadin T-cell epitopes by RNA interference. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Sep 28;107(39):17023-8.
- Jouanin A, Schaart JG, Boyd LA, et al. Outlook for coeliac disease patients: towards bread wheat with hypoimmunogenic gluten by gene editing of α - and γ -gliadin gene families. *BMC Plant Biol.* 2019;19(1):333.
- Jouanin A, Tenorio-Berrio R, Schaart JG, et al. Optimisation of droplet digital PCR for determining copy number variation of α -gliadin genes in mutant and gene-edited polyploid bread wheat. *J Cereal Sci.* 2020a. 92: 102903.
- Jouanin A, Gilissen LJWJ, Schaart JG, et al. CRISPR/Cas9 Gene Editing of Gluten in Wheat to Reduce Gluten Content and Exposure-Reviewing Methods to Screen for Coeliac Safety. *Front Nutr.* 2020b;7:51.
- Sánchez-León S, Gil-Humanes J, Ozuna CV, et al. Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnol J.* 2018;16(4):902-910.

Singh P, Arora A, Strand TA, et al. Global Prevalence of Celiac Disease: Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2018;16(6):823-836.e2.

Zimin AV, Puiu D, Hall R, Kingan S, Clavijo BJ, Salzberg SL. The first near-complete assembly of the hexaploid bread wheat genome, *Triticum aestivum*. *Gigascience*. 2017;6(11):1-7.

5.3. DNS sekvenēšanas pielietojuma iespējas genoma rediģēšanas detekcijā

Ievads par sekvenēšanas tehnoloģijām

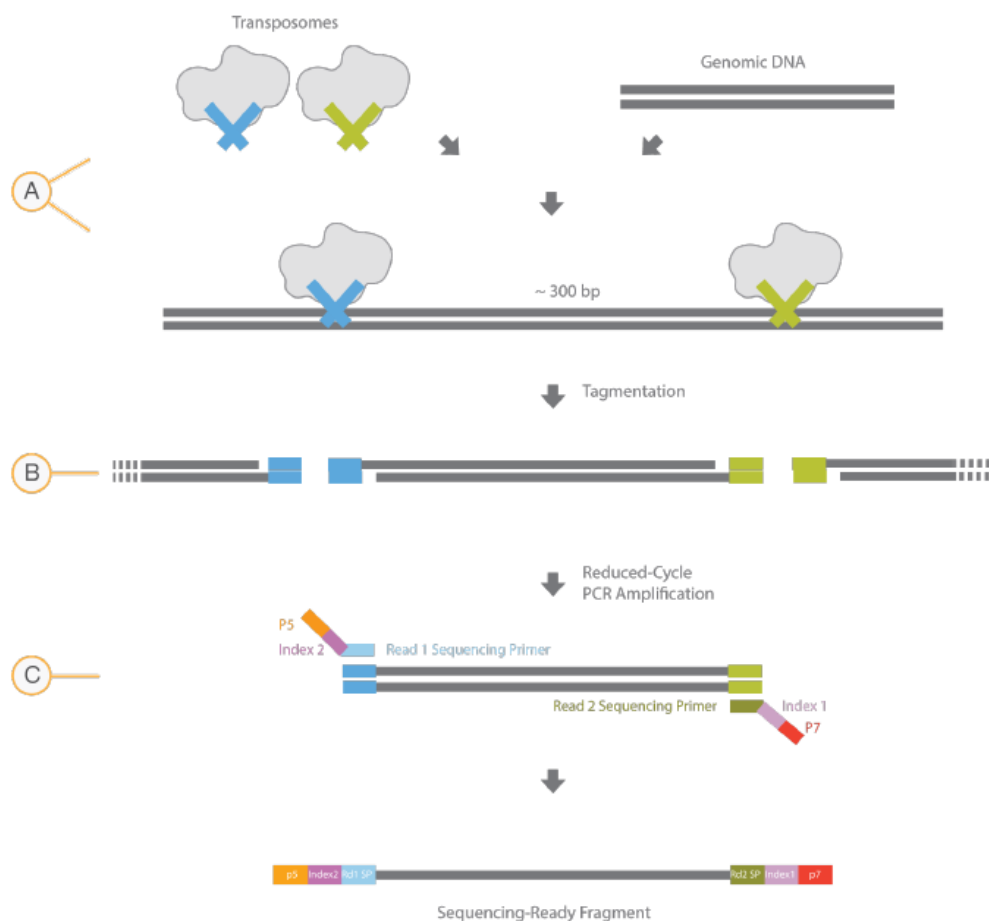
Kopš 20. gadsimta 70. gados tika aprakstītas pirmās DNS sekvenēšanas metodes (Sanger & Coulson, 1975; Maxam & Gilbert, 1977; Sanger et al., 1977), ir notikusi strauja tehnoloģiju attīstība un DNS un RNS nukleotīdu secību noteikšana (sekvenēšana) tiek plaši pielietota gan zinātniskos pētījumos, gan kriminālistikā, gan medicīnā, gan dažādos diagnostiskos izmeklējumos. Tā kā, veicot sekvenēšanu, var vistiešākajā veidā pārliicināties par noteikta DNS fragmenta saturu, šīs metodes ir iespējams izmantot arī ģenētiski modificētu un genoma rediģētu organismu pārbaudē. Ideālā gadījumā, iegūstot gan rediģētā lokusa, gan tam pieguļošo genoma rajonu sekvenences, būtu iespējams pārliicināties par noteiktas mutācijas esamību un atrašanās vietu genomā. Pieaugot ĢMO un genoma rediģētu organismu aprītei, arvien lielāka uzmanība tiek pievērsta šādu organismu genoma sekvenču analīzei. Šobrīd pasaulē ir pieejamas un plaši tiek izmantotas sekvenēšanas tehnoloģijas, kuras pēc to darbības principiem var iedalīt trīs grupās jeb "paudzēs", ņemot vērā to hronoloģisko attīstību:

- 1) Pirmās paaudzes tehnoloģija - didezoksinukleotīdu terminatoru sekvenēšana (bieži saukta tās izgudrotāja vārdā par Sangeru sekvenēšanu). Iepriekš iegūta PĶR produkta (maisījums, kas satur daudzas homologas DNS molekulas) sekvenca tiek noteikta, izmantojot to kā substrātu (angļu val. *template*) reakcijā, kurā tiek iegūti DNS fragmenti ar fluorescentu iezīmi katrā pozīcijā. Sekvenences nolasīšanai izmanto elektroforēzi. Tātad vienā sekvenēšanas reakcijā ir iesaistītas daudzas homologas DNS molekulas, bet no tām visām kopā tiek iegūts tikai viens sekvenences nolasījums. Šīs tehnoloģijas priekšrocība ir augsta precizitāte (maz kļūdainu sekvenču) un relatīvi liels nolasījuma garums (Van Dijk et al., 2014).
- 2) Otrās paaudzes tehnoloģijas - bieži sauktas arī par nākamās paaudzes sekvenēšanu (NGS, no angļu val. *next-generation sequencing*). Lielākoties sekvenē ar PĶR pavairotus DNS fragmentus, un vienlaicīgi tiek sekvenēts liels daudzums DNS molekulu, bet pretstatā Sangeru sekvenēšanai no katras individuālās molekulas tiek iegūts atsevišķs sekvenences nolasījums. Tādēļ reizēm NGS apraksta kā masīvi paralēlu sekvenēšanu. Galvenā priekšrocība ir augsta produktivitāte un caurlaidspēja, liels iegūstamais datu apjoms (Van Dijk et al., 2014). Mūsdienās šo tehnoloģiju paaudzi pārstāv tādas platformas kā Illumina, Ion Torrent, MGI.
- 3) Trešās paaudzes tehnoloģijas - vienlaicīgi tiek sekvenēts liels daudzums DNS molekulu, un no katras atsevišķās DNS molekulas var tikt iegūts viens vai vairāki nolasījumi. Arī šī pieeja nodrošina masīvi paralēlu sekvenēšanu, bet papildus tam sekvenēšana notiek

reālā laikā. Kā galveno priekšrocību var minēt ļoti lielu nolasījumu garumu (Bleidorn, 2016). Kā šīs tehnoloģijas pārstāvjus var minēt Oxford Nanopore un Pacific Biosciences.

Visas šīs tehnoloģijas ir mūsdienās pieejamas un piedāvā kaut ko noderīgu genoma rediģētu organismu analīzei, taču ir jāņem vērā dažādi ierobežojumi. Tā kā Sangera sekvenēšanas gadījumā no homologu DNS molekulu maisījuma tiek iegūts viens nolasījums, šīs tehnoloģijas pielietojums ir ierobežots gadījumos, kad testējamais produkts satur vienas un tās pašas vai radniecīgu sugu rediģētu un nerediģētu genoma materiālu vai arī rediģētas ir tikai dažas no vairākām gēna kopijām vienā genomā. Šādos gadījumos sekvenču nolasījums būtu neskaidrs vai arī nebūtu iespējams konstatēt mutācijas, kuru īpatsvars testējamā materiālā ir mazs. Vēl svarīgi, ka Sangera sekvenēšanā vienmēr tiek izmantoti mērķa sekvenču specifiski praimeru, tātad katrai genoma modifikācijai būtu nepieciešamas iepriekšējas zināšanas par tās struktūru un pārbaudīts praimeru komplekts mērķa sekvenču amplificēšanai ar PĶR. Šo ierobežojumu dēļ daudz lielāks praktiska pielietojuma potenciāls genomiski rediģēta materiāla detekcijā ir otrās un trešās paaudzes tehnoloģijām (kopā tiek sauktas arī par HTS, no angļu val. *high-throughput sequencing*), tāpēc šis apskats koncentrēsies uz tām.

Visām HTS platformām ir kopīga nepieciešamība noteiktā veidā sagatavot DNS sekvenēšanai. Lielākajai daļai sekvenēšanas platformu (it īpaši otrās paaudzes, kam ir ierobežots nolasījuma garums) vispirms nepieciešams genomisko DNS fragmentēt, līdz tiek iegūti dažus simtus bāzu pāru gari fragmenti. To ir iespējams paveikt enzimatiski vai fizikāli, piemēram, ar ultraskaņas palīdzību. Garo nolasījumu tehnoloģijām, kā Oxford Nanopore, nolasījuma garumu ierobežo pašas DNS molekulas garums, un nepārtraukti, gari nolasījumi ļauj iegūt precīzāku strukturālo informāciju par sekvenējamo genoma rajonu, tādēļ šādos gadījumos izejas DNS fragmentācija nav vēlama. Kad ir iegūti nepieciešamā garuma DNS fragmenti, to galos tiek pievienoti adapteri - sekvenēšanas platformai raksturīgās DNS sekvenču, kuras ir nepieciešamas, lai konkrētā sekvenēšanas platforma spētu atpazīt parauga DNS un uzsākt sekvenēšanas procesu. Reizē ar adapteriem ir iespējams pievienot "molekulāros svītrukodus" jeb indeksus - īsas, katram paraugam unikālas DNS sekvenču, kuras ļauj vienā sekvenēšanas reizē apvienot vairākus paraugus un pēc tam atšķirt katram paraugam piederīgos nolasījumus, balstoties uz paraugiem piešķirtajiem indeksiem. Atkarībā no izejmateriāla koncentrācijas un katrai iekārtai nepieciešamās DNS koncentrācijas var būt nepieciešams veikt sagatavoto DNS fragmentu pavairošanu ar PĶR, lai iegūtu pietiekamu DNS koncentrāciju sekvenēšanai. Šajā PĶR tiek izmantoti praimeru, kas ir komplementāri iepriekš pievienotajiem adapteriem, tādējādi PĶR amplificē visas sekvenču, kam ir pievienoti pareizie adapteri. Šādi sekvenēšanai sagatavotu DNS molekulu maisījumu sauc par bibliotēku, un parasti pirms sekvenēšanas tai veic kvalitātes kontroli ar elektroforēzi, reālā laika PĶR vai nomērot DNS koncentrāciju. Tālākais sekvenēšanas process ir specifisks katrai platformai, bet rezultātā tiek iegūts liels skaits nolasījumu, kas atbilst bibliotēkas sastāvā esošajām molekulām (14. attēls).

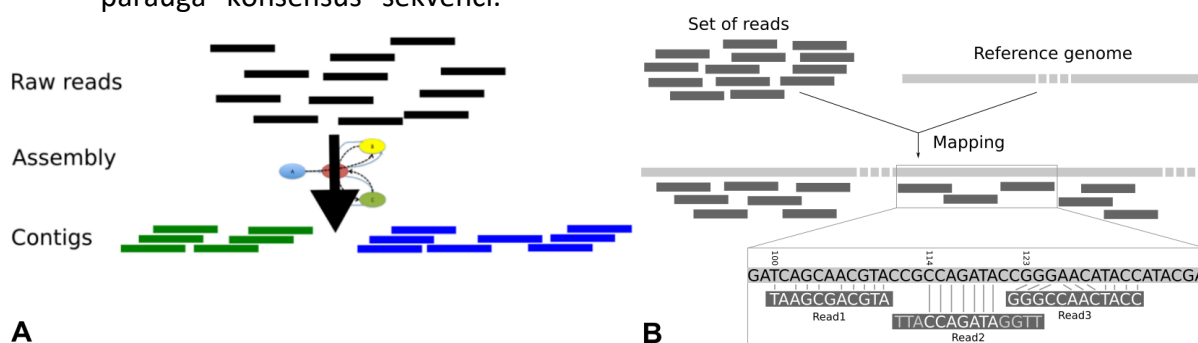


14. attēls. HTS bibliotēku sagatavošanas shēmas piemērs (Nextera XT reaģentu komplekts no Illumina). A – genomiskās DNS fragmentācija. B – adapteru pievienošana. C – indeksu pievienošana un bibliotēkas amplifikācija.

Ar HTS metodēm iegūstamais nolasījumu skaits ir ārkārtīgi liels (līdz pat vairākiem simtiem miljonu no viena parauga) un veiksmīgas sekvenēšanas gadījumā katrai genoma vietai atbilst vairāki nolasījumi (vidējo nolasījumu skaitu katram lokusam sauc par sekvenēšanas pārklājumu jeb dziļumu). EPNI vadlīnijās ĢMO sekvenču raksturošanai rekomendēts, ka ĢMO reģistrācijas pieteikuma iesniedzējam jānodrošina transgēna sekvenču informācija vismaz 40x pārklājumā, ja sekvenēšana veikta ar NGS tehnoloģiju (EFSA GMO Panel, 2018). Līdz ar to būtu pamatoti 40x pārklājumu pieņemt kā minimālo sliekšni arī genomiski rediģētu organismu analizē, ja tā balstīta uz NGS. Teorētiski šāds pārklājums varētu nodrošināt tikai 2.5% ĢMO detekcijas limitu (1 no 40 nolasījumiem satur ģenētisko modifikāciju), ja tiek analizēts paraugs, kas satur viena organisma DNS un šī organisma genomā nav citu rediģētā lokusa homologu. Tātad praksē pārklājuma sliekšnim būtu jābūt krietni augstākam, lai nodrošinātu nepieciešamo detekcijas limitu. Domājams, tas būtu arī atšķirīgs dažādām ĢMO līnijām, kas satur dažādu rediģētā gēna kopiju skaitu.

Šāda apjoma datu apstrādei ir nepieciešamas atbilstošas bioinformātiskās metodes un jaudīgi datorresursi. Mēģinot atklāt genoma modifikāciju klātbūtni sekvenču nolasījumos, ir iespējami divi galvenie bioinformātiskās datu analīzes principi:

- 1) Genoma assemblēšana (angļu val. *assembly de novo*) - pilna genoma rekonstruēšana bez references genoma, izmantojot tikai iegūtos sekvenču nolasījumus (15. A attēls). Salīdzinot savā starpā vairākus vienas sugas organismu genomus, ir iespējams identificēt atšķirības starp tiem (viena vai nedaudzu nukleotīdu polimorfismus, insercijas, delēcijas un lielāka mēroga strukturālas izmaiņas).
- 2) Otra plaši izplatīta bioinformātiskā pieeja ir nolasījumu kartēšana (angļu val. *read mapping*) uz references genoma (15. B attēls). Šajā gadījumā katram iegūtajam nolasījumam tiek piemeklēta vieta references genomā, no kuras tas ar vislielāko varbūtību ir cēlies. Šādi sakārtojot nolasījumus pret referenci, ir iespējams gan redzēt atšķirības starp references genomu un sekvenēto paraugu, gan noteikt sekvenētā parauga "konsensus" sekvenci.



15. attēls. A – genoma assemblēšana *de novo* (Wolf, 2015). B – nolasījumu kartēšana uz references genoma (Wolff et al., 2020).

Genoma *de novo* assemblēšanas rezultātā vispirms tiek iegūta nepilnīga visa genoma rekonstrukcija - tehnisku ierobežojumu dēļ sarežģītākos genoma rajonos (garas atkārtotas sekvenču, augsta GC īpatsvara sekvenču u.c.) var būt pārrāvumi un kļūdas, un šādas kvalitātes genoma rekonstrukciju sauc par *draft* genomu. Augstas kvalitātes references genoma iegūšanai nepieciešams izmantot papildu laboratorijas metodes (hromosomu kartēšana, problemātisko reģionu sekvenēšana ar citu tehnoloģiju) un manuāli veikt daļu no sekvenču analīzes, līdz ar to tas ir ļoti resursietilpīgi. Mikroorganismu genomi ir vienkāršāki un mazāki, tādēļ to assemblēšana un labas kvalitātes sasniegšana ir vieglāka. Augu un dzīvnieku genomu lielā izmēra un sarežģītības dēļ to ģenētikas pētījumos biežāk izmanto nolasījumu kartēšanas pieeju nevis genoma assemblēšanu *de novo*.

Dažādas sekvenēšanas pieejas ĢMO un genomiski rediģētu organismu analīzei

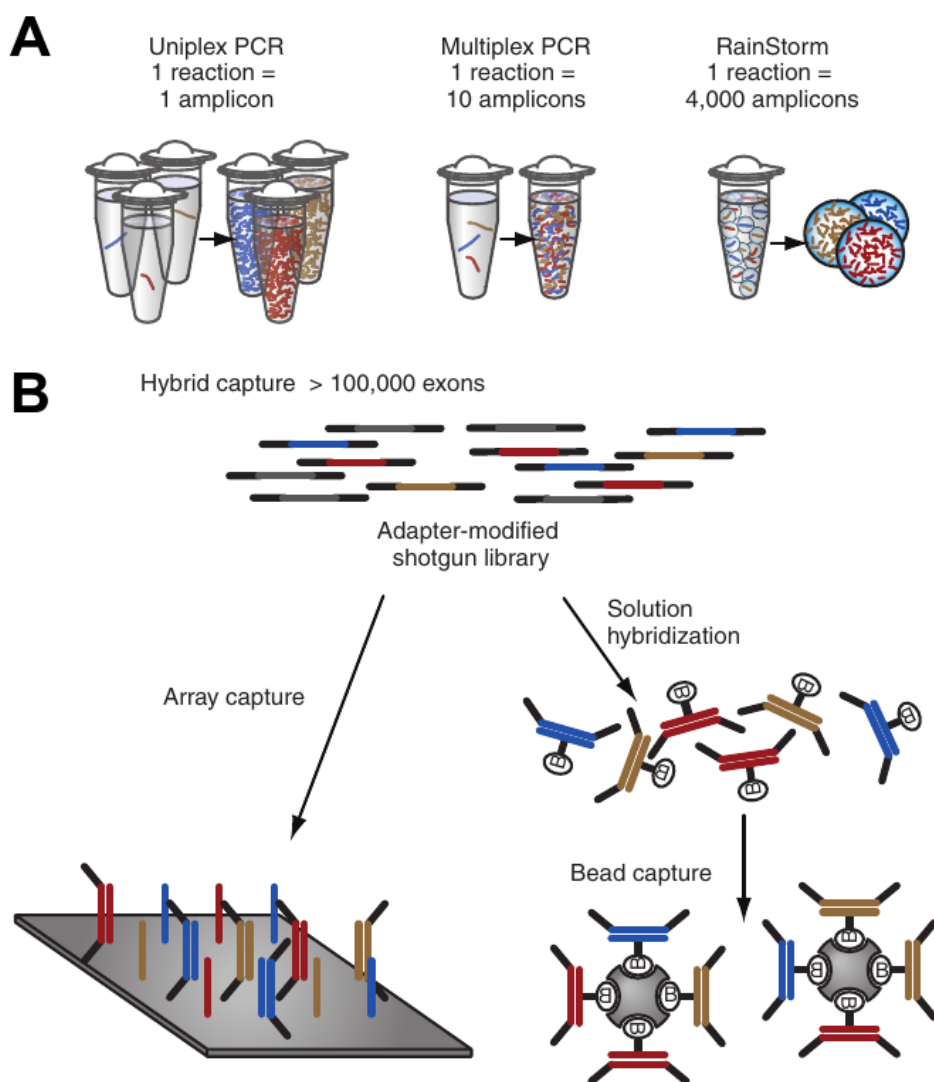
Visvienkāršākais veids, kā sagatavot paraugu sekvenēšanai, ir sekvenēt visu paraugā esošo DNS kopā - šādu pieeju sauc par *shotgun* sekvenēšanu. Ja paraugs satur tikai viena organisma genomisko DNS, to sauc par pilna genoma sekvenēšanu (WGS, no angļu val. *whole genome sequencing*). Ja paraugs satur dažādu organismu DNS, kā tas varētu būt kompleksa pārtikas vai dzīvnieku barības parauga gadījumā, to sauc par metagenoma sekvenēšanu, jo reizē tiek sekvenēts viss paraugā atrodamais genomiskais materiāls. Situācijā, kad nepieciešams raksturot nezināmu ģenētisku modifikāciju atsevišķā organismā, pilna genoma

sekvenēšana varētu ļaut atrast nezināmo mutāciju(-as) pie nosacījuma, ka ir pieejams izejas šķirnes vai celma references genoms salīdzināšanai. Vienas augu sugas ietvaros dažādu šķirņu genomi var atšķirties pat par 30% (Springer et al., 2009), tādēļ savs references genoms būtu vajadzīgs katrai ĢMO līnijai, kas veidota no citas izejas šķirnes. Kā jau iepriekš minēts, augu un dzīvnieku references genomu izveide ir ļoti darbietilpīga, tādēļ tikai retos gadījumos izpildītos nosacījums par references genoma pieejamību. Ja tiek testēts jaukts paraugs, kas satur materiālu no dažādiem organismiem, minimālais sekvenēšanas pārklājums būtu jānodrošina katra maisījuma sastāvā esošā organisma genomam un arī sekvenču analīze jāveic katram atsevišķi. Mūsdienās šādā veidā tiek sekvenētas un analizētas mikroorganismu sabiedrības (piemēram, pētījumos par cilvēka organisma mikrobiomu), jo, pateicoties baktēriju nelielajam genoma izmēram, saprātīga budžeta ietvaros (līdz 100-200 EUR par paraugu) ir iespējams gan sasniegt pietiekamu sekvenēšanas dziļumu, gan daļēji asemblēt atsevišķu baktēriju genomus un izdalīt tos no kopējā metagenoma. Tātad ar pašlaik plaši pieejamām metodēm būtu iespējams analizēt ĢM mikroorganismus saturošus mikroorganismu ražotus produktus (uztura bagātinātāji, barības vai pārtikas piedevas u.tml.), taču tik un tā vispirms būtu praktiski jāpārbauda šo metožu veiktspēja ĢMO kontekstā.

Pēdējo gadu laikā sekvenēšanas tehnoloģijas ir strauji attīstījušās un ir ievērojami samazinājušās sekvenēšanas izmaksas, rēķinot attiecībā pret iegūstamo datu apjomu. Holst-Jensen et al. (2016) prognozē, ka pilna genoma sekvenēšana varētu kļūt par finansiāli izdevīgu alternatīvu ĢMO analīzei, ja tehnoloģiju attīstība turpināsies tādā pašā tempā kā pēdējā desmitgadē. Tehnoloģiju progresam vajadzētu novest pie šādiem iznākumiem: (1) ievērojams sekvenēšanas izmaksu samazinājums; (2) sekvenēšanas ātruma un iegūstamā datu apjoma kāpums; (3) tiks izveidoti references genomi lielākam skaitam sugu; (4) kļūs pieejamas genoma sekvences dažādu sugu vairākām varietātēm un šķirnēm; (5) tiks pilnveidotas un automatizētas bioinformātiskās sekvenču analīzes programmas. Lai arī visi šie nosacījumi ir reāli sasniedzami un progress ir novērojams, tas prasa arī iesaistīto pušu mērķtiecīgu darbu, lai jaunās tehnoloģijas apgūtu un pielāgotu izmantošanai ĢMO kontroles nozarē. Kaut arī uz pilna genoma sekvenēšanu balstītas ĢMO detekcijas un analīzes izmaksas joprojām būs augstas, galvenā priekšrocība varētu būt tieši vienas metodes ietvaros nosakāmo ĢMO spektra paplašināšana (uzlabotas skrīninga iespējas).

Ņemot vērā pašreizējo ĢMO aprites regulējumu ES, oficiālo kontroli īstenojošām iestādēm būtu jābūt pieejamai informācijai par katras autorizētās ĢMO līnijas modificētajām DNS sekvencēm. Parasti modificēta ir tikai neliela daļa no organisma genoma. Piemēram, 2017. gadā Eiropas tirgū izplatīto ģenētiski modificēto petūniju genoms ir 1.4 Gbp liels ($1.4 \cdot 10^9$ DNS bāzu pāru), taču transgēnais fragments ir 4000 bp liels un sastāda tikai 0.0003% no petūniju genoma (Boutigny et al., 2020). Ar jaunajām genoma rediģēšanas tehnoloģijām ir iespējams veikt pat tikai atsevišķu nukleotīdu nomaiņu, līdz ar to rediģētā rajona attiecība pret visu genomu kļūst vēl mazāka un lielākā daļa no sekvenēšanas datu iznākuma un izmaksām (lielu un poliploīdu augu genomu gadījumā tie varētu būt pat vairāki tūkstoši EUR) netiek izmantota lietderīgi. Tā kā autorizētu ĢMO detekcijas gadījumā ir zināms, kādas sekvences jāmeklē, daudz efektīvāk būtu resursus veltīt tikai interesējošā genoma rajona sekvenēšanai. To var panākt, veicot mērķētu sekvenēšanu jeb bagātinot sekvenēšanas bibliotēku ar DNS fragmentiem, kas satur tieši mērķa sekvences.

Eksistē dažādas mērķa sekvenču bagātināšanas metodes, kuras var tikt lietotas kopā ar NGS. Visplašāk šādas metodes tiek izmantotas cilvēka ģenētikas pētījumos un diagnostikā, kur ir līdzīga problēma - cilvēka genoms ir liels, taču iedzimtās slimības vai noteiktas fenotipiskās pazīmes nosaka tikai daļa no genoma, un mērķis ir nosekvenēt tikai šo daļu, lai taupītu resursus, tādēļ daudz pieredzes var smelties no cilvēka ģenētikas nozares. Divas galvenās bagātināšanas metodes ir *multiplex* PQR un hibridizācijas zondes (16. attēls). Ar *multiplex* PQR metodi daudzi interesējošie genoma fragmenti tiek amplificēti pirms sekvenēšanas vienā vai vairākās atsevišķās reakcijās. Kopā vienā sekvenēšanas bibliotēkā šādi iespējams izolēt līdz pat 24000 dažādu mērķa fragmentu (piemērs no AmpliSeq for Illumina reaģentu komplekta specifikācijas). Hibridizācijas zondes saistās ar mērķa sekvenci, balstoties uz DNS bāzu komplementaritāti, un ar zondēm saistītos DNS fragmentus var atdalīt no kopējā DNS fragmentu maisījuma, pateicoties ķīmiskai modifikācijai zondes molekulā. Ar *multiplex* PQR tipiski tiek sekvenēti īsāki fragmenti un ir ierobežots maksimālais mērķu skaits vienā reakcijā, bet, pateicoties PQR, ir ļoti augsts specifiskums un pietiek ar zemāku izejas DNS koncentrāciju. Ar hibridizācijas zondēm iespējams izolēt daudz vairāk un garākus mērķa reģionus un tās ir mazāk jutīgas pret izmaiņām mērķa sekvencēs (mutācijas praimeru sekvencēs var būtiski traucēt veiksmīgu PQR norisi), taču līdz ar to specifiskums ir zemāks nekā *multiplex* PQR. Abos gadījumos vienā vai vairākos praimeru/hibridizācijas zonu paneļos būtu iespējams apvienot visas interesējošās ģenētiskās modifikācijas un vienā sekvenēšanas reizē veikt skrīningu uz visiem attiecīgajiem ĢM elementiem. Jāpiezīmē, ka šādā veidā tiktu iegūti tikai kvalitatīvi nevis kvantitatīvi rezultāti (Debode et al., 2019), un atrasto ĢMO līniju kvantificēšanai pēc tam būtu nepieciešamas citas metodes, kā reālā laika PQR vai digitālā PQR.



16. attēls. A - mērķa sekvenču bagātināšana ar *multiplex* PĶR. B - mērķa sekvenču bagātināšana ar hibridizācijas zondēm. (Mamanova et al., 2010)

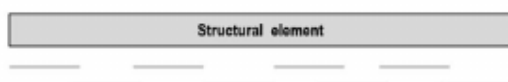
ĢMO sekvenēšanas pētījumu apskats

Zinātniskajā literatūrā jau ir atrodami vairāki pētījumi, kuros apskatītas uz masīvi paralēlu DNS sekvenēšanu balstītas ĢMO analīzes iespējas. Tiesa gan, visās publikācijās par eksperimentu objektiem ir kalpojuši ar tradicionālajām ģenētiskās modifikācijas metodēm iegūti transgēni organismi, taču daļa no šādi iegūtās pieredzes un informācijas būtu attiecināma arī uz genomiski rediģētu organismu analīzi. Tālāk tiks aplūkoti divi pētījumi, kur ĢMO detekcijai izmantotas abas atšķirīgās sekvenēšanas pieejas: pilna genoma sekvenēšana un mērķa sekvenču bagātināšana.

Debode et al. 2019. gada pētījumā "Transgēno gadījumu detekcija un identifikācija ar nākamās paaudzes sekvenēšanu kombinācijā ar mērķa skvenču bagātināšanu" (*Detection and identification of transgenic events by next generation sequencing combined with enrichment technologies*) tika pārbaudīta mērķa bagātināšana ar hibridizācijas zondēm. Kā paraugi tika

izmantoti dažādu transgēnu augu references materiāli (gan atsevišķi, gan maisījumā). Hibridizācijas zonu panelis tika izveidots, ņemot par pamatu ģenētiskajos konstruktos bieži izmantotus 39 elementus: 10 promoterus, 23 gēnus un 6 terminatorus (tai skaitā arī tādus, ko Latvijā izmanto ĢMO noteikšanai ar PĶR) (17. attēls). Ņemot vērā iekļautos ģenētiskos elementus, ar šo paneli vienā analizē teorētiski jābūt detektējamām 325 no 328 ĢMO līnijām, kas uz publicēšanas brīdi bija iekļautas GMOseek matricā (Block et al., 2013). Iegūto sekvenču nolasījumu analīze bija sadalīta divās daļās: detekcija un ģenētisko konstruktu raksturošana.

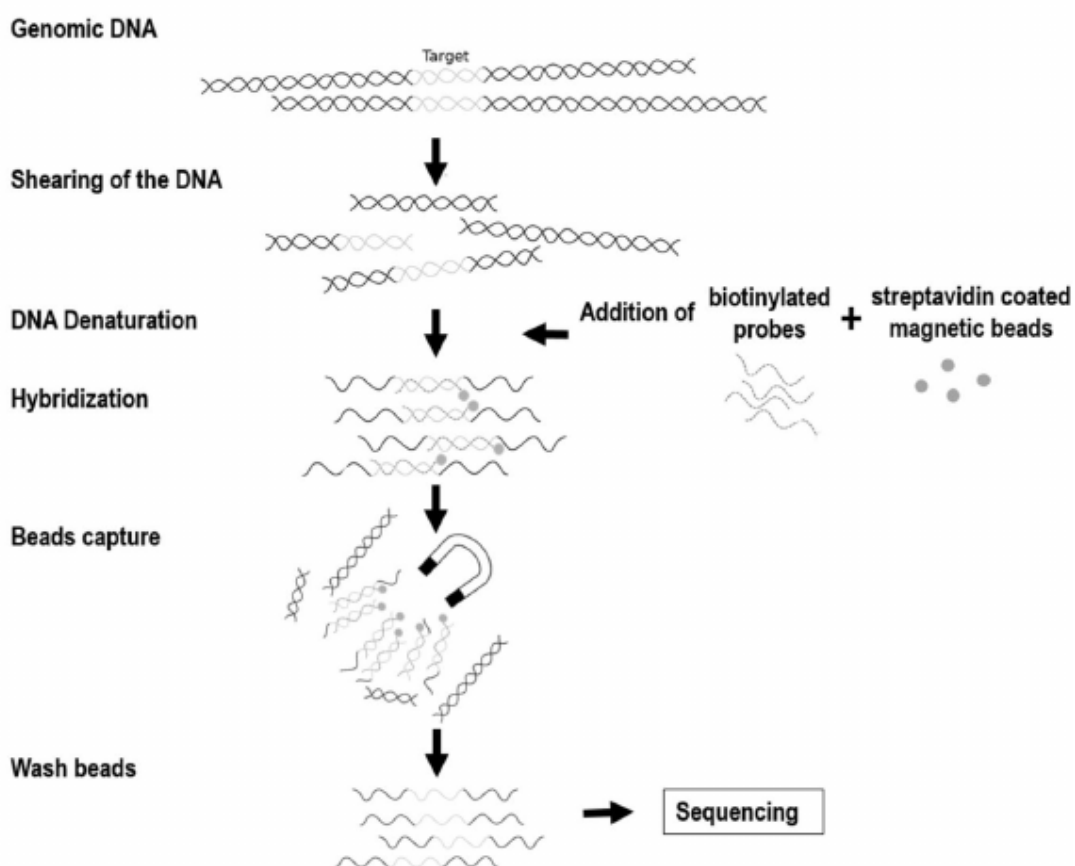
1. Design of capture probes for each targeted sequence



2. Creation of a library of biotinylated capture probes



3. Enrichment



17. attēls. Sekvenēšanas eksperimenta dizains transgēno ĢMO noteikšanai (Debode et al., 2019).

Detekcijai tika izmantota nolasījumu kartēšana pret references datu bāzi - visiem 39 ģenētiskajiem elementiem, kas ņemti par pamatu zonu izveidei. Tā kā sekvenēšanas tehnoloģiju īpatnību rezultātā ir iespējami arī kļūdaini nolasījumi, tika noteikts mērķa sekvenai atbilstošo nolasījumu skaita sliekšnis, virs kura ieskaitīt pozitīvu rezultātu. Šādā veidā pētījuma autoriem izdevās detektēt transgēnā materiāla klātbūtni pat paraugos, kur ĢMO saturs bija tikai 0.1%. Tika aprēķināts, ka ar pieņemto sliekšņa vērtību varbūtība pareizi atšķirt pozitīvu paraugu no negatīva ir lielāka par 99%. Problēmas ar specifiskumu radās vienīgi gadījumos, kad references datu bāzē bija vairākas ļoti līdzīgas sekvenču (piemēram, *cry* gēna dažādi varianti) - šajos gadījumos daļa nolasījumu uzrādījās kā atbilstoši dažādiem *cry* gēna variantiem, taču vislielākais nolasījumu skaits vienmēr atbilda tam variantam, kurš patiešām bija konkrētā ĢMO sastāvā. Analīzes ar jauno metodi tika veiktas arī ģenētiski nemodificētam materiālam no tādu pašu sugu augiem, un netika iegūti viltus pozitīvi rezultāti. Izņēmums bija kukurūza, jo daži eksperimentā iekļautie ģenētiskie elementi ir cēlušies no kukurūzas genoma, līdz ar to šīs DNS sekvenču ir atrodamas arī nemodificētajās kukurūzas šķirnēs. Tas norāda, ka arī sekvenēšanas rezultātu analīzē būtiskas ir zināšanas par meklēto ģenētisko elementu sastopamību dabiskos organismos, līdzīgi kā veicot transgēno ĢMO skrīningu ar PĶR metodēm.

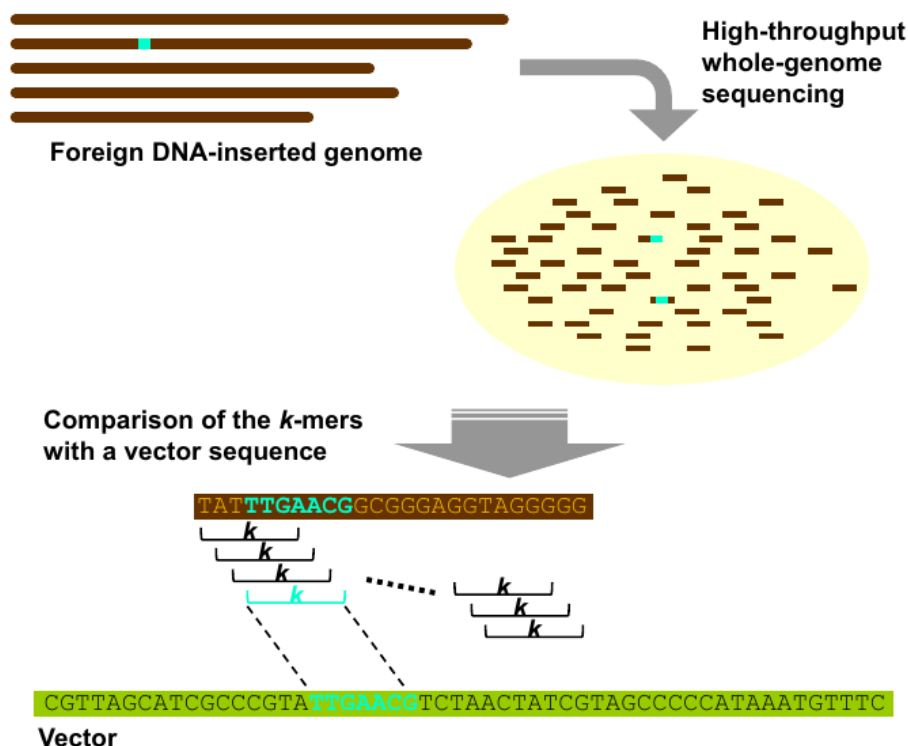
ĢMO raksturošanai šajā pētījumā tika izmantota iegūto nolasījumu assemblēšana *de novo*. Jauniegūtās sekvenču tika salīdzinātas ar references sekvenču, lai noteiktu, cik precīzi šādā veidā ir iespējams rekonstruēt ĢMO konstrukta sekvenču. Lielākajā daļā gadījumu tas arī izdevās, un pat jauktā paraugā, kas sastāvēja no divām ĢMO līnijām vienādās proporcijās, varēja iegūt pareizas sekvenču. Pārrāvumi assemblētajās sekvenču bija novērojami, ja ĢMO konstrukta vidū bija kāds hibridizācijas zonu panelī neiekļauts ģenētiskais elements. Šādā veidā papildus transgēno konstrukta sekvenču izdevās iegūt arī transgēna insercijai blakus esošās auga genoma sekvenču, tādējādi iegūstot papildus informāciju par testējamo materiālu. Ar nolasījumu kartēšanas pieeju tas nebūtu izdarāms, ja vien references datu bāzē netiktu iekļautas arī visu iespējamo transgēno elementu un auga genoma savienojuma vietu sekvenču. Var secināt, ka šāda pieeja īpaši noderētu neautorizētu ĢMO analīzē, kad testējamajam materiālam satur kādu iepriekš nezināmu ģenētisko modifikāciju. Tomēr jāņem vērā, ka assemblēšanas algoritmi visos gadījumos nevar perfekti rekonstruēt nezināmo genoma sekvenču, tādēļ vienmēr būtu nepieciešama arī manuāla rezultātu pārbaude, pirms tiem uzticēties.

Kopumā var secināt, ka mērķa sekvenču bagātināšana pirms sekvenēšanas var būt noderīga. Pēc līdzīga principa būtu iespējams izveidot zondes jebkurai ģenētiskajai modifikācijai (arī ar jaunajām genoma rediģēšanas metodēm iegūtām), taču īsāku modifikāciju gadījumos samazinātos metodes jutīgums un specifiskums, jo hibridizācijas zondes var veiksmīgi saistīties ar DNS pat tad, ja šajā reģionā ir vairākas nukleotīdu neatbilstības. Iespējams, īsu modifikāciju noteikšanai piemērotāka būtu bagātināšana ar PĶR.

Itoh et al. 2020. gadā publicētajā pētījumā "Svešās DNS noteikšana ar augstas caurlaidspējas sekvenēšanu genomiski rediģētu lauksaimniecības produktu kontrolei" (*Foreign DNA detection by high-throughput sequencing to regulate genome-edited agricultural products*) tika izmantota testējamo objektu pilna genoma sekvenēšana.

Eksperiments pamatojās uz to, ka genoma rediģēšanas procesā tiek izmantotas dažādas tehniskas sekvences (piemēram, plazmīdu vektori, kas kodē rediģēšanai nepieciešamos enzīmus), kuras pilnībā vai daļēji var būt saglabājušās rediģētajā organismā pēc procesa pabeigšanas (Xu et al., 2019). Šajā pētījumā autori analizēja dažādas rīsu līnijas un centās to genomos konstatēt ColE1 plazmīdas sekvenču klātbūtni. Šī plazmīda tika izvēlēta kā genoma rediģēšanā izmantojama vektora piemērs, kura paliekas varētu būt nejauši saglabājušās auga genomā pēc tā rediģēšanas. Tika izmantoti gan reāli nasekvenēti rīsu līniju genomi, gan datorā simulēti.

Kā jau iepriekš minēts, augu genomu rekonstruēšana var būt sarežģīta un laiktīlīga, tādēļ šajā pētījumā plazmīdas sekvenču meklēšanai rīsu genoma sekvenču nolasījumos tika izvēlēta cita pieeja – *k*-mēru detekcija. Par *k*-mēriem sauc *k* nukleotīdus garus nukleotīdu posmus (*k* ir naturāls skaitlis), un katram *k*-mēram teorētiski ir iespējamas 4^k dažādas nukleotīdu sekvences. Jo lielāka ir *k* vērtība (garāks fragments), jo lielāka ir iespēja, ka šis fragments visā genomā būs unikāls. Piemēram, statistiski ir aprēķināts, ka ir iespējams cilvēka genomā atrast unikālu DNS sekveni 20 nukleotīdu garumā ($k=20$). Rīsu genoma nolasījumi tika sadalīti dažāda garuma *k*-mēros un šie *k*-mēri (tiem identiskas tāda paša garuma sekvences) tika meklētas ColE1 plazmīdas sekvencē (18. attēls). Šādā veidā auga genomu nav nepieciešams asemblēt, un vienīgā nepieciešamā references sekvenca ir vektora sekvenca, kuras klātbūtne paraugā tiek pārbaudīta.



18. attēls. Sekvenču līdzības analīze pēc *k*-mēru principa (Itoh et al., 2020).

Pētījuma rezultātā tika konstatēts, ka pie $\geq 30x$ sekvenēšanas pārklājuma var atrast 20 nukleotīdus garu ($k=20$) plazmīdas DNS fragmentu ar viltus negatīva rezultāta iespējamību $<0,1\%$, un vidēji katrā reizē sagaidāms atrast <1 viltus pozitīvu nolasījumu. Vēl autori konstatēja, ka šādos gadījumos, kad tiek meklētas vektoru sekvences, par būtisku problēmu

var kļūt reaģentu kontaminācija. Tā kā daudzi molekulārajā bioloģijā, tai skaitā sekvenēšanā, izmantotie enzīmi tiek ražoti ar rekombinantu mikroorganismu palīdzību, dažādu plazmīdu vai mikroorganismu sekvenču nepietiekamas attīrīšanas rezultātā varētu parādīties arī reaģentos un radīt viltus pozitīvu signālu. Autori arī ieteica pozitīvu rezultātu apstiprināšanai izmantot vēl kādu citu metodi, piemēram, *Southern blot* (DNS-DNS hibridizācija). Domājams, kā alternatīva metode tikpat labi varētu kalpot arī pilna genoma assemblēšana vai nolasījumu kartēšana pret vektora genomu, izmantojot jau iegūtās sekvenču nevis veicot vēl vienu laboratorijas izmeklējumu, kā tas būtu *Southern blot* gadījumā. Vērtējot šo pētījumu, gan jāņem vērā, ka ne visos gadījumos redīgētajā genomā tiešām būs palikušas šādas tehniskās sekvenču (Endo et al., 2015; Xu et al., 2019), līdz ar to šis pētījums vairāk demonstrē konceptu nevis rutīnas izmeklējumos pielietojamu metodi. Iespējams, šāda pieeja varētu būt noderīga kādos speciālos gadījumos.

Praktiski apsvērumi uz masīvi paralēlu sekvenēšanu balstītai ĢMO testēšanai Latvijā

Visreālākais scenārijs uz sekvenēšanu balstītai ĢMO testēšanai šobrīd šķiet mērķa sekvenču bagātināšana un sekvenēšana ar kādu no otrās paaudzes sekvenēšanas tehnoloģijām. Mērķa sekvenču būtu jāklūst zināmām, veicot ĢMO autorizācijas procesu Eiropas Savienībā, tātad būtu pieejama informācija hibridizācijas zonu vai praimeru izveidei, un otrās paaudzes sekvenēšana nu jau ir viegli pieejama daudzās laboratorijās Latvijā. Latvijas Nacionālā referenču laboratorijas (BIOR) rīcībā ir pietiekams tehniskais nodrošinājums, lai veiktu šāda veida testēšanu:

- 1) Pamata laboratorijas aprīkojums DNS izdalīšanai un sekvenēšanas bibliotēku sagatavošanai;
- 2) Illumina MiSeq sekvenēšanas iekārta, ar kuras jaudu pietiek mērķētai sekvenēšanai (tāda pati iekārta šim mērķim izmantota iepriekš minētajā Debode et al., (2019) pētījumā). Ja rastos nepieciešamība sekvenēt pilnus genomus, sekvenēšanas jauda būtu jāpalielina;
- 3) Lieljaudas skaitļošanas resursi sekvenču analīzei – spēkā esošs līgums par Rīgas Tehniskās universitātes HPC centra izmantošanu (pašlaik jaudīgākais superdators Latvijā).

Tā kā šāda izmeklējuma izmaksu lielāko daļu sastādītu ar sekvenēšanu saistīto reaģentu iegāde, ir iespējams aptuveni prognozēt, ar kādām izmaksām būtu jārēķinās, ņemot vērā ražotāju norādītās reaģentu cenas:

- DNS izdalīšanas komplekts NucleoSpin Food (Macherey-Nagel) – 3 EUR/paraugs
- Sekvenēšanas bibliotēku sagatavošanas komplekts Nextera DNA Flex ar indeksiem (Illumina) – 44 EUR/paraugs
- Hibridizācijas oligonukleotīdu panelis Lockdown Probe Pool (IDT) (458 zondes*) – 14-114 EUR/paraugs – izmaksas atkarīgas no tā, cik daudz paraugi tiek apvienoti vienā sekvenēšanas reizē

- Hibridizācijas reaģenti xGen Hybridization and Wash Kit (IDT) – 2-17 EUR/paraugs – izmaksas atkarīgas no tā, cik daudz paraugi tiek apvienoti vienā sekvenēšanas reizē
- Sekvenēšanas reaģentu komplekts MiSeq Reagent Micro Kit v2 (300-cycles) (Illumina) – 216 EUR/paraugs

*zondu skaits hibridizācijas panelī (un līdz ar to paneļa kopējā cena) ir atkarīgs no tā, cik lielu skaitu un cik garas ģenētiskās modifikācijas panelī iekļauj. Palielinoties autorizēto ĢMO līniju skaitam, kas izmanto unikālus ģenētiskos elementus, attiecīgi būtu jāpievieno jaunas zondes. Šajā piemērā zonu skaits ir tāds pats kā tika izmantots Debode et al. (2019) pētījumā.

Ņemot vērā, ka ar šāda veida sekvenēšanu nav iespējams kvantificēt atrasto ĢMO saturu testējamā materiālā, sekvenēšana varētu kalpot kā skrīninga metode (atsevišķo ģenētisko modifikāciju klātbūtnes konstatēšana, izmantojot nolasījumu kartēšanu pret references sekvencēm) un kā papildus rīks nezināmu ĢMO raksturošanai (*de novo* asemblēšana un iegūto sekvenču salīdzināšana ar zināmajām). Pozitīvo paraugu kvantifikācijai joprojām būtu jāizmanto reālā laika PĶR vai digitālā PĶR, līdz ar to analīze un izmaksu kalkulācija veidotos no vairākām daļām. Salīdzinot uz sekvenēšanu un reālā laika PĶR balstītu skrīningu, sekvenēšanas priekšrocība ir iespēja vienā analīzē noteikt daudz lielāku skaitu ģenētisko modifikāciju, līdz ar to ir sagaidāms, ka sekvenēšana kļūs ekonomiski izdevīga, palielinoties autorizēto ĢMO līniju skaitam, kuras ir jāiekļauj skrīningā.

Secinājumi

Ar sekvenēšanas palīdzību ir iespējams atklāt dažāda veida izmaiņas dažādu organismu genomos. Taču gadījumos, kad ĢMO nesatur nekādu ārējas izcelsmes ģenētisko materiālu (kā tas var būt jauno genoma rediģēšanas metožu pielietojuma rezultātā), līdzīgas vai identiskas sekvences konstatēšana testējamā materiālā vēl nesniedz informāciju par to, vai konkrētā sekvenču radusies dabiski vai mākslīgi. Līdz ar to sekvenēšana var palīdzēt risināt dažādus ar ĢMO kontroli un testēšanu saistītus tehniskus izaicinājumus, bet ne šī brīža sarežģītāko problēmu – nekļūdīgi atšķirt genomiski rediģētus organismus no dabiskiem.

Kaut arī vairākos pētījumos ir parādīts masīvi paralēlo sekvenēšanas tehnoloģiju veiksmīgs pielietojums ĢMO analīzē, pirms plašas pielietošanas oficiālajā kontrolē vēl ir nepieciešami praktiski pētījumi, kas palīdzētu standartizēt gan sekvenēšanas, gan bioinformātikas metodes un noteikt piemērojamos kvalitātes kritērijus.

Atsauces

- Bleidorn, C. (2016). Third generation sequencing: technology and its potential impact on evolutionary biodiversity research. *Systematics and biodiversity*, 14(1), 1-8.
- Block, A., Debode, F., Grohmann, L., Hulin, J., Taverniers, I., Kluga, L., ... & Heinze, P. (2013). The GMOseek matrix: a decision support tool for optimizing the detection of genetically modified plants. *BMC bioinformatics*, 14(1), 256.

- Boutigny, A. L., Fioriti, F., & Rolland, M. (2020). Targeted MinION sequencing of transgenes. *Scientific Reports*, 10(1), 1-7.
- Debode, F., Hulin, J., Charlotiaux, B., Coppieters, W., Hanikenne, M., Karim, L., & Berben, G. (2019). Detection and identification of transgenic events by next generation sequencing combined with enrichment technologies. *Scientific reports*, 9(1), 1-9.
- EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (EFSA GMO Panel), Casacuberta, J., Nogu e, F., Naegeli, H., Birch, A. N., De Schrijver, A., ... & Nielsen, E. E. (2018). Technical Note on the quality of DNA sequencing for the molecular characterisation of genetically modified plants. *EFSA Journal*, 16(7), e05345.
- Endo, M., Kumagai, M., Motoyama, R., Sasaki-Yamagata, H., Mori-Hosokawa, S., Hamada, M., ... & Toki, S. (2015). Whole-genome analysis of herbicide-tolerant mutant rice generated by *Agrobacterium*-mediated gene targeting. *Plant and Cell Physiology*, 56(1), 116-125.
- Holst-Jensen, A., Spilsberg, B., Arulandhu, A. J., Kok, E., Shi, J., & Zel, J. (2016). Application of whole genome shotgun sequencing for detection and characterization of genetically modified organisms and derived products. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 408(17), 4595-4614.
- Maxam, A. M., & Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(2), 560-564.
- Sanger, F., & Coulson, A. R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of molecular biology*, 94(3), 441-448.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*, 74(12), 5463-5467.
- Springer, N. M., Ying, K., Fu, Y., Ji, T., Yeh, C.-T., Jia, Y., . . . Schnable, P. S. (2009). Maize inbreds exhibit high levels of copy number variation (CNV) and presence/absence variation (PAV) in genome content. *PLoS Genet*, 5(11).
- Van Dijk, E. L., Auger, H., Jaszczyszyn, Y., & Thermes, C. (2014). Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends in genetics*, 30(9), 418-426.
- Wolf, B. (2015) De novo genome assembly versus mapping to a reference genome. <http://beat.wolf.home.hefr.ch/documents/prague.pdf>; skatits 2020.11.20.
- Wolff, J., Batut, B., Rasche, H. (2020) Mapping (Galaxy Training Materials). </training-material/topics/sequence-analysis/tutorials/mapping/tutorial.html>; skatits 2020.11.20.
- Xu, J., Hua, K., & Lang, Z. (2019). Genome editing for horticultural crop improvement. *Horticulture research*, 6(1), 1-16.

6. Ar jaunām ģenētisko modifikāciju metodēm iegūto organismu zinātniskā riska analīze

6.1. Ievads

Bioloģiskās daudzveidības konvencijas 8. nodaļa nosaka pusēm pienākumu izveidot un uzturēt pasākumus, lai regulētu, vadītu vai kontrolētu riskus, kas saistīti ar dzīvu modificēto organismu (LMO) izlaišanu¹⁶. Balstoties uz to, Kartagenas Biodrošības protokola 1. nodaļa nosaka sniegt ieguldījumu atbilstoša līmeņa aizsardzības nodrošināšanā mūsdienu biotehnoloģijas rezultātā radušos dzīvu modificētu organismu drošas pārvietošanas, apstrādes un izmantošanas jomā, kam var būt nelabvēlīga ietekme uz bioloģiskās daudzveidības saglabāšanu un ilgtspējīgu izmantošanu, ņemot vērā arī riskus cilvēku veselībai un īpaši koncentrējoties uz pārrobežu kustībām¹⁷. Kartagenas protokols tika radīts paredzot nākotnes tehnoloģisko attīstību, tādēļ ir jāņem līdž kādai pakāpei tas attiecas uz organismiem, kas iegūti ar genoma rediģēšanas metodēm (Tsuda et al., 2019).

ESAO darba grupa biotehnoloģijas normatīvās uzraudzības saskaņošanai ir apspriedusi drošības un normatīvos apsvērumus, ko izvirzījuši genomiski rediģētie organismi. 2018. gada jūnijā Parīzē notika "ESAO konference par genoma rediģēšanu: Pielietojums lauksaimniecībā – Ietekme uz veselību, vidi un regulējumu" (Tsuda et al., 2019).

Organismi, kas iegūti izmantojot jaunās selekcijas metodes, var saturēt nukleīnskābes ar svešu izcelsmi. Dažādās valstīs šādu organismu regulēšana atšķiras. 2018. gada 28. martā ASV lauksaimniecības sekretārs Sonijs Perdjū paziņoja, ka ASV Lauksaimniecības departaments (USDA) "neregulē vai neplāno regulēt augus, kurus citādi varētu attīstīt, izmantojot tradicionālās selekcijas metodes, ja vien tie nav augu kaitēkļi vai nav izstrādāti, izmantojot augu kaitēkļus"¹⁸ (Tsuda et al., 2019).

2018. gada 25. jūlijā Eiropas Kopienas Tiesa lēma, ka organismi, kas iegūti ar jaunām mutāģenēzes metodēm, tas ir, ar genoma rediģēšanu, atšķirībā no konvencionālajām mutāģenēzes metodēm, "kuras ir bieži izmantotas un kurām ir ilgas drošas lietošanas vēsture", nav atbrīvotas no tiesību aktiem, kas attiecas uz ĢMO (European Court of Justice, 2018).

Argentīnā, Čīlē un Brazīlijā organismiem, kas iegūti ar jaunajām augu audzēšanas tehnoloģijām, nepieciešams apliecinājums, ka tie nesatur nukleīnskābes, kas iegūtas no citiem organismiem. Austrālija 2019. gadā pieņēma "Gene Technology Change (2019 Measures No. 1) Regulations 2019", kas ir modificēts 2000. gada likums "The Gene Technology Act 2000". Ar to ir noteikts, ka Austrālijas valdība neregulēs genoma rediģēšanas tehniku izmantošanu augiem, dzīvniekiem un cilvēka šūnu līnijām, kuros nav ieviestas jaunu ģenētisko materiālu kombinācijas. Savukārt Jaunzēlandē visus genomiski rediģētos organismus uzskata par

¹⁶ Convention on Biological Diversity (CBD). Article 8, in situ Conservation. Available online at: <https://www.cbd.int/convention/articles/default.shtml?a=cbd-08>.

¹⁷ CBD. Text of the Cartagena Protocol on Biosafety. Available online at: <https://bch.cbd.int/protocol/text>.

¹⁸ U.S. Department of Agriculture (2018). Secretary Perdue Issues USDA Statement on Plant Breeding Innovation. Washington, DC. Available online at: <https://www.usda.gov/media/press-releases/2018/03/28/secretary-perdue-issues-usdastatement-plant-breeding-innovation>

dzīvjiem modificētajiem organismiem. Japānā 2019. gadā valdība pieņēma lēmumu, ka ar genoma rediģēšanas metodēm iegūtie galaprodukti, kas iegūti, izmantojot SDN-1, netiek uzskatīti par tādiem, kas satur dzīvus modificētus organismus (Tsuda et al., 2019).

2018. gada jūnijā Parīzē notikušajā "ESAO konferencē par genoma rediģēšanu: Pielietojums lauksaimniecībā – Ietekme uz veselību, vidi un regulējumu" riska novērtēšanas eksperti diskutēja par to, ka šajā jomā būtiski pieaug pētījumu sarežģītība, un regulatoro prasību pieaugums neatspoguļo zinātnisko pamatojumu, bet gan citus apsvērumus – sociālos, likumdošanas un politiskos. Daži eksperti pieprasīja, lai genomiski rediģētie produkti tiktu marķēti un tiktu veikts monitorings ar mērķi identificēt potenciālos riskus un sistemātiski ievākt datus, uz kuriem tālāk varētu balstīt lēmumus. Citi eksperti iebilda, pret tādu politiku attīstību, kas balstās uz statistiskajiem rezultātiem, kas iegūti lielu pētījumu rezultātā. Viņu ieskatā katrai sabiedrībai ir tiesības vispirms definēt, kādas būs to dzīves vērtības, un tad ieviest atbilstošu regulējumu. Šī pieeja atbilst uz hipotēzi balstītai zinātniskajai paradigmai, un ļauj attīstītāju un selekcionāru zinātniskajai sabiedrībai labāk saprast jaunās tehnoloģijas (Friedrichs et al., 2019).

Uz produktu balstītas riska novērtēšanas stratēģijas var pārstāvēt iespējamu pirmo soli, lai ieviestu fokusētus pētījumus, kas būtu ekonomiski pieņemamāki gan pieteicējiem, gan uzraugošajām institūcijām. Uz šo pieeju balstās ESAO, WHO un FAO Codex Alimentarius dokumenti, kas izstrādāti pēdējo vairāk nekā 30 gadu laikā. Svarīgākie principi balstās uz: i) organismu un tā izlaišanu vidē; ii) tā ieviešanos un saglabāšanos vidē; iii) uz iespējamiem rezultējošiem ekoloģiskajiem modificētā organisma efektiem, kā arī uz veselību, ja tos izmanto pārtikai un dzīvnieku barībai (Friedrichs et al., 2019).

Norvēģijā ĢMO riska vērtēšanā izmanto ar drošību nesaistītu vērtēšanas pieeju (*non-safety assessment*). Šī pieeja ietver ne tikai ietekmi uz cilvēka veselību un vidi, bet arī sociālus un ētiskus apsvērumus. Norvēģijas Ģēnu tehnoloģiju likums paredz, ka pirms jauno produktu regulatorā apstiprinājuma, vispirms tiek izvērtēta šo produktu ilgtspēja, kā arī ētiskā un sociālā ietekme. Pat tādās situācijās, kad riska ziņā genomiski rediģētos organismus uzskata par salīdzināmiem ar nemitificētiem organismiem, tehnoloģijai papildus sociālajiem ieguvumiem var būt arī negatīva ietekme, kas pamato likumā prasīto novērtējumu. Galvenais iemesls ir genoma rediģēšanas tehnoloģiju būtiski atšķirīgais raksturs, ņemot vērā to potenciālu jauniem, revolucionāriem risinājumiem lauksaimniecībā un akvakultūrā kopā ar ekonomisko sistēmu, ko veido patentu sistēma. Pārtika ir labas dzīves pamats bioloģiski un kulturāli, kas prasa stingrākas novērtēšanas procedūras nekā tās, kas nepieciešamas citām nozarēm, vismaz tādās valstīs kā Norvēģija ar stingrām tradīcijām valsts kontrolē pār lauksaimniecības tirgu un selekcijas programmām. Pamatojoties uz šiem principiem, Norvēģijā nav atļauts izmantot pārtikā un barībā vairākus klasiskos ĢMO, kas ir autorizēti ES. Piemēram, antibiotiku rezistences gēnu dēļ ir aizliegta kukurūza Bt176, rapsis MS1xRF1(PGS1), rapsis MS1xRF2(PGS2) un rapsis Topas 19/2. Rapšu GT73, Ms8, Rf3 un Ms8xRf3 aizlieguma iemesls ir ĢMO vai transģēna izplatīšanās risks videi, kā arī tas, ka nav sociālās lietderības un ir piekļuve alternatīvām ražošanas sistēmām. Savukārt kukurūzas 1507 aizliegums ir balstīts uz ētiskiem apsvērumiem, jo šis ĢM augs ir tolerantants pret herbicīdu glufosināta amoniju. Šis herbicīds Norvēģijā ir aizliegts. Tiek uzskatīts, ka nebūtu ētiski izmantot Norvēģijā graudus vai produktus, kas iegūti citās valstīs, izmantojot šo herbicīdu (Myskja and Myhr, 2020).

Tā kā genoma rediģēšana ir daudzām institūcijām pieejamāka tehnoloģija, jo tā ir lētāka un efektīvāka nekā iepriekšējās ĢM tehnoloģijas, var iedomāties, ka nākotne nesīs vairākus

nišas produktus, kas ir vai nu patentēti, vai brīvi pieejami ar atvērtā koda palīdzību. Turklāt genomu rediģētos augus izstrādā ne tikai starptautiski uzņēmumi, bet arī mazāki vietējie uzņēmumi un pētniecības iestādes. Arī šajos gadījumos var apgalvot, ka jāsaglabā sabiedrības kontrole, nodrošinot, ka šie produkti ir ilgtspējīgi un dod sabiedrībai labumu, ievērojot Norvēģijas selekcijas programmu tradīcijas. Tas mazinās sabiedrības skepsi pret ĢMO. Turklāt ar drošību nesaistītu jautājumu iekļaušana var palielināt cilvēku uzticību regulatorajiem procesiem. Uzticības jautājumam ir izšķiroša nozīme attiecībā uz patērētāju un tirgus pieņemšanu, un tas attiecas gan uz patērētāju iespēju izvēlēties pārtiku, kuru viņi vēlas iegādāties, sniedzot attiecīgu informāciju, gan arī to, kā pārtika ir ražota (Myskja and Myhr, 2020).

6.2. Gēnu dziņu riska novērtēšanas specifika

Lai gan gēnu dziņi eksistē arī dabā, ir zinātnieki, kuri uzskata, ka mākslīgi radītie gēnu dziņu organismi (GDO) atšķiras no pašlaik pārtikā un dzīvnieku barībā izmantotajiem ĢMO ar vairākām īpašībām, kuras ir svarīgi ņemt vērā riska vērtēšanā, kā arī sabiedrībai pieņemamā un ētiskā vērtējumā, kas ir svarīgi, lai šīs tehnoloģijas varētu izmantot. Šīs atšķirīgās īpašības attiecas uz tādām jomām kā pielietojuma stratēģijas, komercializācija, modifikācijas izplatīšanās, tehniskā realizācija un ekosistēmas:

- 1) Galvenais klasisko ĢMO mērķis ir pasargāt augus no stresora – kaitēkļiem vai nezālēm, piešķirot augiem rezistenci pret tiem. Savukārt GDO tiek izstrādāti tā, lai ietekmētu visu kaitēkļu populāciju, līdzīgi kā sterilo kukaiņu tehnoloģijas gadījumā.
- 2) Klasisko ĢMO gadījumā transgēnu nodošana citiem organismiem, piemēram, radniecīgām savvaļas sugām, nav vēlama, bet GDO gadījumā tieši tāds ir mērķis - nodot transgēnu visiem attiecīgās sugas īpatņiem. ĢMO sakrustošanās ar tuvu radniecīgām sugām ir ar zemu varbūtību saglabāties populācijā, jo notiks pazīmes izskaldīšanās nākamajās paaudzēs. Savukārt GDO pazīmei ir daudz lielāka varbūtība izplatīties pat tādos gadījumos, kad tā ir ar negatīvu selekcijas iezīmi (Simon et al., 2018). Pašlaik pētījumu šajā jomā ir maz. ASV ir vērtēta GE sējas idras *Camelina sativa* potenciālā horizontālā gēnu pārnesē uz radniecīgām savvaļas sugām (Zhang et al., 2020). Lauka izmēģinājumu ar šādiem augiem pagaidām vēl ir maz, un tajos nav konstatēta negatīva ietekme uz vidi (Metje-Sprink et al., 2020).
- 3) Tiklīdz gēna dziņa alēle atstāj norobežoto vidi un nonāk dabā, ģenētiskās daudzveidības līmenis saņēmējorganismā arī var sākt ietekmēt transgēna izplatīšanos. Savvaļas populācijas, uz kurām, visticamāk, attiecas GDO, ģenētiski ir daudzveidīgas. Tādējādi mijiedarbība starp transgēnu un ģenētisko fonu kļūst sarežģītāka un mazāk paredzama. Neveiksmīgi populācijas nomācošie gēnu dziņi varētu samazināt mērķa sugu ģenētisko daudzveidību un ietekmēt populācijas attīstību grūti prognozējamās veidos. Parasti ģenētiskās daudzveidības līmenis dažādās sugās ir ļoti atšķirīgs, un tāpēc tas ir rūpīgi jāapsver, veidojot un novērtējot GDO.
- 4) GDO nodod CRISPR/Cas sistēmu savvaļas organismiem, un tas notiek dabā. ĢMO gadījumā vidē tiek izplatīts gatavs un pārbaudīts komercializējams produkts, piemēram, konkrēta augu šķirne, kas tiek kultivēta ražas iegūšanai. Savukārt GDO

gadījumā ģenētiskā modifikācija pati izplatās ekosistēmā. Tās izplatīšanos nav iespējams apturēt, to nav iespējams atsaukt (*withdrawn*).

- 5) Iespējams, ka viens no būtiskākajiem GDO jaunajiem aspektiem ir tas, ka tie modificē savvaļas augus vai dzīvniekus, kas pārsvarā ir invazīvas sugas vai kukaiņu vektori cilvēku un dzīvnieku slimībām. Modifikācijas var tikt izplatītas tālu no sākotnējās izlaišanas vietas. Kukainis var būt kaitēklis agroekosistēmā, bet ārpus tās tas var nebūt kaitēklis (Simon et al., 2018). Kādas kaitīgas nezāles likvidēšana var apdraudēt apputeksnētājus, kas ir atkarīgi no šī auga, kuru uzskata par nezāli (COGEM, 2018).

Pirms izlaišanas dabā, GDO organismiem ir nepieciešama gudra riska novērtēšanas stratēģija (Simon et al., 2018). Nepieciešams izvērtēt vairākus aspektus, kas vides riska novērtējumā saistīti ar gēnu inženierijas ceļā iegūtiem gēnu dziņiem telpā un laikā (14. tabula). 2020. gadā ir pieņemts arī EPNI zinātniskais atzinums par gēnu dziņiem. Tas galvenokārt izvērtēja esošo ĢM dzīvnieku riska novērtēšanas vadlīniju atbilstību gēnu dziņu organismiem. Galvenie secinājumi ir, ka EPNI 2013. g. vadlīnijas nav pietiekami specifiskas un nav pietiekamas gēnu dziņu kukaiņiem. Secinājumos ir uzsvērtas jomas, kurās vadlīnijas ir jāpapildina un jākonkrētizē, piemēram, vides riska novērtējums, *post market* vides monitorings un daudzas citas (EFSA, 2020).

14.tabula

Apkopojums par būtiskiem jautājumiem attiecībā uz gēnu dziņu organismu vides riska novērtējumu telpā un laikā (pēc Then et al., 2020)

Jautājums	Pamatojums	Kādas ir pieejamās metodes?
1)Vai ir iespējams kontrolēt ģenētisko stabilitāti nākamajās paaudzēs?	Pašreplikācija un vides, kā arī epiģenētiskie efekti var novest pie jaunu efektu parādīšanās nākamajās paaudzēs, kas nav bijuši novēroti pirmajā paaudzē.	Kontrolētos apstākļos, ievērojot plašu noteikto vides apstākļu klāstu, jānovēro vairākas paaudzes, kas ļauj novērtēt vismaz īstermiņa evolūcijas ietekmi. Rezultāts jāpielieto kontekstā ar 2. un 3. jautājumu.
2)Vai ir iespējams ņemt vērā mērķa populāciju ģenētisko daudzveidību?	Lielākoties dabiskajās populācijās ir augsts ģenētiskās daudzveidības līmenis. Šis heterogēnais, ģenētiskais fons var izraisīt negaidītus efektus, kas nav bijuši novēroti laboratorijas populācijās.	Vairumā gadījumu ievietotos gēnus nevar pārbaudīt mijiedarbībā ar dabisko populāciju ģenētisko daudzveidību. Piemēram, kukaiņiem laboratorijā audzētie celmi var pārstāvēt tikai nelielu ģenētiskās daudzveidības daļu no savvaļas populācijas.
3)Vai ir iespējama gēnu pārnese uz citām sugām?	Ja ir iespējama gēnu pārnese un hibrīdais pēcnācējs ir	Varētu būt iespējams veikt hibrīdizācijas eksperimentus

Jautājums	Pamatojums	Kādas ir pieejamās metodes?
	dzīvotspējīgs, jaunradušies organismi ir jāuzskata par jauniem ĢMO gadījumiem, kuriem ir jāveic atsevišķs novērtējums.	kontrolētos apstākļos. Rezultāti jāsaista kontekstā ar 1. un 2. jautājumu.
4)Vai vides riska novērtējumā ir iespējams integrēt mērķa sugas populācijas dinamiku un dzīves cikla aspektus?	Kritiskie posmi populāciju attīstībā, kas saistīti, piemēram, ar ziemas sezonu, var radīt inbrīdingu un izmaiņas ģenētiskajā variabilitātē.	Liela mēroga ietekmi uz populācijām var novērtēt ar modeļu palīdzību, bet empīriskie pētījumi ir sarežģīti. Rezultāti jāinterpretē saistībā ar 1. un 2. jautājumu.
5)Vai uztverošo vidi var definēt (noteikt) saistībā ar attiecīgo mijiedarbību un ierobežot attiecībā uz iespējamo izplatību?	Nevēlami efekti var rasties no mijiedarbības ar dažādiem vides komponentiem – tādiem kā saistītie mikrobiomi, simbionti, barības ķēdes, plēsēji. Ir jāņem vērā gan sauszemes, gan ūdens ekosistēmas, gan kompleksas mijiedarbības, piemēram, signālceļi un uzvedības aspekti. Mijiedarbības dzīves ciklā var būt atšķirīgas dažādos attīstības posmos, piemēram, olai, kāpuram, kūniņai, pieaugušam īpatnim.	Šie aspekti ir jāizvērtē katrā gadījumā atsevišķi un soli pa solim. Vairumā gadījumu ilgtermiņa, kumulatīvo un kombinatorisko iedarbību nevar iepriekš pārbaudīt vai izpētīt.

Kanādā veiktā pētījumā dažādu valstu eksperti ir pauduši viedokli par to, kādi sociāli-ekonomiskie aspekti būtu jāņem vērā, lai novērtētu tādu augu potenciālos riskus, kas iegūti ar jaunajām genoma rediģēšanas tehnoloģijām (15. tabula). Aptauju aizpildīja 113 dalībnieki. Ekspertu grupā dominēja vīrieši (80%), vecumā no 45 līdz 65 gadiem (70%). Puse dalībnieku dzīvoja Ziemeļamerikā, 30% Eiropā un 20% pārējās pasaules daļās (6% Āfrikā, 5% Āzijā, 4% Okeānijā un 5% Centrālajā un Dienvidamerikā). Lielākajai daļai respondentu bija doktora grāds (71%) un 20% bija maģistra grāds. Astoņdesmit procenti bija nodarbināti un 14% bija pašnodarbinātie. Četrdesmit procenti strādāja rūpniecībā, 26% universitātēs un 20% valdību institūcijās. Sākotnējā reģistrācijā ekspertu grupas dalībniekiem tika jautāts par kultūraugu veidu un tirgu, ar kuru viņi strādā. Galvenās interesējošās kultūras bija labība (63%), eļļas augi (43%), pākšaugi (39%) un dārzeņi (25%). Vairāk nekā 70% ekspertu strādāja ar pārtiku un barību, 43% ar šķiedrvielām, 37% ar rūpnieciskajām sastāvdaļām un 29% - ar vides pakalpojumiem. Kopumā 56 procenti sevi atzina par zinātniskiem ekspertiem, bet 44% - par sociāliem ekspertiem (juristi, agrobiznesa vadītāji utt.) (Lassoued et al., 2019).

Ekspertu viedoklis par sociāli-ekonomiskajiem apsvērumiem, kuriem būtu jābūt iekļautiem jauno audzēšanas tehnoloģiju riska novērtēšanas procesā (pēc Lassoued et al., 2019)

Sociāli – ekonomiskie apsvērumi	%
Pārtikas drošība	75
Ietekme uz bioloģiskās daudzveidības saglabāšanu un ilgtspējīgu izmantošanu	69
Atbilstība biodrošības pasākumiem, ieskaitot institucionālās izmaksas	67
Kaitīgo organismu sastopamības izmaiņu ekonomiskā ietekme, kas rodas mainoties praksei zemnieku saimniecībās	66
Ekonomiskā ietekme, ko var radīt pesticīdu un herbicīdu izmantošanas apjomi un efektivitāte	64
Sekundāra ar veselību saistīta ietekme kā rezultāts izmaiņām pesticīdu un herbicīdu lietošanā	58
Zemnieku tiesības	55
ĢMO līdzāspastāvēšana	52
Ietekme uz pamatiedzīvotāju un vietējām kopienām, iztiku, tradicionālajām zināšanām un bioloģisko daudzveidību	51
Makroekonomiskā ietekme, ieskaitot uz ilgtspējīgu attīstību	49
Vispārīgas ētiskās normas	46
Ietekme uz patērētāja izvēli vai patēriņa paradumiem	42
Mikroekonomiskā ietekme uz indivīdu, mājsaimniecību vai kopienu	19
Zemes īpašumtiesības	18
Kultūras un garīgie paradumi	18
Ietekme uz piekļuvi tirgum un tirdzniecību valsts un starptautiskā līmenī	15
Ietekme uz darba spēku un nodarbinātību	12
Ietekme uz dzimumu	10
Migrācija starp laukiem un pilsētām	10

Ir daudz ziņojumu par neparedzētām sekām, piemēram, ne-mērķa efektiem, neparedzētiem mērķa efektiem un citiem neparedzētiem efektiem, kas rodas genoma rediģēšanas rezultātā, kurus visus var ietvert ar terminu genomiskas neregularitātes.

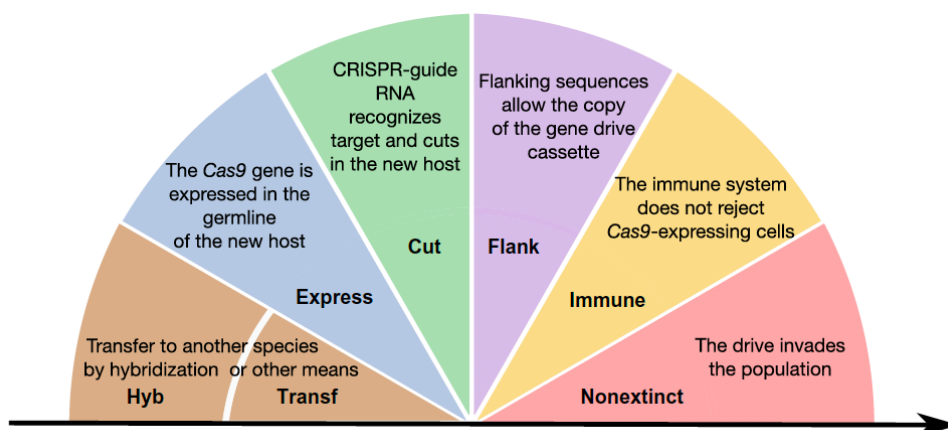
Neskatoties uz to, genomisko neregularitāšu meklēšana šajos pētījumos nebūt nav ierasta, un protokoli ir ļoti atšķirīgi, īpaši attiecībā uz ne-mērķa efektiem (14. attēls) (Kawall et al., 2020).

<p>Ar genoma rediģēšanas procesu saistīti riski:</p> <p>mērķa/nemērķa efekti, ieskaitot neplānotas izmaiņas genomā, epigenomā, transcriptomā, proteomā, metabolomā un mikrobiomā.</p>	<p>Riski, kas saistīti ar vecāku gēnu inženierijas tehniku izmantošanu genoma rediģēšanā:</p> <p>ievietoto gēnu radīti neplānoti efekti, piemēram, saimniekorganisma DNA pārkārtošana, epigenētiskas izmaiņas.</p>
<p>Riski, kas saistīti ar konkrēto pazīmi:</p> <p>Neplānoti efekti molekulārā, šūnas, organisma un ekosistēmas līmenī.</p>	<p>Protokoli, kas nepieciešami molekulāro datu ieguvei:</p> <p>Bioinformātikas un omikas standartizācija un ieviešana, lai varētu paredzēt un noteikt neplānotas izmaiņas.</p>

14.attēls. Genomiski rediģētu organismu riska novērtēšanas elementi (pēc Kawall et al., 2020).

Varbūtība D, ka gēnu dzinis piesārņos ne-mērķa sugu ietver varbūtību, ka dotais DNS fragments pāriet no mērķa sugas uz ne mērķa sugu (19. attēls). Tas var notikt, izmantojot hibridizāciju (Hyb) vai ar citiem līdzekļiem (Transf). Pēc tam Cas9 gēns un guide RNS gēns ir jāekspressē jaunajā saimniekorganismā ar konkrētu varbūtību (Express). Pēc tam mērķa sekvencai ir jātiek atpazītai un sagrieztai ar CRISPR-Cas9 ar noteiktu varbūtību (Cut). Gēnu dziņa kasetei vajadzētu ievietoties griezumā vietā ar varbūtību (Flank); imūnsistēma to nedrīkst eliminēt (Immune), un, visbeidzot, to nevar eliminēt ar stohastiskiem vai selektīviem procesiem ar noteiktu varbūtību (Nonextinct):

$$D = (\text{Hyb} + \text{Transf}) \times \text{Express} \times \text{Cut} \times \text{Flank} \times \text{Immune} \times \text{Nonextinct} \text{ (Courtier-Orgogozo et al., 2019).}$$



19.attēls. Dažādi posmi, kuri var būt iesaistīti horizontālā gēnu pārnēsē uz nemērķa sugu (pēc Courtier-Orgogozo et al., 2019).

6.3. Secinājumi

1. Eiropas Savienībā organismi, kas iegūti ar jaunām mutāģenēzes metodēm, tas ir, ar genoma rediģēšanu, tiek uzskatīti par ĢMO, līdzīga pieeja ir Jaunzēlandē.
2. Citur pasaulē tos neuzskata par ĢMO, piemēram, ASV, ja vien tie nav augu kaitēkļi vai nav izstrādāti, izmantojot augu kaitēkļus, vai Austrālijā, ja tajos nav ieviestas jaunas ģenētisko materiālu kombinācijas.
3. Argentīnā, Čīlē un Brazīlijā organismiem, kas iegūti ar jaunajām augu audzēšanas tehnoloģijām, nepieciešams apliecinājums, ka tie nesatur nukleīnskābes, kas iegūtas no citiem organismiem. Japānā par ĢMO neuzskata tos organismus, kas iegūti ar SDN-1. Norvēģijā ĢMO riska vērtēšana ietver ne tikai ietekmi uz cilvēka un dzīvnieku veselību un vidi, bet arī sociālus un ētiskus apsvērumus.
4. Būtiskākās gēnu dziņu atšķirības no klasiskajiem ĢMO ir to mērķis ietekmēt visu kaitēkļu populāciju, nodod transgēnu attiecīgās sugas īpatņiem, arī negatīva selekcijas spiediena gadījumā, šo organismu izplatīšanos nav iespējams apturēt/ atsaukt (*withdrawn*).

Atsauces

- COGEM (Netherlands Commission on Genetic Modification). 2018. Gene drives: Experience with gene drive systems that may inform an environmental risk assessment. Rudelsheim P.L.J. and Smets G. Perseus BVBA. <https://cogem.net/app/uploads/2019/07/CGM-2018-03-Report-Gene-Drives-met-kaft.pdf>
- Courtier-Orgogozo V, Danchin A, Gouyon P-H, Boëte C. 2020. Evaluating the probability of CRISPR-based gene drive contaminating another species. *Evol Appl*, 13: 1888 – 1905.
- EFSA GMO Panel (EFSA Panel on Genetically Modified Organisms), Naegeli H, Bresson J-L, Dalmay T, Dewhurst IC, Epstein MM, Guerche P, Hejatko J, Moreno FJ, Mullins E, Nogue F, Rostoks N, Sanchez Serrano JJ, Savoini G, Veromann E, Veronesi F, Bonsall MB, Mumford J, Wimmer EA, Devos Y, Paraskevopoulos K and Firbank LG, 2020. Scientific Opinion on the adequacy and sufficiency evaluation of existing EFSA guidelines for the molecular characterisation, environmental risk assessment and post-market environmental monitoring of genetically modified insects containing engineered gene drives. *EFSA Journal* 2020;18(11):6297.
- Kawall K, Cotter J, Then C. 2020. Broadening the GMO risk assessment in the EU for genome editing technologies in agriculture. *Environ Sci Eur* 32:106.
- Lassoued R, Macall DM, Smyth SJ, Phillips PWB, Hesselin H. 2019. Risk and safety considerations of genome edited crops: Expert opinion. *Current Research in Biotechnology*, 1:11-21.

- Metje-Sprink J, Sprink T, Hartung F. 2020. Genome-edited plants in the field. *Current Opinion in Biotechnology*, 61: 1-6.
- Myskja BK, Myhr AI. 2020. Non-safety assessments of genome-edited organisms: should they be included in regulation? *Science and Engineering Ethics*, <https://doi.org/10.1007/s11948-020-00222-4>
- Simon S., Otto M., Engelhard M. 2018. Synthetic gene drive: between continuity and novelty. *EMBO rep*, 19: e45760.
- Then, C., Kawall, K. and Valenzuela, N. (2020), Spatiotemporal Controllability and Environmental Risk Assessment of Genetically Engineered Gene Drive Organisms from the Perspective of European Union Genetically Modified Organism Regulation. *Integr Environ Assess Manag*, 16: 555-568.
- Tsuda Mai, Watanabe Kazuo N., Ohsawa Ryo. 2019. Regulatory Status of Genome-Edited Organisms Under the Japanese Cartagena Act. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7:387.
- Xu, J., Hua, K. & Lang, Z. 2019. Genome editing for horticultural crop improvement. *Hortic Res* 6, 113.
- Zhang C-J, Mahoney J, Kim D-S, Sun S, Gan L, Fan J, Yan X. 2020. Pollen longevity, flowering phenology, and seedbank persistence of *Camelina sativa* (L.) Crantz and congeneric species. *Industrial Crops and Products*, 156:112872.

Pielikumi

1.pielikums. Projekta darba grupas sanāksmes protokols

Darba grupas sanāksme notiek attālināti, izmantojot Zoom

2020. gada 2. jūnijā, plkst. 15:00

Sēdē piedalās:

Lelde Grantiņa-leviņa, projekta vadītāja, vadošā pētniece, Zinātniskais institūts BIOR;

Nils Rostoks, projekta eksperts, vadošais pētnieks, Latvijas Universitāte;

Juris Ķibilds, projekta eksperts, LU un BIOR doktorantūras students, pētnieks, Zinātniskais institūts BIOR;

Aija Jēriņa, projekta eksperte, vadošā pētniece, Zinātniskais institūts BIOR;

Elizabete Miltiņa, LU maģistrantūras studente, Zinātniskais institūts BIOR.

Sanāksmi protokolē: projekta vadītāja L. Grantiņa-leviņa

Sanāksmes darba kārtība:

1. Lelde Grantiņa-leviņa - informācija par projekta mērķi, uzdevumiem. Īss ieskats par metodēm, kā arī Euginius datu bāzē esošajiem ĢMO, kas iegūti ar genoma rediģēšanas metodēm. L. Grantiņa-leviņa informē, ka informācija par projektu ir ievietota Institūta BIOR mājas lapā martā.
2. Juris Ķibilds - prezentācija par līdzšinējo BIOR pieredzi darbā ar NGS. Pašlaik BIOR pieejamās sekvenēšanas iekārtas ir Illumina MiSeq sekvenators un Applied Biosystems 3500 Sangera sekvenators. Iespējams, nākotnē tiks iegādāts MinION no Oxford Nanopore. Tehniskais nodrošinājums datu analīzei: pieeja RTU High Performance Computing (HPC) klasterim – 1200 CPU, 22 GPU, 238 TB RAM, iespējams Linux vidē darbināt visu pieejamo programmatūru; CLC Genomics Workbench uz stacionārā datora; BIOR kopējais datu uzglabāšanas serveris. Pieredze un pašreizējie pielietojumi: baktēriju pilna genoma sekvenēšana, Metabarcoding, *Shotgun* metagenomika, Mērķēta SNP sekvenēšana (tiks sākta augustā, pētījumu objekts būs zivis). Potenciālie pielietojumi šajā projektā: amplikonu sekvenēšana – iespējams, līdzīgi kā ar metabarcoding pieeju varētu kvantitatīvi novērtēt, cik liela daļa no ģenētiskā materiāla satur noteiktu ģenētisko modifikāciju; mērķēta sekvenēšana – ar hibridizācijas vai PCR palīdzību izolēt interesējošos DNS fragmentus sekvenēšanai. Domājams, hibridizācijas metode būtu

mazāk kvantitatīva, nav zināms, kāds būtu detekcijas limits. L. Grantiņa -leviņa piebilst, ka Insitūtā BIOR ir pieejams arī pirosekvenators.

3. Elizabete Miltiņa - pieredze darbā ar digitālo PCR ar "klasiskajiem" ĢMO. E. Miltiņa pastāsta par pētījumu, kas tiek veikts viņas maģistra darba ietvaros, kura mērķis ir izstrādāt un ieviest praksē uz dPCR balstītu metodi ĢMO kvantificēšanai.
 4. Nils Rostoks - par SDN1/2 un ODM atzinumiem un citu jaunāko informāciju. N. Rostoks pastāsta par priekšrocībām, ko dod SDN-3, SDN-1/2. EPNI ir sniegusi atzinumu par SDN-3 2012. gadā. Pašlaik norit sabiedriskā apspriešana EPNI sagatavotam atzinumam par SDN-1/2. Citi aktuāli atzinumi ir par augiem un mikroorganismiem, kas iegūti sintētiskās bioloģijas ceļā, kā arī par kukaiņiem, kas iegūti ar *gene drive* tehnoloģiju. N. Rostoks informē par jauniem Eiropas Padomes un EPNI mandātiem.
 5. Lelde Grantiņa-leviņa - tuvākās aktivitātes projektā un pienākumu sadalījums atbilstoši projekta aktivitātēm.
1. aktivitāte. Veikt diagnostikas iespēju izpēti un zinātniskā riska analīzi organismiem, kas iegūti ar jaunajām mutagēzes metodēm:
 - Jāizvēlas potenciālie modificēto organismu piemēri, kas tuvākajos gados varētu būt aktuāli Latvijas tautsaimniecībai – augi, dzīvnieki, mikroorganismi?
 - Tiek veikta šo organismu diagnostikas iespēju izpēte – J. Ķibilds NGS iespējas, A. Jēriņa un E. Miltiņa dPCR iespējas.
 - Paralēli tiek veikta izvēlēto organismu zinātniskā riska analīze – N. Rostoks (molekulārais raksturojums), L. Grantiņa-leviņa (riskā analīze).
 - Diagnostikas iespēju izpētes un zinātniskā riska analīzes rezultāti tiks iekļauti projekta pirmā gada atskaitē.

2. aktivitāte. Veikt zinātniskā riska analīzi organismiem, kas iegūti ar mutagēzes metodēm un tādām jaunajām tehnoloģijām kā *gene drive* un citām jaunajām audzēšanas metodēm (new plant breeding techniques) atbilstoši Latvijas tautsaimniecībai:

- Divi semināri, lai iepazīstinātu ar šīm tehnoloģijām, uzzinātu šo ieinteresēto pušu viedokli par tām, tai skaitā par iespējamiem ieguvumiem, zaudējumiem un izaicinājumiem, ko varētu radīt šādi organismi Latvijas tautsaimniecībai un videi – 11.03.2020., oktobris-novembris. L. Grantiņa-leviņa – semināra organizēšana, visi projekta eksperti – prezentācijas seminārā;

- Šīs aktivitātes ietvaros ir plānots sagatavot populārzinātnisku rakstu (atbildīgā L. Grantiņa-leviņa).

Tiek nolemts, ka tuvāko divu nedēļu laikā projekta eksperti veic individuālu darbu, lai tālāk izvēlētos potenciālos modificēto organismu piemērus, kas tuvākajos gados varētu būt aktuāli Latvijas tautsaimniecībai – augi, dzīvnieki, mikroorganismi.

Sanāksmi beidz pl. 17:00.

L. Grantiņa-leviņa

2. pielikums. Populārzinātnisks raksts

RAŽĪBA



Punktspārnu auglmušas *Drosophila suzuki* ierobežošanas iespējas ar ģēnu rediģēšanu

Drozofilas ir augļu mušiņas, kas bieži ir redzamas vasarā, kad ir daudz pārgatavojušos un jau pūstošu augļu un ogu. Augļu mušām ir vairākas sugas, viena no tām – punktspārnu auglmuša – ir kļuvusi par bīstamu kaitekli vairākās Eiropas valstīs. Punktspārnu auglmuša *Drosophila suzuki* ir potenciāli jauns kaiteklis arī Latvijas augļu darzos.

SAGATAVOJA: Dr. biol. Lelde GRANTĪNA - IEVIŅA, Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskais institūts BIOR.
Titulfoto: <https://ucsdnews.ucsd.edu>, Michelle Bui, UC San Diego

Punktspārnu auglmušas raksturojums un ierobežošanas metodes

Kaitējla latīniskais nosaukums ir *Drosophila suzuki*, angļu valodā – *spotted wing drosophila*. Tēviņi ir 2.6–2.8 mm gari, ar melnu punktveida plankumu tuvu katra spārna galam. Mātītes ir 3.2–3.4 mm garas un bez šāda punktveida plankuma (EPPO, 2011b). Atšķirība no citām drozofilām šī auglmuša, izmantojot zobainu dējekli, dēj olas zem mizas ogās un augļos, kas vēl tikai nogatavojas. Vienā dējekļa dūriena vietā mātīte iedēj vienu līdz trīs olas, bet savas dzīves laikā tā var izdēt līdz 300 olām. Tā kā vienu augli olu dēšanai var izmantot vairākas mātītes, tad tajā var attīstīties līdz pat 60–70 pēcnācējiem. Izšķīlušies kāpuri (līdz 3.5 mm gari) un vēlāk arī kūniņas attīstās augļu un ogu iekšpusē, izraisot būtiskus bojājumus, kam var sekot puve. Kūniņas var

attīstīties arī augļu un ogu ārpusē. Dzīves cikls ir īss – viena līdz divas nedēļas, atkarība no klimatiskajiem apstākļiem.

Japānā šim kaiteklīm gadā var būt līdz pat 13 paaudzēm, Amerikas Savienotajās Valstīs (Kalifornija) – 3–10 paaudzes. Tādējādi ir būtiski ražas zudumi. Līdz pagājušā gadsimta 30. gadiem šis kaiteklis bija sastopams tikai Japānā, bet pēdējās desmitgadēs invazīvi izplatījies visos kontinentos, izņemot Antarktīdu. Tas ir konstatēts Sibīrijas dienvidos Krievijā (2003), Spānijā (2010), Itālijā (2010), Francijā (2010) un Slovēnijā (2011). Ir aprēķināts, ka Kalifornijā, ASV, laika periodā no 2008. gada līdz 2014. gadam punktspārnu auglmušas radītie kaitējumi ir sagādājuši 39 milj. USD lielus zaudējumus, sabojājot 20–100 % ražas (Buchman et al 2018; EPPO, 2011a, EPPO, 2011b). Pēdējos gados šis kaiteklis ir konstatēts jau vairākās mums ģeogrāfiski tuvākās

valsts: Polija (2014), Zviedrija (2014), Ukraina, 2014, Somija (2019) (<https://gd.eppo.int/taxon/DROSSU/distribution>). Tam patik klimats ar augstu mitrumu un mērenām temperatūrām. Aukstas ziemas neietekmē kaitēkļa izdzīvošanu, jo tas ir ieviesies gan Ķīnas ziemeļos, gan Hokaido dienvidu daļā (EPPQ, 2011b).

Visbiežāk šī auglmuša bojā avenes, kazenes, zemenes, saldus ķiršus, persikus un aprikozes. Retāk tiek bojāti āboli, plūmes un vīnogas. Tas var invadēt arī savvaļas augus, piemēram, melenes. Šie augļi un ogas, kā arī to tirdzniecība tiek uzskatīti par galvenajiem kaitēkļa pārneses ceļiem no vienas valsts uz citu, jo novākšanas laikā bojājumi var būt vēl neizteikti un nepamanāmi. Kaitēkļa attīstība turpinās transporta laikā. Vēlāk, jau citā valstī, bojātie augļi un ogas var nonākt kompostā, no kurienes pieaugušie īpatņi var invadēt vietējos dārzus. Tirdzniecība ar augu stādāmo materiālu tiek uzskatīta par zema riska izplatības ceļu (EPPQ, 2011a, EPPQ, 2011b).

Pašlaik pieejamās *D. suzukii* ierobežošanas metodes balstās uz plaša spektra insekticīdiem, no kuriem neviens Latvijā nav reģistrēts lietošanai pret auglmušām (VAAD, 2020). Valsts, kur šādi līdzekļi, piemēram, malations, ir reģistrēti, novērota variabla efektivitāte, apgrūtinot lietošana augļu nogatavošanās laikā, kā arī iespējama *D. suzukii* rezistences rašanās (Buchman et al 2018). Spānijā ir konstatēti punktspārnu auglmušas dabiskie ienaidnieki – parazītoīdi, spožlāpsenes *Pachycrepoides vindex* un tumšlāpsenes *Trichopria cf. drasophilae*, kas savā attīstībā izmanto auglmušas kūniņas un būtiski samazina pieaugušo īpatņu izveidošanos bojātajos augļos un ogās. Pētījumā tika

konstatēts, ka dabiski ar šiem parazītoīdiem bija invadētas 4–10 % drozofilu kūniņu, bet laboratorijas apstākļos līdz pat 83 %. Atklāti arī plēsīgi kukaiņi no koku laupītājblakšu dzimtas (*Orius laevigatus*) un spļļastes *Labidura riparia*, kas barojas ar auglmušas olām vai kāpurēm. Laboratorijas apstākļos šie plēsīgie kukaiņi nogalināja līdz pat 76 % drozofilu olu un kāpuru (Gaborra et al., 2015). Tomēr bioloģiskās kontroles preparāti vēl netiek plaši izmantoti (Buchman et al 2018).

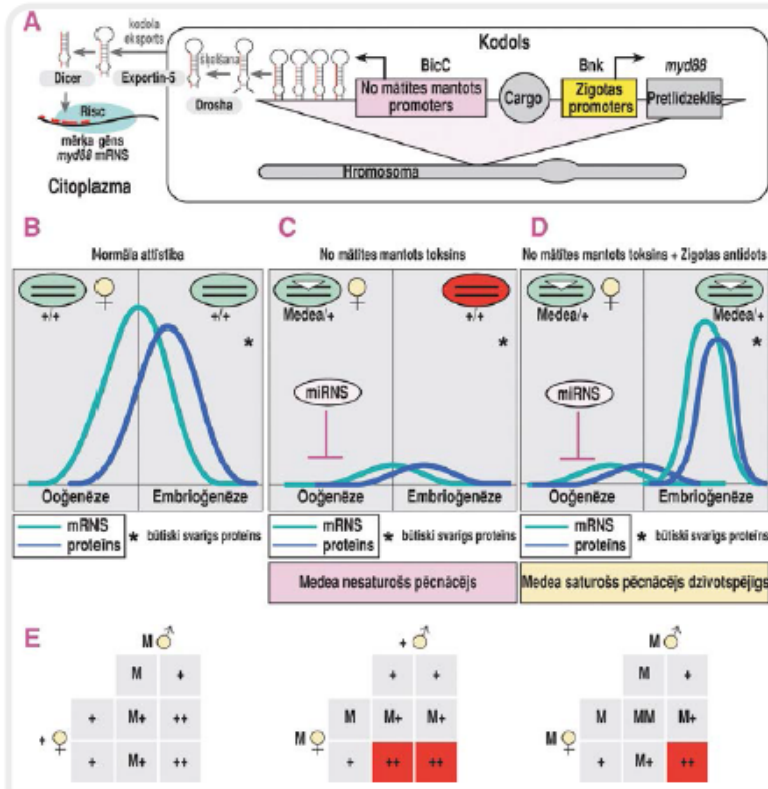
Punktspārnu auglmušas ierobežošana ar gēnu rediģēšanas palīdzību

Viens no variantiem nākotnē šī kaitēkļa populācijas ierobežošanai ir izmantot ģenētiski modificētus organismus, kas izveidoti, balstoties uz gēnu dzīņa (*gene drive*) sistēmām, kuru iedzīmtība nenotiek pēc Mendela likumiem – gēnu dzīņa organismu jeb gēnu sastopamība katrā paaudzē pieaug pat tad, ja nav izdzīvošanas priekšrocību. Viena no vislabāk izstrādātajām sistēmām *D. suzukii* ierobežošanai ir *Medea* sistēma (*Medea* – *Maternal Effect Dominant Embryonic Arrest*). *Medea* sistēma balstās uz toksīna – pretlīdzekļa kombinācijas ekspresiju (Buchman et al 2018). *Medea* sistēma ir dabiski sastopama dabā. Tā ir atklāta miltu vabolei *Tribolium castaneum*, kur tā regulē populācijas blīvumu, kā arī peļēm *Mus musculus*, kur tā izraisa smagu kombinētu anēmiju un trombocitopēniju (citēts pēc COGEM, 2018).

Punktspārnu auglmušai *Medea* sistēmā microRNS (miRNS) toksīns tiek ekspresēts oogenēzē sievišķajiem īpatņiem, kuriem ir *Medea* sistēma, savukārt pretlīdzeklis ekspresējas agrīnās

embriogēzes stadijās pēcnācējiem, kuriem ir šī sistēma (1. attēls). Toksīnu kodejošais gēns tiek pārmantots visiem pēcnācējiem no mātes, kurai ir *Medea* sistēma, kas izpaužas kā miRNS vadīta svarīga embrioniskā gēna apspiešana, kas izraisa normālas embriogēzes attīstības pārtraukšanu. Pēcnācēji, kas pārmanto *Medea* sistēmu, saņem pretlīdzekli, ko veido šī svarīgā embrioniskā gēna kopija, kas ir rezistenta pret miRNS, atļaujot notikt normalai attīstībai. Pēcnācēji, kuriem nav *Medea* sistēma, nevar normāli attīstīties un iet bojā. Balstoties uz šādu iedzimtību, *Medea* sistēma konkrētajā kaitēkļu populācijā ātri izplata pati sevi un ikvienu tajā ievietoto gēnu (*Cargo*). Šāds ievietotais gēns

gadījumā dabā būs nepieciešams izlaist daudz mazāk laboratorijā pavairoto īpatņu nekā sterilo kukaiņu tehnoloģijas (*sterile insect technique*) gadījumā, kas plaši tiek izmantota Vidusjūras auglmušas *Ceratitis capitata* ierobežošanai (Buchman et al 2018). Sterilo kukaiņu tehnoloģija ir videi draudzīga kukaiņu apkaršanas metode, kas ietver mērķa kaitēkļa masveida audzēšanu un sterilizāciju, izmantojot starojumu, kam seko sistematiska sterilu tēviņu izplatīšana noteiktā vietā, kur tie pārojas ar savvaļas mātītēm, kurām šādas pārošanās rezultātā nav pēcnācēju, tādējādi kaitēkļu populācija samazinās (<https://www.iaea.org/topics/sterile-insect-technique>).



1. attēls. Mākslīga *Medea* sistēma *D. suzukii*. (A) *D. suzukii* *Medea* transgēns tika izveidots, lai saturētu miRNS toksīnu, kas iedarbojas uz gēna *myd88* 5' UTR sekvenču, kas ekspresiju nodrošina specifisks no mātes pārmantots *BicC* promotors, un pretlīdzekli, kas sastāv no *D. suzukii* *myd88* kodejoša reģiona, kura ekspresiju nodrošina agrīnai embrioloģiskajai stadijai atbilstošs *Bnk* promotors, kā arī divus atsevišķus transformācijas marķierus. Šie marķieri ir eGFP, kuru kontrole acu krāsai specifisks 3xP3 promotors, un dsRed, kuru kontrole bieži sastopams hr5-IE1 promotors. (B) Normālas attīstības gadījumā no mātes pārmantots *myd88* tiek uzkrāts embrijā, kur tas ir nepieciešams normalai attīstībai. (C) *Medea* sistēmas miRNS toksīns iedarbojas uz *myd88* mRNA oogenēzes laikā, kavējot normālu uzkrāšanos embrijā un izraisot embriju nāvi tiem pēcnācējiem, kas nav pārmantojuši *Medea* sistēmu. (D) Embrijiem, kuriem ir *Medea* sistēmas kopija, ekspresējas tāds *myd88* variants, kas nav jutīgs

varētu būt gēns, kas izraisa uzņēmību pret kādu konkrētu ķīmisku vielu un ko aktivē konkrēti vides apstākļi, piemēram, temperatūra vai diapauze (Buchman et al 2018).

Viena no šādam sistēmām tika radīta jau 2007. gadā citai drozofīlas sugai – *Drosophila melanogaster* (Chen et al., 2007). Tika izmantots gēns *myd88*, kuru pārmanto pa mātes līniju. Šis gēns ir nepieciešams agrās embrija attīstības stadijās, lai nodrošinātu dorzoventrālu attīstību. Ar divu miRNS palīdzību, kas ekspresējas mejozes laikā, šī gēna darbība tiek apturēta. Pretlīdzeklis ir miRNS-nejutīgs *myd88* transgēns, kas aktivējas zigotas stadijā (Chen et al., 2007). 2018. gadā šāda sistēma tika radīta punktspārnu auglmušai, izmantojot četras miRNS molekulas, kas iedarbojas uz *myd88* gēnu. Iedzimtība nākamajās paaudzēs bija 87–100%. Tiek uzskatīts, ka *Medea* sistēmas izmantošanas

pret miRNS toksīnu, kas ekspresējas agrīnās embriogēzes stadijās, kas rezultējas ar miRNS izraisītu letalitāti. (E) Ja krusto heterozigotiskus *Medea* vīrišķos īpatņus ar savvaļas tipa sievišķajiem īpatņiem, visi pēcnācēji izdzīvo, jo no sievišķā īpatņa pārmantots toksīns netiek ekspresēts (kreisajā pusē). Ja krusto heterozigotiskus *Medea* sievišķos īpatņus ar savvaļas tipa vīrišķajiem īpatņiem, 50% pēcnācēju, kas nav pārmantojuši *Medea* sistēmu, iet bojā (vidū). Krustojot heterozigotiskus sievišķos īpatņus ar heterozigotiskiem vīrišķajiem īpatņiem, 75% pēcnācēju pārmanto *Medea* sistēmu vai nu no tēva, vai mātes un izdzīvo, kamēr tie, kas nepārmanto, neizdzīvo (labajā pusē).

Attēls adaptēts no Buchman et al (2018). Paskaidrojumi attēla redzamajiem apzīmējumiem: Dicer – endoribonukleāze Dicer, kas šķel pre-miRNS tsākos fragmentos, kurus sauc par microRNS

RAŽĪBA

(miRNS); Risc – RNS inducēts gēna izslēgšanas komplekss; Drosha – ribonukleāze, kas darbojas microRNS processinga sākuma stadijās. Exportin-5 – proteīns, kas eksportē pre-microRNS ārā no kodola uz citoplazmu; Cargo – jebkurš mērķa gēns, ko var ievietot Medea sistēmā.

Līdz ar Medea sistēmu eksistē vēl arī citas gēnu dziņu sistēmas, piemēram, tādas, kas balstītas un CRISPR/CAS sistēmu. Ta ir pašlaik plaši izmantota gēnu rediģēšanas sistēma, ar kuras palīdzību rada endonukleāžu dziņu sistēmu. Šīs sistēmas priekšrocība ir tāda, ka tiek izmantota viegli izveidojama vadības RNS (guide RNA), kas atrod genomā savu vietu. Pamatelementi šai sistēmai ir CRISPR endonukleāzes gēns, viena vai vairākas vadības RNS sekvenču un atkarībā no pielietošanas veida mērķa gēns (2. attēls). Sistēmu parasti ievieto plazmīdā, kurā abās pusēs dziņa kasetei ir mērķa sekvenču homologas sekvenču, lai inducētu integrēšanos genomā (homing) (COGEM, 2018). Ar šīs sistēmas palīdzību ir radītas tādas mutācijas, kas izraisa izmaiņas sievišķo īpatņu dzimumorgānos, tādējādi ietekmējot vairošanos (Fang and Scott, 2016). Citos gadījumos dabā varētu palaist sterilus vīrišķos īpatņus, kas pārotos ar savvaļas sievišķajiem īpatņiem, tā rezultātā samazinot vai pilnībā iznīcinot punktspārnu auglības populācijas (Kalajdzic and Schetelig, 2017). Pamata gēnu dziņa modifikācijas konkrētajā populācijā neuzskata par paliekošām jeb permanentām. Uzskata, ka vienmēr izselekcionēsies rezistentas aleles. Tomēr tas varētu prasīt ilgu laiku, kas būtu pietiekams, lai pārtrauktu konkrēta kaitēkļa populācijas attīstību (COGEM, 2018).


2. attēls. CRISPR/Cas gēnu dziņa izplatīšanās (attēls adaptēts no COGEM, 2018).

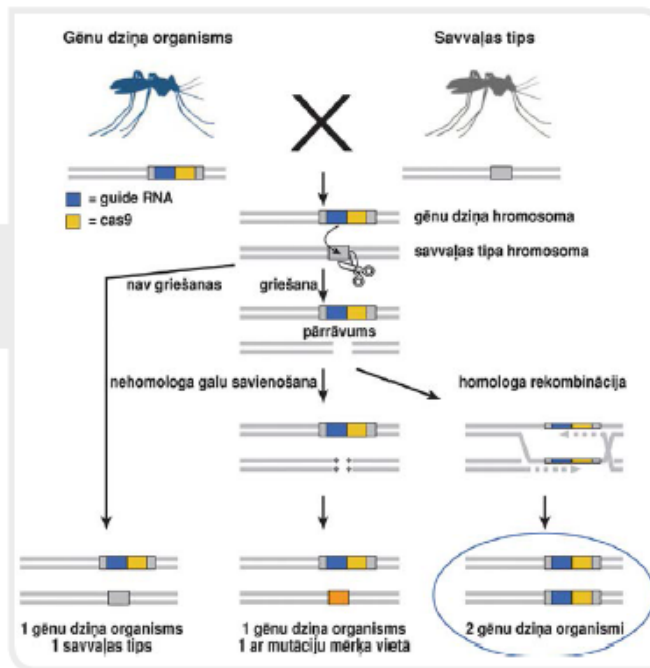
Šī jaunā tehnoloģija ir izraisījusi gan zinātnieku entuziasmu, gan dažādu ekspertu bažas. Kaut arī nākotnē gēnu dziņu sistēmas varētu izmantot lauksaimniecības kaitēkļu un invazīvu sugu kontrolei, apdraudētu sugu glābšanai vai slimību pārnēsātāju nomākšanai, tomēr vispirms nepieciešams novērtēt to iespējamās nevēlamās blakusparādības un izraisītās izmaiņas ekosistēmās. Eiropas pārtikas nekaitīguma iestāde pašlaik strādā pie gēnu dziņu organismu riska novērtējuma, iesaistot šajā procesā arī ES dalībvalstu iedzīvotājus, nevalstiskās organizācijas un kompetentās iestādes (EFSA, 2020).

Pateicības

Informācija sagatavota Lauku atbalsta dienesta finansētā projekta *Ar jaunām ģenētisko modifikāciju metodēm iegūto pārtikas, dzīvnieku barības un to piedevu noteikšana un šādu produktu zinātniskā riska novērtējums* ietvaros.

Izmantotā literatūra

- Buchman A., Marshall J.M., Ostrovski D., Yang T., Akbari O.S. 2018. Synthetically engineered Medea gene drive system in the worldwide crop pest *Drosophila suzukii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115(18): 4725–4730.
- COGEM (Netherlands Commission on Genetic Modification). 2018. Gene drives: Experience with gene drive systems that may inform an environmental risk assessment. Rudelshiem P.L.J. and Smets G. Perseus BVBA. <https://cogem.net/app/uploads/2019/07/CGM-2018-03-Report-Gene-Drives-met-kaft.pdf>
- Chen, C. H., Huang, H., Ward, C. M., Su, J. T., Schaeffer, L. V., Guo, M., and Hay, B. A. (2007). A synthetic maternal-effect selfish genetic element drives population replacement in *Drosophila*. *Science* 316: 597–600.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2020. New advances in biotechnology. https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/new-advances-biotechnology?utm_medium=email&utm_source=fp&utm_campaign=genedrive2020
- EPP0 (European and Mediterranean plant protection organization). 2011a. Pest risk analysis for: *Drosophila suzukii*. <https://pra.eppo.int/organism/DROSSU>
- EPP0 (European and Mediterranean plant protection organization). 2011a. Mini data sheet on *Drosophila suzukii*.
- Fang Li, Maxwell J. Scott. 2016. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the white and Sex lethal loci in the invasive pest, *Drosophila suzukii*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 469(4): 911–916.
- Gabarra R., Riudavets J., Rodriguez G.A., Pujade-Villar J., Armó J. 2015. Prospects for the biological control of *Drosophila suzukii*. *BioControl* 60:331–339.
- Kalajdzic P., Schetelig M.F. 2017. CRISPR/Cas-mediated gene editing using purified protein in *Drosophila suzukii*. *Entomol Exp Appl* 164: 350–362.
- VAAD. 2020. Latvijas Republikā reģistrēto augu aizsardzības līdzekļu saraksts. Rīga: Valsts augu aizsardzības dienests. 406 lpp. 



3. pielikums. Ielūgums un semināra programma 2020. gada 12. martā



Ielūgums

Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskais institūts “BIOR” aicina Jūs 2020. gada 12. martā uz bezmaksas semināru “ĢMO pārtikā, barībā un augu pavairojamajā materiālā – aktuālās tendences, riska novērtējums”!

Semināra sākums pl. 9:30.

Seminārs paredzēts lauksaimniekiem, dzīvnieku barības ražotājiem, pārtikas pārstrādes uzņēmumu kvalitātes kontroles laboratoriju ekspertiem, uzņēmumu kvalitātes kontroles nodaļu speciālistiem, pārtikas jomā strādājošām diagnostikas laboratorijām, Valsts augu aizsardzības dienesta ekspertiem, Pārtikas un veterinārā dienesta pārstāvjiem un Zemkopības ministrijas pārstāvjiem, kā arī attiecīgo nozaru zinātniekiem.

Seminārā stāstīsim par aktualitātēm ĢMO kontroles un riska vērtēšanas jomā pārtikā, dzīvnieku barībā un augu pavairojamajā materiālā. Lūdzam aizpildīt pieteikšanās anketu un pieteikt savu dalību līdz 10. martam. Vietu skaits ierobežots!

Seminārs

ĢMO pārtikā, barībā un augu pavairojamajā materiālā – aktuālās tendences, riska novērtējums

Programma

9:30 – 10:00 Reģistrēšanās, kafija/tēja

10:00 Ievads. Institūta “BIOR” direktors *Aivars Bērziņš*.

10:10 Kas ir “klasiskie” ĢMO? Kā šādus ĢMO veido? – *Nils Rostoks*

10:50 ĢMO piemaisījumu noteikšana pārtikā un barībā – no paraugu ieguves līdz testēšanas rezultātam, ĢMO riska vērtēšana - *Lelde Grantiņa-leviņa*

12:00 Kafijas pauze

12:20 ĢMO zinātniskās riska novērtēšanas zinātnisko ekspertu komisijas darbs – *Jānis Ancāns*

12:40 Eiropas likumdošana ĢMO jomā, situācija Latvijā – *Juris Zinārs, Sigita Boča*

13:00 ĢMO situācija Latvijā – PVD Robežkontroles pieredze – *Tatjana Garanča*

13:20 Jaunākie ĢMO veidi, to nozīme lauksaimniecībā – *Nils Rostoks*

14:00 Jautājumi/diskusijas/anketas

4. pielikums. Ielūgums un semināra programma 2020. gada 3. novembrī



Lauku atbalsta dienesta finansētā projekta “Ar jaunām ģenētisko modifikāciju metodēm iegūtu pārtikas, dzīvnieku barības un to piedevu noteikšana un šādu produktu zinātniskā riska novērtējums” seminārs

Ielūgums

Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskais institūts “BIOR” aicina Jūs 2020. gada 3. novembrī uz bezmaksas *on-line* semināru Zoom platformā “ĢMO un genomiski rediģēti organismi: pielietojums un riska novērtējums”! Semināra sākums pl. 10:00.

Seminārs paredzēts attiecīgo nozaru zinātniekiem un politikas veidotājiem.

Seminārā stāstīsim par ĢMO un genomiski rediģētiem organismiem. Lūdzam pieteikt savu dalību līdz 28. oktobrim, norādot e-pastu!

Lauku atbalsta dienesta finansēts projekts “Ar jaunām ģenētisko modifikāciju metodēm iegūtu pārtikas, dzīvnieku barības un to piedevu noteikšana un šādu produktu zinātniskā riska novērtējums”

Seminārs

GMO un genomiski rediģēti organismi: pielietojums un riska novērtējums

Programma

10:00 Ievads. Projekta mērķi un uzdevumi – *Lelde Grantiņa-leviņa*

10:05 Analīze par organismiem, kas iegūti ar saitspecifiskām nukleāzēm – *Nils Rostoks*

10:25 Gēnu dziņi un to iespējamais pielietojums lauksaimniecībā – *Lelde Grantiņa-leviņa*

10:45 EUGINIUS datu bāzē esošās informācijas analīze par genomiski rediģētiem organismiem – *Aija Jēriņa, Elizabete Miltiņa*

11:15 Pauze (10 min)

11:25 Jaunās paaudzes sekvenēšanas metožu iespējamais pielietojums genomiski rediģētu organismu detekcijā – *Juris Ķibilds*

11:45 Genomiski rediģētu organismu riska analīze – *Lelde Grantiņa-leviņa*

12:05 Diskusija

5. pielikums. Semināru dalībnieku viedoklis par jaunajām genoma rediģēšanas tehnoloģijām

Viedokļa iegūšanai tika izmantoti jautājumi no Eiropas Komisijas 2020. gada februārī – aprīlī izplatītās anketas dalībvalstīm. Anketas kopumā aizpildīja septiņi respondenti. Atsevišķos gadījumos atbildes bija dotas tikai uz daļu no jautājumiem. Anketas tika izplatītas abu projektā organizēto semināru laikā.

Semināru "ĢMO pārtikā, barībā un augu pavairojamajā materiālā – aktuālās tendences, riska novērtējums", kas notika klātienē 2020. gada 12. martā, apmeklēja vairāk nekā 35 cilvēki, ieskaitot lektorus. Četri semināra dalībnieki pārstāvēja dzīvnieku barības ražotājus, četri dalībnieki pārstāvēja privātas laboratorijas un laboratorijas reaģentu un materiālu izplatīšanas firmas, četri dalībnieki bija no Zemkopības ministrijas, trīs dalībnieki bija no Valsts Augu aizsardzības dienesta, trīs dalībnieki – no Pārtikas un veterinārā dienesta, viens dalībnieks bija no Vides aizsardzības un reģionālās attīstības ministrijas, viens dalībnieks bija no Valsts izglītības attīstības aģentūras, bet viens dalībnieks pārstāvēja uzņēmumu, kas sniedz konsultācijas pārtikas uzņēmumiem. Divpadsmit dalībnieki pārstāvēja dažādus zinātniskos institūtus un augstākās izglītības iestādes – Latvijas Universitātes (LU) Bioloģijas institūtu, LU Bioloģijas fakultāti, Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātnisko institūtu BIOR, LLU Dzīvnieku zinātņu institūtu un Agroresursu un ekonomikas institūtu. Šis semināra laikā tika iegūtas sešas anonīmi aizpildītas anketas.

Seminārā "ĢMO un genomiski rediģēti organismi: pielietojums un riska novērtējums", kas notika attālināti 2020. gada 3. novembrī, piedalījās 30 dalībnieki, ieskaitot lektorus. Divi dalībnieki pārstāvēja Valsts Augu aizsardzības dienestu, divi dalībnieki bija no Zemkopības ministrijas, viens dalībnieks bija no Valsts izglītības attīstības aģentūras, bet viens pārstāvēja uzņēmumu SIA LIDL Latvija. Trīspadsmit dalībnieki pārstāvēja dažādus zinātniskos institūtus un augstākās izglītības iestādes – LU, LU Bioloģijas institūtu, LU Bioloģijas fakultāti, LU Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas institūtu, Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātnisko institūtu BIOR, Vides risinājumu institūtu un Agroresursu un ekonomikas institūta Priekuļu pētniecības centru. Pārējie dalībnieki bija doktorantūras studenti no LU Augu un augsnes resursu doktorantūras skolas. Šī semināra dalībniekiem aptaujas anketas tika izplatītas elektroniski jau pirms semināra. Pēc semināra tika saņemta viena aizpildīta anketa.

Zinātne un inovācijas

Uz 1. jautājumu, vai pēdējo piecu gadu laikā esat bijis iesaistīts ar nacionālo finansējumu finansētos projektos, kas bijuši saistīti ar jaunajām genoma rediģēšanas tehnoloģijām, netika

iegūta neviena apstiprinoša atbilde. Pieci respondenti no septiņiem (71,43 %) atbildēja, ka nav bijuši iesaistīti šādos projektos, un sniedza paskaidrojumus, kādi varētu būt potenciālie izaicinājumi un sekas šādu projektu finansēšanai. Kā viens no izaicinājumiem tika minēta šādu zinātnisko projektu izmaksu efektivitāte. Cits respondents norādīja, ka pētījumiem nepieciešamo ētikas atļauju saņemšana varētu aizņemt neproporcionāli lielu laiku salīdzinājumā ar projekta laika grafiku. Kā citi izaicinājumi tika norādīti tādi aspekti kā fakts, ka genomiski rediģētie organismi tiek pielīdzināti ĢMO, kā arī bažas par sabiedrības izpratnes un informācijas trūkumu, kā arī politikas attieksme pret šādu projektu nepieciešamību.

Uz 2. jautājumu, kā Jūs kopumā vērtējat ar jaunajām genoma rediģēšanas tehnoloģijām saistītās zinātnes attīstību, tika iegūtas septiņas atbildes. Viens respondents (14,29 %) norādīja, ka ir nepieciešama plašāka informācija, bet pārējie seši respondenti (85,71 %) pauda pozitīvu attieksmi, pieminot, viņaprāt, dažus veiksmīgus piemērus vēža ārstēšanā un cilvēka genoma rediģēšanā. Viens no respondentiem pauda viedokli, ka *“nozare turpinās attīstību un sabiedrības attieksme lēni, bet tiks mainīta par labu ĢMO produktiem”*. Viens respondents ar jaunām genoma rediģēšanas tehnoloģijās saistīto zinātņi raksturoja kā sfēru ar lielu izaugsmes potenciālu, piebilstot, ka *“diemžēl Latvijā/ES-13 valstīs ir salīdzinoši maza aktivitāte, un tas ir saistīts ar zinātnes finansējumu/nelielu augsti attīstītu uzņēmumu skaitu”*.

Uz 3. jautājumu, vai Jūs esat jutis nepieciešamību pēc zinātnes, kas saistīta ar jaunajām genoma rediģēšanas tehnoloģijām, no privātajām vai publiskajām personām, tika iegūtas sešas atbildes, no kurām trīs respondenti (50 %) atbildēja noliedzoši. Pārējie pauda, ka ir jutuši nepieciešamību pēc zinātnes privātajā un publiskajā sektorā kā piemērus minot medicīnas nozari, ražīguma paaugstināšanas iespējas lauksaimniecībā, ĢMO klātbūtnes konstatēšanu paraugos, kā arī vispārīgu interesi.

Uz 4. jautājumu, vai jaunās genoma rediģēšanas tehnoloģijas varētu dod kādas iespējas un ieguvumus zinātnei, sabiedrībai un lauksaimniecības un pārtikas ražošanas sektoram, tika iegūtas 7 atbildes. Viens respondents atbildēja noliedzoši, pamatojot to ar zināšanu trūkumu, bet pārējie (85,71 %) atbildēja pozitīvi. Kā piemēri iespējām un ieguvumiem minētajos sektoros tika uzskaitīti tādi kā lētākas un efektīvākas tehnoloģijas, precīzāka selekcija, iespējamie pielietojuma veidi medicīnā un farmakoloģijā (gēnu terapija, cilvēka genoma uzlabošana, slimību vektoru izskaušana).

Uz 5. jautājumu, vai jaunās genoma rediģēšanas tehnoloģijas varētu radīt izaicinājumus un bažas zinātnei, sabiedrībai un lauksaimniecības un pārtikas ražošanas sektoram, tika iegūtas sešas atbildes. Visi respondenti saskatīja izaicinājumus un bažas minētajām nozarēm. Četri no respondentiem jeb 66.67 % pauda bažas attiecībā uz sabiedrības attieksmi, kas varētu būt negatīva, kā iemeslu minot izpratnes trūkumu. Viens no respondentiem pauda viedokli, ka sabiedrības attieksme varētu atstāt negatīvu iespaidu uz attiecīgo jauno produktu realizāciju tirgū. Viens respondents pamatoja savas bažas attiecībā uz sabiedrību ar piemēru par klasisko ĢMO pārtikas ķēdē, piebilstot, ka sabiedrības *“satraukums par pielietojumiem medicīnā nav novērots”*. Pārējo respondentu bažas bija saistītas ar to, ka genomiski rediģētus organismus varētu izplatīt bez atbilstošas kontroles, ka tie varētu izkonkurēt savvaļas augus, kā arī tika minētas teorētiskas bažas par jaunizveidoto īpašību pārmantojamību. Viens respondents norādīja, ka *“zinātnei un ražošanai nepieciešams pārveidot dažādus procesus un*

pielāgot rīcības modeļus". Viens respondents pieminēja faktu, ka jaunās genoma rediģēšanas tehnoloģijas ES tiek pielīdzinātas ĢMO.

Informācija par dialogu ar sabiedrību un nacionālie pētījumi

Uz 6. jautājumu, vai Jūsu vai kāda cita institūcija/organizācija ir organizējusi nacionāla līmeņa dialogu saistībā ar jaunajām genoma rediģēšanas tehnoloģijām, tika saņemtas trīs respondentu atbildes. Viens respondents atbildēja, ka ir organizēti semināri ar dažādu sabiedrības grupu un ekspertu iesaisti, bet neaprakstīja saturu, metodoloģiju un secinājumus. Pārējie divi respondenti atbildēja noliedzoši un, ka nekas nav zināms par šāda veida dialogiem.

Uz 7. jautājumu, vai Jūsu vai kāda cita institūcija/organizācija ir organizējusi nacionāla līmeņa pētījumus saistībā ar sabiedrības viedokli par jaunajām genoma rediģēšanas tehnoloģijām, tika saņemtas trīs respondentu atbildes – visas noliedzošas.

Informācija par potenciālām iespējām un ieguvumiem no jaunajām genoma rediģēšanas tehnoloģijām un to produktiem

Uz 8. jautājumu, vai jaunās genoma rediģēšanas tehnoloģijas un to produkti varētu dod kādas iespējas un ieguvumus lauksaimniecības un pārtikas ražošanas sektoram, medicīnas vai ražošanas sektoram, tika iegūtas septiņas respondentu atbildes. Pieci respondenti (71,43 %) norādīja uz pozitīviem ieguvumiem lauksaimniecības un pārtikas ražošanas sektoros, kas bija saistīti ar precīzāku un ātrāku selekciju, kultūraugu izturību pret herbicīdiem, kaitēkļiem un slimībām, augstāku uzturvērtību, dažādu metabolītu ieguvu. Divi respondenti (28,57 %) norādīja uz potenciālām iespējām un ieguvumiem medicīnas sektorā – orgānu transplantācijā, infekcijas slimību apkarošanā, ģenētisko slimību ārstēšanā, zāļu ražošanā. Viens respondents (14,29 %) atbildēja noliedzoši, pamatojot to ar zināšanu trūkumu.

Uz 9. jautājumu, vai jaunās genoma rediģēšanas tehnoloģijas un to produkti varētu dod kādas iespējas un ieguvumus sabiedrībai kopumā, piemēram, videi, cilvēku, dzīvnieku un augu veselībai, kā arī sociālos un ekonomiskos ieguvumus (īsākā un garākā laika posmā), tika iegūtas septiņas atbildes. Viens respondents (14,29 %) atbildēja noliedzoši, nepaskaidrojot, kāpēc. Pārējie seši respondenti (85,71 %) sniedza pozitīvas atbildes. Divi respondenti (28,57 %) norādīja, ka jaunās genoma rediģēšanas tehnoloģijas un to produkti varētu palīdzēt slimības pārnēsājošu kukaiņu kontrolē, bet viens respondents (14,29 %) norādīja, ka tos varētu izmantot invazīvu sugu izskaušanai. Viens respondents (14,29 %) pieminēja slimību un kaitēkļu kontroli, sīkāk neprecizējot. Divi respondenti (28,57 %) pieminēja iespējamu pielietojumu cilvēku veselības jomā, viens respondents (14,29 %) – arī dzīvnieku veselības jomā. Viens no šiem respondentiem bija piebildis, ka manipulācijas ar cilvēka genomu būtu stingri jākontrolē, bet ne jāaptur, tika uzsvērtā nepieciešamība zinātnei attīstīties un sabiedrībai pielāgoties. Tika uzsvērts, ka iespējas un ieguvumi varētu būt tieši sociāli un

ekonomiski mazāk aizsargātajiem cilvēkiem. Viens respondents (14,29 %) norādīja, ka jaunās genoma rediģēšanas tehnoloģijas un to produkti ilgākā laika posmā varētu risināt izaicinājumu saistībā ar vides piesārņošanas problēmām. Viens respondents (14,29 %) norādīja, ka ar jaunām genoma rediģēšanas tehnoloģijām iegūtie produkti ir augstākas kvalitātes produkti. Viens respondents (14,29 %) norādīja, ja Eiropas Savienība neizvēlas šos risinājumus komercializēt, to izdarīs citas valstis.

Uz 10. jautājumu, vai Jūs saskatāt konkrētas iespējas mazajiem un vidējiem uzņēmumiem saistībā ar piekļuvi jaunajām genoma rediģēšanas tehnoloģijām, kopumā tika iegūtas sešas atbildes. Viens respondents (16,67 %) atbildēja pozitīvi, norādot, ka iespējas varētu būt bioinformātikas pakalpojumiem un lielo datu analīzei. Pieci respondenti (83,33 %) atbildēja noliedzoši. Viens respondents savu viedokli nepaskaidroja sīkāk. Divi respondenti kā iemeslus minēja šo tehnoloģiju dārdzību jeb resursu trūkumu, kā arī problēmas ar pieejamību šīm tehnoloģijām. Viens no šiem respondentiem paskaidroja, ka pieejamības problēmas saistītas ar patentiem un dažādām atļaujām, kas rada lielas papildus izmaksas. Viens respondents norādīja, ka ir *“grūti izkontrolēt šo tehnoloģiju darbības mērķus, lietošanu”*, bet viens norādīja, ka tās vēl nav pietiekami attīstījušās.

Uz 11. jautājumu, vai Jūs saskatāt kādas iespējas un ieguvumus no jauno genoma rediģēšanas tehnoloģiju un produktu patentēšanas vai piekļuves patentiem, tika iegūtas piecas atbildes. Četras atbildes (80,00 %) bija pārliecinoši pozitīvas, bet viens respondents atbildēja, ka iespējas un ieguvumi no jauno genoma rediģēšanas tehnoloģiju un produktu patentēšanas vai piekļuves patentiem varētu būt iespējami, bet nejūtas kompetents par to spriest. Viens respondents norādīja, ka iespējas un ieguvumi varētu būt saistīti ar jaunu produktu attīstību. Viens respondents detalizēti pamatoja savu viedokli attiecībā uz to, ka būtu nepieciešama atvieglota piekļuve patentiem bez iespējas pagarināt termiņus, lai netiktu kavēta zinātnes attīstība un tehnoloģiju monopolizēšana.

Informācija par potenciāliem izaicinājumiem un bažām saistībā ar produktiem, kas iegūti, izmantojot jaunās genoma rediģēšanas tehnoloģijas

Uz 12. jautājumu, vai jaunās genoma rediģēšanas tehnoloģijas un to produkti varētu radīt izaicinājumus un bažas lauksaimniecības un pārtikas sektoram, medicīnas vai ražošanas sektoram, tika iegūtas piecas atbildes. Visi respondenti (100 %) saskatīja kādus iespējamus izaicinājumus un bažas. Viens respondents norādīja, ka *“attiecīgi plānojot un ieviešot drošības testus, riskus var būtiski mazināt”*. Viens respondents bija norādījis, ka jaunie izaicinājumi būs *“jaunas kvalitātes prasības, procedūru pārveide un uzraudzība”*. Viens respondents bija paskaidrojis, ka izaicinājumi un bažas varētu būt saistīti ar *“gēnu pārmantojamību dabiskajos organismos”*. Viens respondents pamatoja savu viedokli ar to, ka ar laiku varētu parādīties tādi ĢMO, kurus būtu neiespējami atšķirt no dabiskiem mutantiem.

Uz 13. jautājumu, vai jaunās genoma rediģēšanas tehnoloģijas un to produkti varētu radīt izaicinājumus un bažas sabiedrībai kopumā, piemēram, videi, cilvēku, dzīvnieku un augu

veselībai, kā arī sociālos un ekonomiskos izaicinājumus (īsākā un garākā laika posmā), tika iegūtas piecas atbildes. Visi respondenti uz šo jautājumu atbildēja apstiprinoši. Viens respondents nebija sīkāk pamatojis savu viedokli, bet viens respondents bija norādījis, ka modifikācijas, kuras nāktu par labu cilvēkam, potenciāli varētu atstāt negatīvu ietekmi uz vidi. Vēl tika piebilsts, ka jaunās un dārgās tehnoloģijas varētu apgrūtināt mazu uzņēmumu radīšanu. Viens respondents pauda bažas, ka jaunie organismi varētu izkonkurēt dabiskos. Divi respondenti norādīja, ka izaicinājumi un bažas ir vairāk psiholoģiski vai saistīti ar informācijas trūkumu.

Uz 14. jautājumu, vai Jūs saskatāt konkrētus izaicinājumus mazajiem un vidējiem uzņēmumiem saistībā ar piekļuvi jaunajām genoma rediģēšanas tehnoloģijām, tika iegūtas piecas atbildes. Viens respondents (20 %) atbildēja noliedzoši, paskaidrojot, ka ražošanas procesā nonāks gatavi protokoli. Četri respondenti (80 %) atbildēja, ka saskata izaicinājumus mazajiem un vidējiem uzņēmumiem saistībā ar šīm tehnoloģijām. Viens respondents nesniedza sīkākus paskaidrojumus, bet trīs respondenti minēja tādus nosacījumu kā resursu pieejamība, augstas izmaksas komercializācijas gadījumā, genoma rediģēšanas tehnoloģiju dārdzību, zinātniskās izpētes nepieciešamību, dažādu atļauju nepieciešamību, patentu dārdzību. Viens respondents norādīja, ka uzskaitītie nosacījumi samazinās mazu un vidēju uzņēmumu konkurences spējas.

Uz 15. jautājumu, vai Jūs saskatāt kādus izaicinājumus un bažas saistībā ar jauno genoma rediģēšanas tehnoloģiju un produktu patentēšanu vai piekļuvi patentiem, tika saņemtas piecu respondentu atbildes. Trīs respondenti (60 %) atbildēja apstiprinoši, ka viņi saskata izaicinājumus un bažas saistībā ar patentēšanu vai piekļuvi patentiem, kā piemērus minot, ka *“lielie uzņēmumi var radīt patentu monopolu, tādejādi, izspiežot no tirgus mazos uzņēmumus”*, nepārtrauktu tiesāšanos par svarīgākajiem patentiem, kā arī resursu pieejamību un izmaksas. Divi respondenti (40 %) atbildēja, ka nesaskata izaicinājumus un bažas saistībā ar patentēšanu vai piekļuvi patentiem. Viens no respondentiem nepaskaidroja savu atbildi, bet otrs norādīja, ka tas ir pie nosacījuma *“ja būs saprotamāka sistēma”*.

Uz 16. jautājumu, vai Jums ir vēl kādi komentāri, tika iegūta viena atbilde, ka kopumā ir grūti komentēt iesniegtās atbildes, jo trūkst informācijas, līdz ar to paustais viedoklis ir balstīts uz stereotipiem.

6. pielikums. Respondentu atbilžu apkopojums

Aptaujas anketa par genoma rediģēšanas tehnoloģijām

Kopējais respondentu skaits – 7.

Zinātne un inovācijas

1. Vai pēdējo piecu gadu laikā esat bijis iesaistīts ar nacionālo finansējumu finansētos projektos, kas bijuši saistīti ar jaunajām genoma rediģēšanas tehnoloģijām?
 - Ja jā, lūdzu norādiet projekta nosaukumu un norādes, kur iespējams atrast informāciju par šo projektu:
Respondentu atbildes – 0.
 - Ja nē, lūdzu norādiet, kādi varētu būt potenciālie izaicinājumi un sekas šādu projektu finansēšanai:
Respondentu atbildes – 5.
 - 1.Potenciāls izaicinājums varētu būt izmaksas. Atkarībā no projekta sekas var būt, ka kaut ko jaunu atklājam vai neatklājam, līdz ar to projekts sevi atpelna vai neatpelna, vai ir lietderīgi ieguldīti valsts līdzekļi.**
 - 2.Tiek pielīdzināti ĢMO likumiem.**
 - 3.Sabiedrības izpratnes veicināšana.**
 - 4.Ētikas komisijas pozitīvu atzinumu iegūšana laikā, kas samērojams ar projekta ieviešanu. Var aizņemt daudz laika/resursu.**
 - 5.Informācijas trūkums, politikas attieksme pret nepieciešamību.**
2. Kā Jūs kopumā vērtējat ar jaunajām genoma rediģēšanas tehnoloģijām saistītās zinātnes attīstību?
Respondentu atbildes – 7.
 - 1.Genoma rediģēšanas tehnoloģijas attīstās aizvien straujāk, liels solis bija *CRISPR* atklāšana. Ar šo metodi jau ir veiksmīgi veikta gēnu editēšana vēža pacientiem. Kā arī nevar nepieminēt gēnu editēšanas gadījumu Ķīnā, kas, manuprāt, ir veiksmīgs sasniegums.**
 - 2.Pozitīvi, manuprāt, nozare turpinās attīstību un sabiedrības attieksme lēni, bet tiks mainīta par labu ĢMO produktiem.**
 - 3.Nepieciešama plašāka informācija.**
 - 4.Kopumā vērtēju pozitīvi.**
 - 5.Joma ar lielu izaugsmes potenciālu. Diemžēl Latvijā/ES-13 valstīs salīdzinoši maza aktivitāte. Saistīts ar zinātnes finansējumu/nelielu augsti attīstītu uzņēmumu skaitu.**

6. Pozitīvi.

7. Ļoti labi. Eksperti ir zinoši un ar labu praktisko pieredzi.

3. Vai Jūs esat jutis nepieciešamību pēc zinātnes, kas saistīta ar jaunajām genoma rediģēšanas tehnoloģijām, no privātajām vai publiskajām personām?

Ja jā, lūdzu precizējiet, kādas tieši vajadzības esat konstatējis?

Respondentu atbildes – 6.

1. Jā, bet tas gandrīz vienmēr ir bijis saistīts ar medicīnas nozari; ir bijušas diskusijas par produkcijas palielināšanas iespējām lauksaimniecībā.

2. ĢMO klātbūtnes konstatēšana kontroles paraugos.

3. Nē, neesmu jutis.

4. Vispārīga interese bez tālākas attīstības. Tas atbilst tautsaimniecības struktūrai.

5. Nē

6. Nē.

4. Vai jaunās genoma rediģēšanas tehnoloģijas varētu dod kādas iespējas un ieguvumus zinātnei, sabiedrībai un lauksaimniecības un pārtikas ražošanas sektoram?

- Ja jā, lūdzu norādiet konkrētus piemērus:

Respondentu atbildes – 6.

1. Jā, attīstoties tehnoloģijām, palielinās rediģēšanas iespējas, ne tikai zinātnei, bet visiem kopumā. Kā arī, tehnoloģijai attīstoties, tā kļūst lētāka, līdz ar to pieejamāka. Kādreiz izmantoja ZFN un Talen, bet tagad plaši lieto *CRISPR-Cas9* metodi, kā arī pamazām attīstās arī citas metodes.

2. Eļļa ar samazinātu holesterolu.

3. Iespējas efektīvizēt procesus, uzlabot produkciju, potenciāli nākotnē uzlabot arī cilvēku genomu.

4. Domāju, ka pozitīvāki ieguvumi sabiedrībai ir medicīnā, farmakoloģijā.

5. Ģēnu terapija medicīnā. ĢM augi, dzīvnieki u.c. pielietojumi (sterili odi malārijas apkarošanai utml.)

6. Precīzāka selekcija. Kvalitatīvākas lauksaimniecības biotehnoloģijas metodes.

- Ja nē, lūdzu paskaidrojiet, kāpēc?

Respondentu atbildes – 1.

1. Trūkst zināšanu.

5. Vai jaunās genoma rediģēšanas tehnoloģijas varētu radīt izaicinājumus un bažas zinātnei, sabiedrībai un lauksaimniecības un pārtikas ražošanas sektoram?

Ja jā, lūdzu norādiet konkrētus piemērus:

Respondentu atbildes – 6.

1. Spilgts piemērs būtu Ķīna, kur He Jiankui editēja cilvēka genomu. Tas parāda to, ka jaunās genoma rediģēšanas tehnoloģijas kļūst pieejamākas. Kā redzams pamazām tuvojamies situācijai, kad kāda privātā laboratorija pēc kāda klienta vēlmēm varētu nekontrolēti izveidot organismu ar rediģētu genomu un palaist savvaļā, piemēram,

komerciāliem nolūkiem izveidot izturīgāku, ražīgāku rīsu šķirni, kuru bez pārbaudēm varētu audzēt un pārdot.

2. Vai ĢMO neizkonkurēs savvaļas sugas? Sabiedrības attieksme varētu negatīvi ietekmēt pārdošanu.

3. Sabiedrībā trūkst izpratnes par zinātniskiem aspektiem. Zinātnei un ražošanai nepieciešams pārveidot dažādus procesus un pielāgot rīcības modeļus.

4. Bažas sabiedrībā rada iespējamās sekas, kuras nākotnē nevar vēl paredzēt.

5. Bažas sabiedrībai, laba ilustrācija ĢMO pārtikas ķēdē. Satraukums par pielietojumiem medicīnā nav novērots.

6. Jā! Teorētiskas par pārmantojamību. Mutaģenēze EU ir ĢMO.

Ja nē, lūdzu paskaidrojiet, kāpēc?

Respondentu atbildes – 0.

Informācija par dialogu ar sabiedrību un nacionālie pētījumi

6. Vai Jūsu vai kāda cita institūcija/organizācija ir organizējusi nacionāla līmeņa dialogu saistībā ar jaunajām genoma rediģēšanas tehnoloģijām?

Ja jā, lūdzu īsi aprakstiet saturu, metodoloģiju un secinājumus!

Respondentu atbildes – 3.

1. Nē.

2. Semināri ar dažādu sabiedrības grupu un ekspertu iesaisti.

3. Nav zināms.

7. Vai Jūsu vai kāda cita institūcija/organizācija ir organizējusi nacionāla līmeņa pētījumus saistībā ar sabiedrības viedokli par jaunajām genoma rediģēšanas tehnoloģijām?

Ja jā, lūdzu īsi aprakstiet saturu, metodoloģiju un secinājumus!

Respondentu atbildes – 3.

1. Nē.

2. Nē, personiski neesmu bijis iesaistīts.

3. Nē.

Informācija par potenciālām iespējām un ieguvumiem no jaunajām genoma rediģēšanas tehnoloģijām un to produktiem

8. Vai jaunās genoma rediģēšanas tehnoloģijas un to produkti varētu dod kādas iespējas un ieguvumus lauksaimniecības un pārtikas ražošanas sektoram, medicīnas vai ražošanas sektoram?

Ja jā, lūdzu norādiet konkrētus piemērus:

Respondentu atbildes – 6.

1. Protams. Pārtikā iespēja vieglāk izaudzēt augļus/dārzenus ar paaugstinātu aizsardzību pret herbicīdiem, kaitēkļiem, augu slimībām. Modificējot organismu metaboliskos ceļus var lētāk un vieglāk iegūt dažādus ķīmiskus savienojumus (piemērs: humulīna ražošana *E. coli* baktērijās).

2. Jā, uzlaboti produkti ar augstām uzturvērtībām.

3. Slimību un kaitēkļu kontrolēšana.

4. Iespējas varētu būt medicīnā orgānu transplantācijā, infekcijas slimību apkarošanā, zāļu ražošanā.

5. Jā, daudzus, gan medicīnā, gan lauksaimniecībā. Ģenētisko slimību ārstēšana (somatiskās šūnas), ar potenciālu koriģēt embrija līmeni. Ātrāks jaunu šķirņu izveidošanas laiks.

6. Precīzākas metodes, ātrāks selekcijas process.

Ja nē, lūdzu paskaidrojiet, kāpēc?

Respondentu atbildes – 1.

1. Trūkst zināšanu.

9. Vai jaunās genoma rediģēšanas tehnoloģijas un to produkti varētu dod kādas iespējas un ieguvumus sabiedrībai kopumā, piemēram, videi, cilvēku, dzīvnieku un augu veselībai, kā arī sociālos un ekonomiskos ieguvumus (īsākā un garākā laika posmā)?

Ja jā, lūdzu norādiet konkrētus piemērus:

Respondentu atbildes – 6.

1. Varētu iznīcināt slimību pārnēsājošus kaitēkļus, piemēram, *Aedes aegypti* odus (Zika). Tas dotu ieguvumu labumu cilvēku veselībai un uzlabotu vidi sociāli un ekonomiski mazāk aizsargātajiem cilvēkiem. Arī uzlabojot rīsus, lai sintezētu karotīnu graudos varētu iegūt labumu sociāli un ekonomiski mazāk aizsargātajiem cilvēkiem. Arī cilvēkiem rediģējot genomu var panākt ieguvumu cilvēku populācijai, piemērs, Lulu un Nana dvīnēm He Jiankui izmainīja genomu, papildinot to ar HIV rezistanci. Cilvēka manipulācijas būtu nepieciešamas stingrāk kontrolēt, taču nekādā gadījumā neapturēt, zinātnei jāiet uz priekšu un sabiedrībai jāpielāgojas.

2. Jā, malārijas odu un invazīvu sugu izskaušana.

3. Slimību un kaitēkļu kontrole.

4. Sabiedrībai kopā varētu dot labumus īsākā laika posmā cilvēku un dzīvnieku veselībai. Ilgākā laika posmā varētu risināt izaicinājumus saistībā ar vides piesārņošanas problēmām.

5. Ja Eiropas Savienība neizvēlas šos risinājumus komercializēt, to izdarīs citas valstis.

6. Augstākas kvalitātes produkti.

Ja nē, lūdzu paskaidrojiet, kāpēc?

Respondentu atbildes – 1.

1. Nē.

10. Vai Jūs saskatāt konkrētas iespējas mazajiem un vidējiem uzņēmumiem saistībā ar piekļuvi jaunajām genoma rediģēšanas tehnoloģijām?

Ja jā, lūdzu paskaidrojiet, pie kādiem nosacījumiem:

Respondentu atbildes – 1.

1. Bioinformātikas pakalpojumi, lielo datu analīze.

Ja nē, lūdzu paskaidrojiet, kāpēc?

Respondentu atbildes – 5.

1. Manuprāt, pašreiz genoma rediģēšanas tehnoloģijas ir dārgas. Jāveic zinātniskā izpēte, jāiegūst dažādas atļaujas, papildus vēl „patentu mūris”. Tas viss ir laikietilpīgi, kas rada lielas izmaksas, līdz ar to piekļuve ir ļoti limitēta.

2. Resursu trūkums, pieejamība.

3. Grūti izkontrolēt darbības mērķus, lietošanu.

4. Nē.

5. Tās vēl nav tā attīstījušās.

11. Vai Jūs saskatāt kādas iespējas un ieguvumus no jauno genoma rediģēšanas tehnoloģiju un produktu patentēšanas vai piekļuves patentiem?

Ja jā, lūdzu norādiet konkrētus piemērus:

Respondentu atbildes – 5.

1. Saskatu ieguvumus, ja tiktu atvieglota piekļuve patentiem, piemēram, pēc noteikta laika, atklājumu drīkstētu lietot visi, nevis patenta īpašnieks ik pēc laika pagarina patenta neizskaramību gandrīz bezgalīgi. Manuprāt, patentiem jābūt ar stingri noteiktu termiņu bez jebkādam iespējam pagarināt, tādejādi netiktu bremsēta zinātne, kā arī patenta īpašnieku tas mudinātu domāt kreatīvi un skatīties uz priekšu, lai netiktu radīta situācija, kad tiek monopolizēta kāda tehnoloģija ar kuru var labi pelnīt, ieguldot tikai nedaudz ar mērķi pagarināt patenta licenci, bez mērķa atklāt ko jaunu.

2. Jaunu produktu attīstība.

3. Jā, noteikti.

4. Jā.

5. Iespējams. Neesmu kompetenta spriest.

Ja nē, lūdzu paskaidrojiet, kāpēc?

Respondentu atbildes – 0.

Informācija par potenciāliem izaicinājumiem un bažām saistībā ar produktiem, kas iegūti, izmantojot jaunās genoma rediģēšanas tehnoloģijas

12. Vai jaunās genoma rediģēšanas tehnoloģijas un to produkti varētu radīt izaicinājumus un bažas lauksaimniecības un pārtikas sektoram, medicīnas vai ražošanas sektoram?

Ja jā, lūdzu norādiet konkrētus piemērus:

Respondentu atbildes – 5.

1. Varētu. Piemēram, patreiz Crispr metodei ir nepieciešama PAM sekvenca, ja ar laiku parādītos tehnoloģija, kura pēc sevis neatstāj nekādu nospiedumu, varētu ar laiku parādīties ĢMO, kurus nevarētu atšķirt no dabiskiem mutantiem.

2. Jaunas kvalitātes prasības, procedūru pārveide, uzraudzība.

3. Attiecīgi plānot un ieviešot drošības testus, riskus var būtiski mazināt.

4.Jā.

5.Gēnu pārmantojamība dabiskajos organismos.

Ja nē, lūdzu paskaidrojiet, kāpēc?

Respondentu atbildes – 0.

13. Vai jaunās genoma rediģēšanas tehnoloģijas un to produkti varētu radīt izaicinājumus un bažas sabiedrībai kopumā, piemēram, videi, cilvēku, dzīvnieku un augu veselībai, kā arī sociālos un ekonomiskos izaicinājumus (īsākā un garākā laika posmā)?

Ja jā, lūdzu norādiet konkrētus piemērus:

Respondentu atbildes – 5.

1.Jaunās tehnoloģijas paver daudz jaunu iespēju, piemēram, izveidot ģenētiski modificētus moskītus ar mērķi samazināt moskītu populāciju, kas pārnēsā dažādas slimības, tai skaitā Zika vīrusu. Šāda modifikācija nāktu par labu cilvēkam, taču nav skaidrs kādu iespaidu tas atstātu uz vidi. Runājot par sociālo sfēru tad nevienlīdzība ir pastāvējusi visos laikos un pastāv joprojām. Šajā gadījumā vairāk būtu bažas, cik lielā mērā ļoti dārgas tehnoloģijas apgrūtinātu mazu uzņēmumu radīšanu.

2.Informācijas trūkuma radīti izaicinājumi.

3.Psiholoģiski vairāk nekā pēc būtības.

4.Jā.

5.Jaunie organismi “izspiedīs” dabiskos.

Ja nē, lūdzu paskaidrojiet, kāpēc?

Respondentu atbildes – 0.

14. Vai Jūs saskatāt konkrētus izaicinājumus mazajiem un vidējiem uzņēmumiem saistībā ar piekļuvi jaunajām genoma rediģēšanas tehnoloģijām?

Ja jā, lūdzu paskaidrojiet, pie kādiem nosacījumiem:

Respondentu atbildes – 4.

1.Manuprāt, pašreiz genoma rediģēšanas tehnoloģijas ir dārgas. Jāveic zinātniskā izpēte, jāiegūst dažādas atļaujas, papildus vēl „patentu mūris”. Tas viss ir laikietilpīgi, kas rada lielas izmaksas, līdz ar to piekļuve ir ļoti limitēta. Samazinās mazu un vidēju uzņēmumu spēja konkurēt.

2.Resursu pieejamība.

3.Salīdzinoši augstas izmaksas, ja plānota komercializācija.

4.Jā.

Ja nē, lūdzu paskaidrojiet, kāpēc?

Respondentu atbildes – 1.

1.Ražošanas procesā nonāks gatavi protokoli.

-
15. Vai Jūs saskatāt kādus izaicinājumus un bažas saistībā ar jauno genoma rediģēšanas tehnoloģiju un produktu patentēšanu vai piekļuvi patentiem?

Ja jā, lūdzu norādiet konkrētus piemērus:

Respondentu atbildes – 3.

1.Lielie uzņēmumi var radīt patentu monopolu, tādejādi, izspiežot no tirgus mazos uzņēmumus.

2.Resursu pieejamība, izmaksas.

3.Nepārtraukta tiesāšanās par atslēgas patentiem.

Ja nē, lūdzu paskaidrojiet, kāpēc?

Respondentu atbildes – 2.

1.Nē.

2.Ja būs saprotamāka sistēma.

16. Vai Jums ir vēl kādi komentāri?

Respondentu atbildes – 1.

1.Grūti komentēt atbildes, jo trūkst zināšanu. Viedoklis balstīts uz stereotipiem.