

# **Naujų genetinės modifikacijos metodų ar būdų analizė**

UAB „Caszyme“

Įmonės kodas: 304532644

Adresas: Saulėtekio al. 7C, Vilnius, Lietuva

Kontaktai: +37069400210, [info@caszyme.com](mailto:info@caszyme.com)

Vilnius, 2019

## Turinys:

1. Įvadinė dalis.....	3
2. NGMM apibrėžimų – terminų aprašymas .....	5
3. Kokie metodai ar būdai yra laikomi NGMM bei jų aprašymas .....	8
3.1 NGMM apibrėžimas ir metodų klasifikacija.....	8
3.2 Genomo DNR sekos modifikavimas.....	9
3.3 Epigenetiniai metodai.....	14
3.4 Kiti metodai.....	15
4. Galima rizika aplinkai ir žmonių sveikatai naudojant NGMM .....	17
4.1 Pašaliniai NGMM efektai.....	18
4.2 Greitesnis naujų rūšių išvedimas.....	19
5. Koku tikslu gali būti naudojami NGMM .....	21
5.1 Derlingumo padidinimas .....	22
5.2 Atsparumas ligoms.....	22
5.3 Prisitaikymas prie aplinkos .....	23
5.4 Atsparumas herbicidams .....	23
5.5 Pagerintos maistinės savybės .....	24
5.6 Galimas NGMM pritaikymas Lietuvoje .....	25
6. NGMM Lietuvoje ir pasaulyje .....	26
7. Siūlomas NGMM reglamentavimas Lietuvoje.....	27
8. Išvados ir rekomendacijos .....	28
9. Literatūros sąrašas .....	30

## 1. Įvadinė dalis

Naujų inovatyvių metodų panaudojimas žemės ūkyje, medicinoje ir kitose srityse yra būtinas žmonijai susiduriant su globaliais iššūkiais, tokiais kaip žmonių populiacijos augimas ir klimato kaita. Siekiant patenkinti didėjančius žmonijos poreikius bei išsaugoti gamtą ir bioįvairovę būtina kuo efektyviau panaudoti dirbamos žemės plotus, vandenį ir kitus resursus. Skaičiuojama, kad norit patenkinti augančios žmonių populiacijos poreikius žemės ūkio produkcijos apimtys tarp 2000 metų ir 2050 metų turės išaugti daugiau kaip 2 kartus (1). Taip pat didėja ir sveikesnio, praturtinto naudingomis mitybinėmis medžiagomis maisto paklausa. Tam, kad šios problemos būtų išspręstos, kultūrinės augalų veislės turėtų įgyti naujas savybes, leidžiančias apsisaugoti nuo ligų, konkuruoti su piktžolėmis ir prisitaikyti prie kintančių aplinkos sąlygų (pvz., sausrų, šalnų). Iki šiol žemės ūkio pramonė sugebėjo patenkinti žmonijos poreikius bei lūkesčius, tačiau tam, kad pasiruoštume ateities iššūkiams, būtina pasitelkti naujų genetinės modifikacijos metodų (toliau - NGMM) suteikiamus privalumus, sukuriant naujas kultūrinių augalų veisles. NGMM ištrina ribas tarp natūralių ir dirbtinai įvedamų mutacijų ir, nors tai turi savų privalumų, visame pasaulyje kyla papildomų iššūkių reguliuojant jų panaudojimą (2).

Europos Sąjungos (toliau –ES) įstatyminė bazė reguliuojanti genetiškai modifikuotus organizmus (toliau - GMO), kilusi iš sprendimų priimtų dar 1990 metais. Nuo tada GMO reguliuojantys teisės aktai buvo taisomi, tačiau pats GMO apibrėžimas iš nekito, nors per tą laiką buvo pademonstruota, kad mutacijos organizmo DNR atsiranda ir natūraliais būdais (3). Šiuo metu GMO reguliavimas Europos Sąjungoje remiasi Europos Parlamento ir Tarybos direktyva 2001/18/EB dėl genetiškai modifikuotų organizmų apgalvoto išleidimo į aplinką ir panaikinanti Tarybos direktyvą 90/220/EEB (toliau - 2001/18/EB direktyva). Per pastaruosius metus buvo sukurta naujų biotechnologijomis grįstų metodų, kuriems taikant 2001/18/EB direktyvą kyla daug sunkumų. Pavyzdžiui, NGMM sukurtų veislių yra neįmanoma atskirti nuo išvestų tradiciniais metodais. ES prekybos partnerės JAV, Kanada, Japonija ir Australija apsisprendė NGMM pagalba sukurtų produktų nereguliuoti arba reguliuoti supaprastinta tvarka (4). Kinija ir Rusija investuoja dideles lėšas naujų veislių sukūrimui (5, 6). Tuo tarpu ES atveju, po 2018 metų liepos 25 d. ES teisingumo teismo sprendimo, visi modifikuoti organizmai, išskyrus gautus tradicinės mutagenezės metodais, bus laikomi GMO (7). Atsižvelgiant į skirtingą NGMM traktavimą ir reglamentavimą, labai svarbu suprasti šių metodų principą, naudą ir galimas rizikas. Šioje apžvalgoje aptariami biotechnologiniai metodai, priskirtini prie NGMM, tokie kaip genomo

redagavimas, epigenomo redagavimas ir kiti. Aprašytas galimas jų poveikis sveikatai bei aplinkai, pateikiami pavyzdžiai, kokios savybės gali būti suteiktos augalams panaudojant NGMM. Apžvelgiami NGMM panaudojimo atvejai Lietuvoje ir Europoje bei reglamentavimo ypatumai kitose pasaulio šalyse. Galiausiai pateikiamos rekomendacijos NGMM reguliacijai Lietuvoje.

## 2. NGMM apibrėžimų – terminų aprašymas

**Agroinfiltracija** (angl. *agroinfiltration*) – metodas, leidžiantis į tam tikrą augalo dalių somatines ląsteles (pvz. lapų), pristatyti transgenus siekiant pagaminti tikslinį baltymą (8).

**Atsitiktinė mutagenėzė (tradicinė mutagenėzė)** (angl. *random mutagenesis, traditional mutagenesis*) - tai mutagenėzės rūšis, kai mutacijos į organizmo genomą įvedamos nekontroliuojamai ir atsitiktinėse vietose. Tokia mutagenėzė nėra specifinė. Pirmiausia organizmas yra tam tikrą laiką veikiamas mutagenais, o po to atrenkami individai su pageidaujamomis savybėmis. Mutagenai gali būti arba fiziniai (pvz., ultravioletinė spinduliuotė) arba cheminiai (pvz. alkilavimo agentai) (9).

**Bazių redagavimas** (angl. *base editing*) - tikslios mutagenėzės rūšis, leidžianti tikslingai pakeisti vieną bazių porą neįvedant dvigrandžio trūkio genomineje DNR (10).

**Cas9** (angl. *CRISPR associated protein 9*) - dažniausiai tikslinei mutagenėzei panaudojama DNR nukleazė, programuojama RNR pagalba (14, 15).

**Cinko pirštų nukleazės** (angl. *zinc finger nucleases, ZFN*) – cinko pirštų domenų pagrindu sukonstruotos dirbtinės taikiniui specifinės nukleazės (8).

**Cisgenėzė** (angl. *cisgenesis*) - tai organizmo genetinė modifikacija panaudojant geną iš giminingos ar tos pačios rūšies organizmo, su kuriuo modifikuojamas organizmas galėtų kryžmintis. Genas su supančiomis sekomis įstatomas tokia pat orientacija kaip donoriniame organizme (3).

**CRISPR/Cas** (angl. *clustered regularly interspaced palindromic repeats/CRISPR associated*) – bakterijų ir archėjų apsaugos mechanizmas lemiantis įgytą imunitetą virusams. CRISPR/Cas sistemas sudaro CRISPR regionas, iš trumpų identiškų pasikartojimų tarp kurių yra įsiterpę viruso sekos -skirtukai, ir šalia koduojami Cas genai (11).

**Egzogeninis genas** (angl. *exogenous*) – genas kilęs iš kitos rūšies organizmo (9).

**Genetiškai modifikuotas organizmas (GMO)** – organizmas, išskyrus žmogų, kuriame genetinė medžiaga pakeista tokiu būdu, kuris paprastai nepasitaiko poruojantis ir (arba) natūralios rekombinacijos būdu (Lietuvos Respublikos genetiškai modifikuotų organizmų įstatymas).

**Genų redagavimas** (angl. *gene editing*) - grupė genų inžinerijos metodų, leidžiančių tiksliai ir tikslingai modifikuoti (pakeisti, iškirpti ar įstatyti DNR sekas) gyvų organizmų ar ląstelių genomus (9).

**Insercija arba delecija** (angl. *insertion, deletion*) – mutacijos rūšys, kai atitinkamai yra įterpiamas papildomas DNR sekos tarpas arba prarandamas esamos DNR sekos fragmentas (9).

**Intragenėzė** (angl. *intragenesis*) – tai organizmo genetinė modifikacija, kai įstatoma nauja DNR kombinacija (bet kuria orientacija), kurios elementai kilę iš to paties ar giminingo organizmo su kuriuo modifikuojamas organizmas galėtų kryžmintis (3).

**Mutagenėzė** (angl. *mutagenesis*) – procesas, kurio metu pasikeičia DNR seka. Gali būti atsitiktinė arba tikslinė (taikiniui specifinė) (9).

**Nauji geninės modifikacijos metodai** (NGMM, angl. *new plant breeding techniques, new mutagenesis techniques*) - biotechnologiniais metodais pagrįsti geninės modifikacijos metodai, sukurti po Europos Parlamento ir Tarybos 2001/18/EB direktyvos priėmimo (1–3, 7, 9).

**Nuo RNR priklausomas DNR metilinimas** (angl. *RNA-directed DNA methylation, RdDM*) - indukuojamas DNR citozino bazės metilinimas, kurio vietą apsprendžia RNR gidai. Gali veikti augaluose natūraliai esančiu RNR interferencijos keliu, arba panaudojant dirbtinius įrankius, kur dCas9 baltymas į norimą vietą nuneša DNR modifikacijos domeną (27, 28).

**Tikslinė mutagenėzė SDN-1** (angl. *site directed nucleases – 1*) – mutagenėzės taikiniui specifinėmis nukleazėmis tipas, pasižymintis tuo, kad sukeliama atsitiktinė mutacija tiksliai parinktoje genomo vietoje (2).

**Tikslinė mutagenėzė SDN-2** (angl. *site directed nucleases – 2*) - mutagenėzės taikiniui specifinėmis nukleazėmis tipas, leidžiantis į genomą įvesti konkrečią mutaciją specifinėje vietoje (2).

**Tikslinė mutagenezė SDN-3** (angl. *site directed nucleases – 3*)– mutagenezės taikiniui specifinėmis nukleazėmis tipas, leidžiantis į pasirinktą vietą genome įstatyti norimą DNR fragmentą (2).

**Oligonukleotidai** (angl. *oligonucleotides*) – trumpi RNR arba DNR nukleotidų fragmentai (8).

**Oligonukleotidais indukuota mutagenezė** (angl. *oligonucleotide-directed mutagenesis*, ODM) - tikslinės mutagenezės rūšis, kurią lemia trumpi viengrandžiai DNR oligonukleotidai, koduojantys mutaciją (8).

**Pašalinės mutacijos** (angl. *off-target mutations*)– neplanuotos mutacijos tikslios mutagenezės metu įvestos kitoje vietoje nei numatytas taikiny. Jos dažniausiai atsiranda į taikinį panašiose sekose. Jos gali būti tylios, tai yra nekeisti jokių požymių, nes įvyksta nekoduojančioje geno dalyje, arba nekeičia baltymo sekos (9).

**TALE nukleazės** (angl. *transcription activator-like effector nucleases*, TALEN) – transkripcijos aktyvatorių primenančių efektorių pagrindu sukonstruotos dirbtinės taikiniui specifinės nukleazės (8).

**Taškinė mutacija** (angl. *point mutation*) – mutacija lemianti tik vienos bazių poros pasikeitimą (9).

**Tikslinė mutagenezė (taikiniui specifinė mutagenezė)** (angl. *directed mutagenesis, site-specific mutagenesis*) - sąmoningas vieno ar kelių sekos pokyčių įvedimas į tikslią DNR vietą. Tikslinei mutagenezei dažniausiai panaudojami fermentai - taikiniui specifinės nukleazės (9).

**Transgenezė** (angl. *transgenesis*)– tai transgeninių organizmų sukūrimo metodai, kurie remiasi egzogeninio geno(ų) įstatymu į modifikuojamo organizmo genomą ir lemia transgeno perdavimą ateities kartoms (9).

### **3. Kokie metodai ar būdai yra laikomi NGMM bei jų aprašymas**

#### **3.1 NGMM apibrėžimas ir metodų klasifikacija**

NGMM yra laikomi biotechnologijomis pagrįsti genetinės modifikacijos (pvz., augalų veislių sukūrimo metodai), kurie buvo sukurti po Europos Parlamento ir Tarybos direktyvos 2001/18/EB dėl genetiškai modifikuotų organizmų apgalvoto išleidimo į aplinką panaikinanti Tarybos direktyvą 90/220/EEB priėmimo (1–3, 7, 9). NGMM leidžia tiksliai ir kontroliuojamai įvesti norimą mutaciją, todėl faktiškai ištrina ribas tarp natūraliai gautų ir dirbtinai įvestų genetinių modifikacijų. Net nustatčius visą modifikuoto augalo genomo DNR seką, be išankstinių žinių neįmanoma nustatyti, kad ji buvo tikslingai pakeista. Tai kelia rimtų iššūkių reguliuojančioms institucijoms.

Taip susiklostė, kad metodai priskiriami NGMM yra labai skirtingi, pats apibrėžimas labai platus ir kartais gali būti klaidinantis. Kai kurie metodai, tokie kaip genų redagavimas, yra naudojami ne tik augalų, bet ir gyvūnų DNR modifikavimui bei žmonių ligų gydymui. Tuo tarpu kiti metodai yra seniai naudojami (pvz., skiepijimas), tiesiog jie pritaikyti panaudojant naujausias biotechnologines žinias, todėl kyla klausimas kaip juos reguliuoti.

Šiuo metu sukurtus NGMM galima suskirstyti į tris grupes pagal tai, kas yra modifikuojama. Didžiausią grupę sudaro metodai, skirti tiksliai DNR sekos modifikavimui (genų redagavimui). Kita grupė veikia ne tiesiogiai DNR seką, bet DNR citozino bazės modifikavimo profilį (epigenomą). Ir galiausiai, dalis metodų tiesiogiai nepatenka nė į vieną grupę, jie panaudoja transgenus, neperduodamus palikuoniams. NGMM yra priskiriami šie metodai:

a) Metodai leidžiantys tikslų genomo redagavimą:

- Tikslinė mutagenėzė panaudojant taikiniui specifines nukleazes (angl. *site directed mutagenesis*, SDM);

- Bazių redagavimas;

- Tikslinė mutagenėzė panaudojant trumpus viengrandžius oligonukleotidus (angl. *oligo directed mutagenesis*, ODM);



- Cisgenezė ir intragenozė.

b) Epigenetiniai metodai:

- Genų raiškos kontroliavimas panaudojant nuo RNR priklausomą DNR modifikavimą (RdDM) ar nuo RNR priklausomą histonų modifikavimą.

c) Kiti metodai:

- Agroinfiltracija;

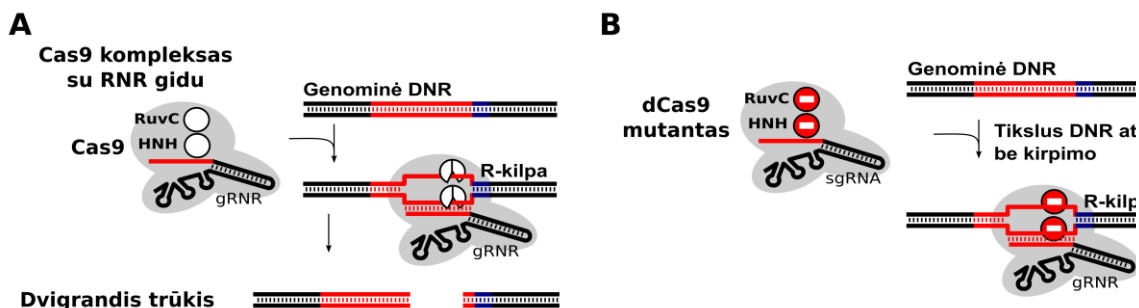
- Skiepijimas (nemodifikuoto daigo skiepijimas į genetiškai modifikuotą kamieną);

- Negatyvi selekcija (modifikuotų augalų nemodifikuoti palikuonys, kai modifikacija panaikinta selekcijos (segregacijos) būdu).

### **3.2 Genomo DNR sekos modifikavimas**

Genų redagavimo apibrėžimas apima metodus, kurie įgalina tiksloje vietoje modifikuoti genomines DNR sekas. Dažniausiai genų sekai tikslingai keisti naudojamas metodas remiasi taikiniui specifinėmis nukleazėmis (*angl.* site directed nucleases, toliau SDN). Šiuo metu yra naudojamos kelių tipų dirbtinės ir natūraliai randamos taikiniui specifinės nukleazės: cinko pirštų nukleazės (ZFN), TALE nukleazės, CRISPR-Cas nukleazės (Cas9). Dažniausiai naudojama tiksli DNR nukleazė vadinama Cas9 yra programuojama RNR pagalba (14, 15). Cas9 baltymas suriša mažą RNR molekulę (RNR gidą, arba gRNR) ir su ja sudaro stabilų kompleksą. Cas9 rišantis prie taikinio, DNR grandinės yra išskiriamos ir viena iš grandinių poruojasi su gRNA atitinkama seka, tuo tarpu kita grandinė yra išstumtama. Tokia susidariusi struktūra vadinama R-kilpa. Cas9 baltymas turi du atskirus aktyviuosius centrus, kurie perkerpa tiek išstumtąją, tiek suporuotąją su RNR DNR grandinę tiksloje vietoje (1A paveikslas). Tokiu būdu Cas9 galima gan greitai užprogramuoti įvesti dvigrandį trūkį į norimą genomines DNR vietą – tereikia pakeisti trumpą gRNR sekos fragmentą. Be to, Cas9 atpažįstama taikinio seka yra pakankamai ilga, kad visoje ląstelės genomineje DNR kirptų tik vieną kartą. Išjungus abu Cas9 baltymo aktyvius centrus gaunamas mutantinis fermentas (dCas9), kuris gali tiksliai užprogramuotoje vietoje jungtis prie DNR, bet jos nekirti (1B paveikslas). Toks DNR specifiskai surišantis baltymas gali būti

panaudotas kaip įrankis kitiems domenams (pvz., DNR citozino metilazėms ir adenino deaminazėms) nunešti prie specifinės genominės DNR sekos (10, 16).



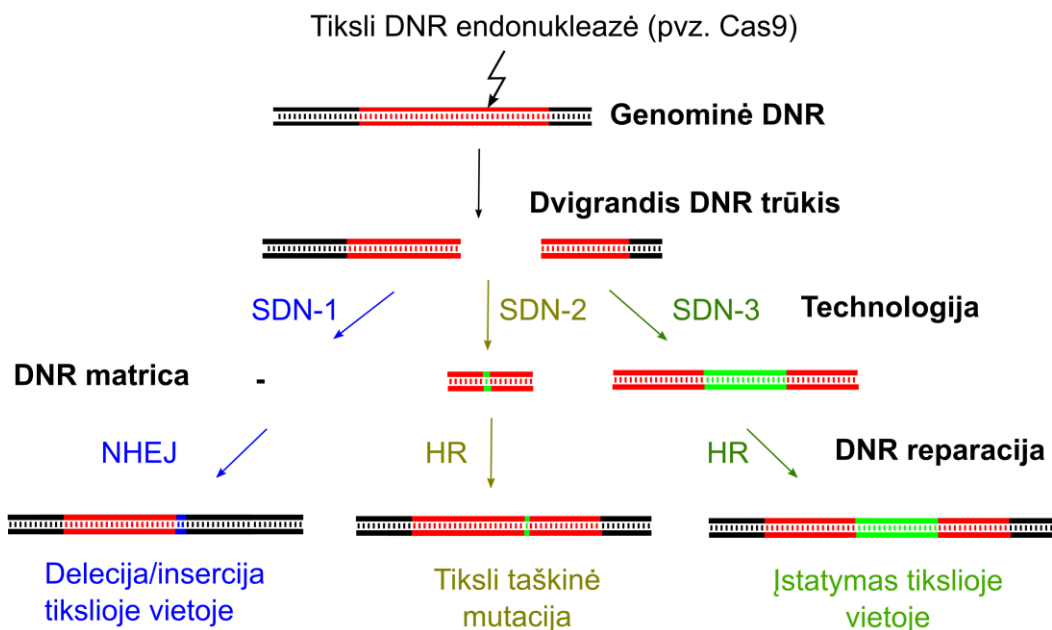
**1 paveikslas.** Cas9 baltymo DNR kirpimo mechanizmas. **A.** Cas9 baltymas - RNR pagalba programuojama DNR endonukleazė. **B.** Išjungus aktyvius abu Cas9 aktyvius centrus gaunamas baltymas dCas9, kuris veikia kaip DNR specifiskai surišantis baltymas (adaptuota pagal (17)).

Cinko pirštų nukleazės (angl. *zinc finger nucleases*, toliau ZFN) ir transkripcijos efektorius primenančios nukleazės (angl. *transcription activator like effector nucleases*, toliau TALEN) veikia kitu principu nei Cas9. Tai dirbtinės nukleazės, kurios turi už DNR sekos atpažinimą atsakingą modulinį domeną, prie kurio yra prilietas FokI restrikcijos endonukleazės nukleazinis domenai (18). Pirmą kartą ZFN buvo sukonstruotos dar 1996 m. (19). Cinko pirštai yra struktūrinis DNR motyvas, randamas daugelio organizmų transkripcijos veiksmuose. Motyvą sudaro dvi  $\alpha$  spiralės, primenančios pirštus, tarp kurių koordinuojamas cinko jonas. Toks motyvas atpažįsta 3 bazių porų ilgio DNR fragmentą (20). Sujungus kelis cinko pirštų motyvus į grandinę gaunamas ilgą DNR seką atpažįstantis domenai. Pasitelkus genų inžineriją buvo gauti motyvai, atpažįstantys beveik visas DNR bazių tripletų kombinacijas (20). Siekiant gauti DNR kerpančią fermentą prie tokio DNR atpažįstančio motyvo buvo prilietas FokI nukleazinis domenai. Jis ypatingas tuo, kad kerpa tik vieną DNR grandinę, o dvigrandės DNR perkirpimui reikalinga domeno dimerizacija. Todėl norint įvesti dvigrandį trūkį reikia dviejų ZFN, nukreiptų į gretimus taikinius priešingose DNR grandinėse tam, kad endonukleaziniai DNR domenai galėtų susijungti ir kirpti DNR (20). Nepaisant pasitvirtinusio molekulinio mechanizmo, ZFN užprogramavimas kirpti norimą seką trunka ilgai (keletą mėnesių), be to, pastebėta, kad šie dirbtiniai fermentai ne visada pasižymi geru efektyvumu ir specifiskumu – dažnai kerpa pašalines sekas ir tai sunku prognozuoti (17).

2009 metais augalų patogeninėse *Xanthomonas* bakterijose buvo rastas dar vienas modulinis DNR atpažinimo domenas, pavadintas transkripcijos aktyvatorius primenančiu efektoriumi (angl. *transcription activator like effector*, toliau TALE) (21, 22). Infekcijos metu bakterijos TALE baltymus išvirkščia į augalo ląsteles, kurie imituodami augalo transkripcijos faktorius jungiasi prie genų raišką reguliuojančių sekų - promotorių. Taip keičiama augalo baltymų raiška ir augalo ląsteles bakterija pasitelkia savo reikmėms. TALE domene už kiekvienos bazės atpažinimą atsakingas labai konservatyvus 34 aminorūgščių ilgio motyvas. Galima tik 12 ir 13 aminorūgšties variacija – jos tiesiogiai sąveikauja su DNR bazėmis atpažinimo metu. Kaip ir ZFN atveju, TALE domeną suliejus su FokI nukleaziniu domenu gautas veiksmingas fermentas dvigrandžiams DNR trūkiams norimoje vietoje įvesti – TALE nukleazę (TALEN) (23, 24) . Lyginant su ZFN, šis įrankis greičiau programuojamas (kelios savaitės) bei lengviau prognozuojamas, tačiau nėra patogus dėl savo dydžio ir prigimties – visi TALE motyvų sekos yra labai panašios tarpusavyje (17).

Tikslinės mutagenės metu endonukleazės panaudojamos dvigrandžio DNR trūkio įvedimui specifinėje genomo vietoje (2 paveikslas). Toks dvigrandis trūkis užtaisomas vieno iš natūralių ląstelės reparacijos mechanizmų - nehomologinio galų sujungimo (toliau NHEJ) arba homologinės rekombinacijos (toliau HR) pagalba. NHEJ mechanizmas nėra tikslus, todėl, kai DNR trūkis užtaisomas šio mechanizmo pagalba, kirpimo vietoje atsiranda mažų atsitiktinio ilgio delecijų ar insercijų. Tokia mutagenės rūšis, kuomet kontroliuojama mutacijos vieta, bet ne tipas, vadinama SDN-1 technologija. Šis kelias dažniausiai pasitelkiamas, kai norima išjungti geną, nes įvestos mutacijos pažeidžia baltymo kodą ir tokiu būdu nutraukia baltymo sintezę. Homologinė rekombinacija - tikslus dvigrandžių DNR trūkių pažeidimo užtaisymo kelias kuriam reikalinga matrica, atitinkanti perkirptąją DNR seką. Jei į tokią matricą kirpimo vietoje bus įstatyta papildoma seka, ji HR mechanizmo pagalba bus perkelta į genominę DNR. Tokiu būdu, kai kartu su taikiniui specifine nukleaze į ląstelę įvedama trumpa DNR matrica, koduojanti vienos ar kelių bazių porų pokytį, dvigrandis trūkis užtaisomas į kirpimo vietą įvedant tiksliai apibrėžtą mutaciją. Modifikacija įvedama ties nukleazės kirpimo vieta, o jos tipą apsprendžia pateikiamos DNR matricos seka. Šiuo būdu yra lengva prognozuoti modifikacijos rezultatus ir tokia technologija vadinama SDN-2 (2 paveikslas). Taikiniui specifinės nukleazės gali būti panaudojamos ir didesnio masto pokyčiams įvesti, pavyzdžiui, įstatyti geną – tai vadinama SDN-3 technologija. Tuomet DNR reparacijos matricoje įterpiama seka turi būti apsupta DNR sekomis, kurios būtų identiškos

modifikuojamo genomo sekoms. Ši technologija, kitaip nei tradiciniai transgeninių augalų gavimo būdai, leidžia naują seką įstatyti į tiksliai parinktą vietą (2 paveikslas). Šiuo keliu gali būti vykdoma ir transgenėzė bei cisgenėzė (žiūrėti aprašymą žemiau) (8).



**2 paveikslas.** Tikslinė mutagenėzė panaudojant DNR endonukleazes (pvz., Cas9). Taikiniui specifinė DNR nukleazė panaudojama dvigrandžiam trūkiui įvesti pasirinktoje genomo DNR vietoje. Priklausomai nuo to, koku keliu vyksta reparacija, galima išjungti geną (SDN-1 technologija), įvesti tiksliai taškinę mutaciją (SDN-2 technologija) arba įstatyti ilgą DNR seką (SDN-3 technologija).

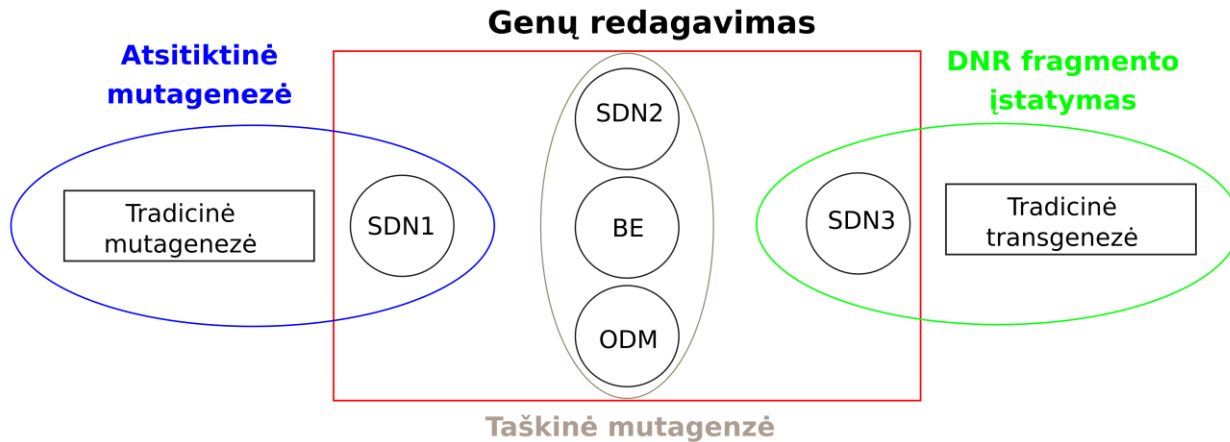
Naujausia taikiniui specifinės mutagenėzės rūšis – bazių redagavimas (angl. *base editing*), leidžiantis tikslingai pakeisti vieną bazių porą neįvedant dvigrandžio DNR trūkio (16, 25). Dėl šios priežasties jis laikomas saugesne alternatyva, nes pasižymi mažesne toksinio poveikio ir pašalinių mutacijų tikimybe. Ši mutagenėzės rūšis paremta fermentais deaminazėmis, kurios modifikuoja citozino arba adenino bazines viengrandėje DNR - pašalina amino funkcinę grupę. Taip citozinas pakeičiamas uracilu, kuris DNR replikacijos metu polimerazės yra skaitomas kaip timinas. Pašalinus amino funkcinę grupę iš adenino gaunamas inozinas kuris vykstant replikacijai yra skaitomas kaip guaninas. Tokiu būdu gali būti užprogramuotas citozino-guanino poros pakeitimas į timino-adenino porą, o adenino-timino poros į guanino-citozino. Deaminazės domeną suliejus su

katalitiškai neaktyviu Cas9 mutantu (dCas9) (1B paveikslas) jį galima tiksliai nukreipti į DNR bazių porą, kurią norima modifikuoti. dCas9 jungiasi prie DNR sudarydamas R-kilpą, kur viena DNR molekulė jungiasi su RNR gidu, o kita yra išstumtama. Dalis išstumtos viengrandės DNR lieka neapsaugota dCas9 baltymo ir ten esančios DNR bazės yra modifikuojamos deaminazės, sulietos su dCas9 (16, 25). Šis metodas ateityje gali būti pritaikytas įvesti daug taškinių mutacijų vienu metu (26).

Dar vienas būdas tikslingai įvesti mutacijas yra taikiniui specifinė mutagenė panaudojant trumpus viengrandžius oligonukleotidus (angl. *oligo directed mutagenesis*, ODM). Šiai tikslinės mutagenės rūšiai panaudojami sintetiniai oligonukleotidai – viengrandžiai DNR sekų fragmentai arba chimeriniai fragmentai iš DNR ir RNR bazių, kurie yra identiški (homologiški) taikinio sekai augalo genome. Tik vienas ar keli nukleotidai, esantys oligonukleotido centre, nesutampa su pirmine DNR seka – jie ir lemia mutaciją. Oligonukleotidai, nutaikyti į homologišką genomo seką, indukuoja specifinę lokalią sekos modifikaciją, panaudojant natūralų ląstelės reparacijos mechanizmą. Sukeliamas pokytis – tiksli taškinė mutacija, maža delecija ar insercija (8).

Cisgenė ir intragenė išskiriamos atskirai, nes į genomą įstatoma labai giminingo organizmo DNR, su kuriuo genetinės medžiagos perdavimas galėtų įvykti ir natūraliai. Šis mutagenės būdas neapibrėžia, koku metodu buvo įstatyta DNR. Cisgenė - tai organizmo genetinė modifikacija, kuriai panaudotas genas iš giminingos ar tos pačios rūšies organizmo, su kuriuo modifikuojamas organizmas galėtų kryžmintis. DNR įstatoma ta pačia orientacija nesukuriant naujų kombinacijų. Į sąvoką įeina intronai ir aplinkinės reguliacinės sekos (promotoriai, terminatoriai) įstatyti normalia orientacija. Cisgeniniai organizmai gali turėti vieną ar daugiau cisgenų, bet negali turėti jokių transgenų ar kitų svetimų DNR sekų (3). Tuo tarpu intragenė skiriasi tuo, kad yra įstatoma nauja DNR kombinacija bet kokia orientacija, kurios elementai kilę iš to paties ar giminingo organizmo. Tokia kombinacija taip pat galėtų atsirasti natūraliai dėl rekombinacijos dauginimosi metu (3).

Visi metodai, skirti genomo sekai modifikuoti, yra susiję ir iš esmės persidengia, jais galima gauti ir produktus būdingus tradicinei transgenezei, pavyzdžiui, taikiniui specifines nukleazes galima naudoti ne tik taškinėms mutacijoms įvesti, bet ir kitoms mutagenėms rūšims (cisgenezei ar transgenezei). O DNR pokyčius gaunamus tradicinės atsitiktinės mutagenės būdu, galima gauti ir tikslios mutagenės (genų redagavimo) pagalba (3 paveikslas).



**3 paveikslas. DNR modifikuojančių NGMM ir tradicinių mutagenėzės metodų skirtumai.**

SDN-1 metodas nuo tradicinių mutagenėzės metodų skiriasi tuo, kad modifikacija yra nutaikyta į tikslią vietą genome ir dažniausiai lemia geno išjungimą. Taikiniui specifinė nukleazė nurodo tikslią modifikacijos vietą, bet pats mutacijos tipas nėra apibrėžtas. SDN-2, ODM ir bazių redagavimo (BE) metodų atveju tiksliai apibrėžtos mutacijos įvedamos į tikslią vietą genome. SDN-3 metodas leidžia į tikslią vietą genome įstatyti norimą DNR fragmentą, tuo tarpu tradicinės transgenezės atveju transgenas įstatomas į atsitiktinę genomo vietą (adaptuota pagal (2)).

**3.3 Epigenetiniai metodai**

Epigenetiniai metodai, tokie kaip nuo RNR priklausomas DNR metilinimas arba nuo RNR priklausomas histonų modifikavimas, leidžia reguliuoti tam tikrų genų raišką (padidinti ar sumažinti) nepakeičiant DNR sekos. DNR bazių metilinimas labai svarbus genų raiškos reguliacijai ir yra paveldimas bent keliose kartose. DNR metilinimas taip pat glaudžiai susijęs su pagrindinių chromatino baltymų – histonų - modifikacijomis. Yra pademonstruota, kad DNR metilinimas lemia ir lokalias histonų modifikacijas, ir atvirkščiai - histonų modifikavimas tam tikroje vietoje gali lemti DNR metilinimą ar demetilinimą ir taip paveikti genų raišką bent keliose kartose, net kai modifikaciją lemiančio veiksnio, ląstelėse nebėra. DNR ar histonų modifikaciją norimoje vietoje galima sukelti panaudojant neseniai (1B paveikslas) sukurtus molekulinis įrankius, kuriuose prie dCas9 baltymo yra prijungtas DNR metilinimo arba histonus

modifikuojantis domenas (27, 28). Toks įrankis gali būti arba ekspresuojamas ląstelėje nuo laikinai pernešto transgeno arba pristatytas į ląstelę kaip baltymo-RNR kompleksas. Į tam tikras suaugusio augalo dalis įrankiai DNR bazėms modifikuoti taip pat gali būti pristatyti agroinfiltracijos būdu (2).

Istoriškai pats seniausias metodas genų raiškai augaluose nutildyti remiasi virusų sukeltu genų nutildymu (angl. *virus-induced gene silencing*, VIGS). Šis metodas veikia per augaluose natūraliai veikiančią RNR interferencijos mechanizmą. Jis remiasi tuo, jog į viruso genomą įstatoma seka, koduojanti RNR fragmentą kuris yra priešprasminis nepageidaujamo geno informacinei RNR. Augalo ląstelėje susidarančią dvigrandę RNR atpažįsta Dicer/Drosha ribonukleazės, kurios subrandina RNR gidą ir pateikia jį RISC kompleksui. Šis kompleksas panaudodamas RNR seką lemia specifinio geno nutildymą (12, 13)

### **3.4 Kiti metodai**

Likusi dalis metodų yra sunkiai suklasifikuojami, bet bent viena iš jų stadijų yra susijusi su biotechnologijomis. Agro-infiltracija yra metodas leidžiantis į tam tikrų augalo dalių somatinės ląsteles (pvz., lapus) pristatyti transgenus siekiant pagaminti rekombinantinį baltymą. Šis metodas tampa vienu iš svarbiausių kelių laikinai baltymų raiškai augaluose indukuoti, gaminant biologines medžiagas (29). Agro-infiltracijai naudojamos *Agrobacterium sp.* bakterijos, DNR plazmidiniame vektoriuje koduojančios transgeną. Suspensija su *Agrobacterium sp.* bakterijomis gali būti arba suleista į atskiras augalo dalis, arba pristatyta panaudojant vakuumą. Tam gali būti panaudojami gyvi augalai, atskiros augalų dalys (pvz., nuskinti lapai) arba augalų ląstelių kultūros. Jei agrobakterijų koduojamame vektoriuje yra tik transgenas, baltymo raiška gaunama tik lokalizuotoje augalo dalyje. Tačiau transgenas gali būti įstatytas į viruso DNR ir tokiu būdu plisti tarp ląstelių bei užkrėsti visą augalą. Tokiu atveju, transgenas būtų perduodamas ir palikuoniams (8).

Skiepijimas labai paplitęs sodininkystėje. Tai vieno augalo įskiepio perkėlimas ant kito augalo šaknų (poskiepio). Jei skiepijama į genetiškai modifikuota augalą (šaknis), tai iš esmės apjungiamas labai tradicinis sodininkystės metodas su transgeneze. Toks skiepijimas gali būti labai naudingas norint išnaudoti poskiepio gerąsias savybes, pavyzdžiui, pagerintos šaknys (atsparios ligoms, geresnis šaknijimasis ar vandens įsiurbimas). Įskiepis gali būti transformuotas panaudojant transgenezės, cisgenezės ar kitas technologijas. Tokio augalo sėklų genomo DNR neturėtų būti

modifikuotas, tačiau įskiepio ir poskiepio audiniai sąveikauja tarpusavyje ir tai gali turėti tam tikrų pavojų (8).

Negatyvi selekcija (segregacija) tai sudėtinis metodas, kuriam reikalingas transgeno įvedimas pradiniam etape. Vėlesniuose etapuose transgenas yra pašalinamas negatyvios selekcijos pagalba. Pavyzdžiui, galima į genomą įstatyti DNR sekas, lemiančias tam tikrų genų nutildymą nuo RNR priklausomo DNR metilinimo pagalba. Sekančiame žingsnyje naudojant atvirkštinę selekciją atrenkami palikuonys neturintys transgeno, tačiau DNR modifikavimo efektas išlieka keletui kartų (8).



## **4. Galima rizika aplinkai ir žmonių sveikatai naudojant NGMM**

Pastarąjį dešimtmetį tiek Europos Komisijos, tiek valstybių narių iniciatyva buvo atliktos kelios NGMM mokslinės analizės, kurie vertino ir galimas rizikas (1–3, 9, 30). Vertinant riziką dažniausiai atsižvelgiama į galimus modifikacijos keliamus pavojus ir jų atsitikimo tikimybę. Pagal 2001/18/EB direktyvą (priedas II) ir reglamentą (EB) Nr. 1829/2003, bet kurios potencialiai žalingos savybės kurios yra siejamos su genetiškai modifikuotu augalu, turi būti įvertintos lyginant tas charakteristikas su atitinkamu ne modifikuotu augalu. Statistiškai patikimų skirtumų biologinė prasmė toliau yra panaudojama sudaryti rizikos hipotezes, kurios turi būti patikrinamos tolimesniuose etapuose. Genetiškai modifikuotų augalų, skirtų maistui, rizika vertinama lyginant su ne modifikuotais augalais, kurių saugus vartojimas patvirtintas ilgalaikiai stebėjimais. Poveikio aplinkai rizikos vertinimas yra rekomenduojamas, bet kadangi negalima atsižvelgti į saugaus naudojimo istoriją, turėtų būti vertinamas rizikos dydis ir tikimybė. Kitaip tariant, genetiškai modifikuotų augalų charakteristikos ir jų keliamą grėsmę nėra tiesiogiai matuojamos, o vertinama labiau atsižvelgiant į aplinkos apsaugos tikslus. Poveikio analizė yra grįsta potencialiu pasėlių plotų bei produktų vartojimo įvertinimu, o šiuos kriterijus labai sunku vertinti iš anksto (2).

Pagal direktyvą 2001/18/EC (priedas II) potencialios rizikos aplinkai ir žmogaus sveikatai gali būti arba tiesioginės arba netiesioginės. Tiesioginės rizikos yra tos, kurias aplinkai ir žmonių sveikatai lemia GMO auginimas, bet ne kiti dėl to kylantys padariniai. Pavyzdžiui, jei dėl modifikacijos augalas pradėtų gaminti medžiagas kenkiančias žmonių sveikatai (nuodingas arba alergines), arba toks augalas dėl naujų savybių sugebėtų išstumti laukines augalų rūšis (30). Tuo tarpu netiesioginės rizikos yra tos kurios kyla dėl priežastinės grandinės, tokiais būdais kaip sąveika su kitais organizmais, genetinės medžiagos pernešimas, arba skirtingas vartojimas ar valdymas. Genetiškai modifikuotų augalų naujos savybės gali atsirasti dėl dviejų priežasčių, - dėl tikslinės modifikacijos, arba dėl naudotų metodų šalutinių efektų.

Vertinant NGMM riziką reikia papildomai atsižvelgti į savybes, kurios būdingos tik biotechnologija grįstiems metodams: i) molekulinio įrankio pristatymo į ląstelę būdas ar metodas (kai naudojamas); ii) faktas, kad modifikacija yra pasirenkama tikslingai; iii) keletas tikslingų mutacijų skirtinguose genuose gali būti įvedama vienu metu.

Bendrai NGMM rizikas gali suskirstyti į tris grupes (lentelė 1):

1. naudojamos technologijos pašaliniai efektai (pašalinės mutacijos arba įrankį koduojančio geno likimas ląstelėje);
2. rizikos susijusios su tuo, kad NGMM lems greitesnį naujų veislių atsiradimą;
3. rizikos dėl naujų savybių sukūrimo.

1 lentelė. NGMM rizikų apibendrinimas

Rizikos grupė	Rizikos veiksnys
Pašaliniai technologijos efektai	Pašalinės mutacijos
	Transgeno įsistatymas į genominę DNR
Greitesnis naujų veislių išvedimas	Socioekonominiai veiksniai
	Monopolizacija
	Kelių mutacijų įvedimas vienu metu
	Poveikis aplinkinei biologinei įvairovei
Naujos organizmų savybės	Nepriklauso nuo sukūrimo tipo, turi būti vertinama individualiai

#### 4.1 Pašaliniai NGMM efektai

Dėl savo prigimties daugelis iš NGMM gali turėti pašalinių efektų. Pirmiausia, įrankiai naudojami genomui modifikuoti gali būti ne visai tikslūs ir sukelti pašalinių mutacijų. Metodai, kurie naudoja baltymus kaip - molekulinis įrankis ne visada būna tikslūs. Kartais Cas9 baltymas gali prisijungti ir mažu efektyvumu kirpti sekas kurios nuo taikinio skiriasi iki 5 nukleotidų (15, 31, 32). Retais atvejais, ypač jei genomus perkerpamas iš karto su dvejomis nukleazėmis, tai gali lemti genomo persitvarkymus ar didelių delecijų atsiradimą (33, 34). Pašaliniai kirpimai būdingi ir kitoms tikslioms nukleazėms (TALEN, ZFN) (35, 36), bei įrankiams, kurie remiasi Cas9

baltymu su išjungta DNR kirpimo funkcija (pvz. bazių redagavimo technologija) (37, 38). Reikia paminėti, kad tradicinės mutagenezės metu organizmo genetinę medžiagą veikiant cheminiais mutagenais ar apšvitinant radiacija yra įvedama daugybė nekontroliuojamų mutacijų. Palyginus, NGMM pašalinių mutacijų sukeliama rizika yra minimali ir jų dažnis nedaug viršija natūralių mutacijų, įvykstančių augalų lytinėse ląstelėse, dažnį (2). Molekuliniai įrankiai, tokie kaip Cas9, yra intensyviai tobulinami ir tampa vis saugesni (39–41). Be to, yra pastebėta, kad pašalinių kirpimų kiekis padidėja dėl pastovios ir didelės Cas9 raiškos ląstelėse, kai įrankis pristatomas kaip DNR kasetė. Metodai, leidžiantys kontroliuoti Cas9 dozę ląstelėje, tokie kaip tiesioginis baltymo-RNR komplekso pristatymas į ląstelę ir komponentų kiekio optimizacija, padidina technologijos tikslumą (42).

Dauguma NGMM reikalauja į ląstelę pristatyti molekulinį įrankį – baltymą arba baltymo-RNR kompleksą. Įrankis į ląstelę gali būti pristatomas viena iš šių formų: koduojanti DNR ar RNR arba baltymas. Jei kaip vektorius naudojama DNR, yra nedidelė tikimybė, kad ji bus įstatyta į genomą ir tokiu būdu būtų gaunamas transgeninis organizmas. Norint išvengti šios rizikos rekomenduojama patikrinti, ar į ląstelę pristatyto molekulinio įrankio genas buvo sunaikintas ir neįsistatė į genomą, tai yra ar organizmas netapo transgeniniu (2).

Pašalinių efektų gali turėti ir tokie metodai kaip agroinfiltracija ar skiepijimas ant GMO šaknų. Agroinfiltracijos atveju yra rizika, kad transgenas pateks į augalo lytines ląsteles ir jo palikuonys gaus šį geną. O skiepijimo ant GMO šaknų atveju - kad transgenas bus perduotas nemodifikuotai augalo daliai bei palikuoniams (8).

#### **4.2 Greitesnis naujų rūšių išvedimas**

Nors greitesnis norimomis savybėmis pasižyminčių veislių sukūrimo procesas yra svarbus žemės ūkio prisitaikymui prie ateities iššūkių, jis irgi gali turėti tam tikrų rizikų. Naujų veislių turinčių norimas savybes išvedimo greitį dar padidina metodai, kurie leidžia tikslingai įvesti modifikacijas į skirtingus genus vienu metu (angl. *multiplexing*) (43). Tačiau naujų augalo savybių atsiradimas yra labai komplikotas procesas, nes dažnai požymį lemia ne vieno geno, bet jų sąveikos tinklo veikla. Todėl net ir keletu genų modifikavimas vienu metu nebūtinai lems tokį pat skaičių naujų savybių.

Naujų veislių išvedimo greitis gali turėti įtakos nusistovėjusiems žemės ūkio produkcijos ir maisto apdorojimo grandinės procesams, į tai žiūrint iš ekonominės, sociologinės ar ekologinės pusės. Daug didesnis NGMM efektyvumas gali lemti platų naujų veislių pasižyminčių potencialiai finansiškai naudingomis savybėmis panaudojimą, o taip pat ir greitesnę inovacijų įsisavinimą žemės ūkyje. Gali būti, kad tai išbalansuos visų šių veiklų funkcionavimą ir dinamiką, todėl pagrindiniams veikėjams prireiks laiko prisitaikyti. Tai gali keisti ir visą žemės ūkio srities santvarką, nes tradiciniais metodais dirbantiems ūkininkams bus sunku prisitaikyti ir konkuruoti. Veislių pasižyminčių naujomis savybėmis atsiradimas gali sudaryti sunkumų prisitaikant aplinkinei biologinei įvairovei (2).

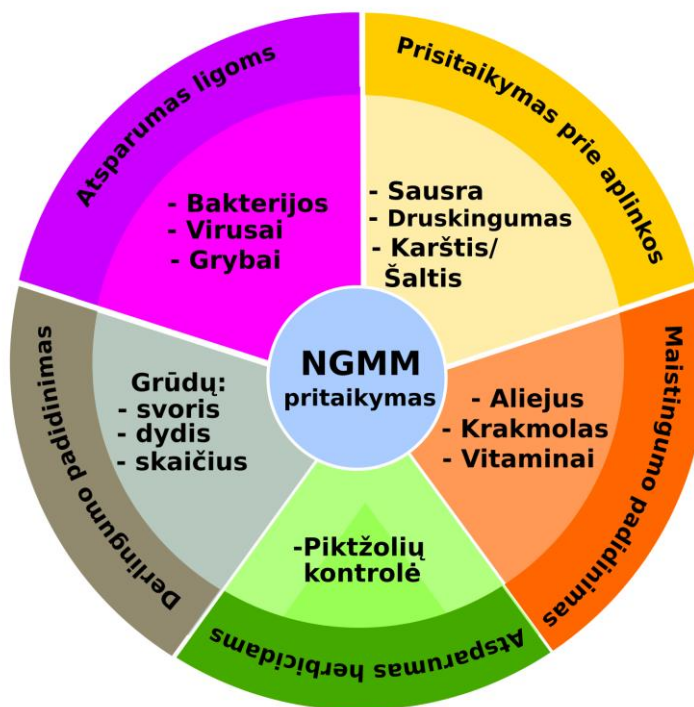
Dar viena rizika yra, kad augalų sukurtų panaudojant NGMM sėklų prekyba bus monopolizuota (mažės sėklų pasirinkimas ir didės jų kaina), kaip ai atsitiko su GMO veislėmis (44). Iš dalies taip atsitiko nes įvesti į rinką GMO produktą yra labai brangu ir tai gali padaryti tik didžiosios korporacijos. Sumažinus reikalavimus NGMM sukurtiems augalams galima tikėtis atvirkštinio efekto, kūrime galės dalyvauti ir mažos bei vidutinės kompanijos ir tai žymiai sustiprins konkurenciją šioje srityje (30).

#### **4.3 Rizikos dėl naujų savybių**

Gali kilti rizikos dėl naujų savybių, kurios nebūdingos tai veislei, sukūrimo. Naujai suteiktos savybės gali padėti apsaugoti nuo ligų, prisitaikyti prie aplinkos sąlygų pokyčių, padaryti augalus atsparius herbicidams ar padidinti naudingų medžiagų kiekį (45, 46). Reikia paminėti, kad naujos savybės gali atsirasti ne tik panaudojant NGMM, bet ir kitus metodus - tiek transgenezę, tiek tradicinę mutagenezę. Vienintelis skirtumas, kad NGMM padeda įvesti savybę tikslingai ir žymiai greičiau, nei tradicinės mutagenezės būdu. Taigi šiuo atveju rizika priklauso ne nuo naudoto metodo, bet nuo to, koks buvo įvestas pokytis ir kokie nauji požymiai dėl to įgaunami. Todėl, rizika turi būti vertinama kiekvienam atvejui atskirai. Naujos savybės, tokios kaip atsparumas druskingumui, sausrui ar dirvos užterštumui, gali padėti augalams aklimatizuotis, augti ir išplisti jiems nebūdingose vietovėse. Kita vertus, sumažėję nuostoliai ir padidėjęs derlingumas padidintų derlių ir sumažintų dirbamos žemės plotus (2).

## 5. Koku tikslu gali būti naudojami NGMM

Pagrindinis NGMM panaudojimo tikslas yra žemės ūkio kultūroms suteikti naujas naudingas savybes, kurias būtų labai sunku ar neįmanoma gauti tradicinės mutagenezės metodais. Pagal savybių tipą jas galima suskirstyti bent į 5 grupes (4 paveikslas).



4 paveikslas. NGMM pritaikymo būdų apžvalga (adaptuota pagal (46))

Nors šie metodai naudojami dar neseniai, jie jau buvo efektyviai pritaikyti padidinant augalų derlingumą, kokybę, maistinę vertę, atsparumą ligoms bei nepalankioms aplinkos sąlygoms ir suteikiant atsparumą herbicidams (45–47) (4 paveikslas). Be to genų redagavimo metodai labai svarbūs ir augalų genomo moksliniuose tyrimuose. Šie metodai padeda rasti genus bei sekos motyvus, kurie atsakingi už vertingas augalų savybes. Tai suteikia žinių apie naudingus genų variantus bei modifikacijos tipą, kurį reikėtų įvesti (46).

## 5.1 Derlingumo padidinimas

Viena iš svarbiausių žemės ūkyje naudojamų kultūrų savybė yra derlingumas. Derlingumas yra sudėtinė savybė, už kurios reguliaciją yra atsakingi keli genai bei jų produktų sąveikos. Atlikti tyrimai atskleidė genų grupę, vadinamą QTL (angl. *quantitative trait loci*), kuri atsakinga už derlingumo reguliavimą įvairiuose augaluose (48, 49). Tradicinę atsitiktinę mutagenezę panaudoti šios genų grupės modifikacijai būtų labai sudėtinga ir labai ilgai užtruktų derlingesnių veislių išvedimas, nes modifikacijos turėtų būti įvestos į bent du genus, genome esančius visai šalia. Tuo tarpu NGMM metodai suteikia tokią galimybę. Dažniausiai naudojamas derlingumo padidinimo kelias pasitelkiant tikslinės mutagenezės SDN-1 technologiją (2 paveikslas) yra įvedant nedidelius pokyčius į genus, kurie neigiamai veikia kultūros derlingumą, ir juos nutildant (46, 50, 51). Taip išjungus 3 neigiamus reguliatorius (Gn1a, Dep1 ir GS3) ryžiuose (*Oriza sativa*) buvo gautas didesnis derlingumas: padidėjo grūdelių skaičius, šluotelės tapo tankesnės, gauta didesnė grūdų masė (52).

## 5.2 Atsparumas ligoms

Žemės ūkyje naudojami augalai dažnai susiduria su įvairiais patogenais: virusais, bakterijomis, grybais, kurie sukelia didelius nuostolius dėl sumažėjusios derliaus kokybės ir kiekio (46, 53). Kai kurių ligų atveju jau žinoma, koks yra ligą sukeliančio patogeno molekulinis veikimo mechanizmas ir kokie genai ar jų variantai atsakingi už atsparumo ligai atsiradimą. Šios žinios leidžia panaudoti NGMM siekiant sukurti ligoms atsparius augalus. Tam buvo pritaikytos bent 2 strategijos.

Pirmuoju keliu modifikuojamos augalo šeimininko genome esančios reguliacinės sekos ar kiti elementai, kurie yra svarbūs patogeno infekcijai ir dauginimuisi (46). Pavyzdžiui, atsparumas citrinmedžių ligą sukeliančioms *Xanthomonas citri* bakterijoms augalams buvo suteiktas Cas9 pagalba modifikavus CsLOB1 geno promotoriaus seką. Augalui užsikrėtus į jo ląsteles patenka bakterijų koduojamas transkripcijos reguliatorius, kuris jungiasi prie CsLOB1 geno promotoriaus, taip padidindamas baltymo raišką ir padėdamas plisti infekcijai. Modifikavus augalo promotoriaus seką bakterinis baltymas jo nebeatpažįsta ir negali keisti geno raiškos (54). Kitos grupės *Xanthomonas* bakterijos sukelia niokojančių puvininių ligą ryžiuose (angl. *rice blight*). Bakterija panaudoja transkripcijos aktyvatorius primenančius veiksnius (TALE) tam, kad aktyvuotų sacharozės transporterių genų raišką. Transporteriai išneša cukrus į ląstelių išorę, kad patenkintų

patogeno poreikius. Jau 2012 m. mokslininkai modifikavo sacharozės transporterių promotoriaus seką taip, kad prie jo negalėtų jungtis TALE, ir ryžiai tapo atsparūs bakterijoms (55), o 2019 m. buvo sukurti visiems 63 šiuo metu žinomiems skirtingiems *Xanthomonas oryzae* bakterijų kamienams atsparūs ryžiai (56).

Kita strategija yra Cas9 pagalba išjungti augalo geną, kurį patogenas panaudoja savo dauginimuisi. Atsparumas grybų sukeliamai kviečių miltligei (angl. *powdery mildew*) buvo pasiektas išjungus 3 augalo genus: TAMLO-A, TAMLO-B ir TAMLO-D (56). Panašiu principu buvo išvesti ir miltligei atsparūs pomidorai - išjungus SIMlo1 geną (57).

### **5.3 Prisitaikymas prie aplinkos**

Netikėti aplinkos pokyčiai, tokie kaip sausra, padidėjęs druskingumas ar šaltis (šalnų), kasmet pasaulyje reikšmingai sumažina derlių (47). Kintantis klimatas šią problemą tik padidins, nes ekstremalūs orų pokyčiai pasitaiko vis dažniau. Augalai, kurie turi išvystę sudėtingus prisitaikymo mechanizmus, gali geriau pakelti nepalankias aplinkos sąlygas. Šie mechanizmai remiasi bent kelių su atsparumu susijusių genų aktyvacija, todėl svarbiausias vaidmuo tenka transkripcijos reguliacijos veiksniams (58). Genetiniai ir genominiai tyrimai atskleidė, kurie genai dalyvauja sudėtinguose reguliaciniuose ir metaboliniuose keliuose. Nemažos dalies tokių genų svarba užtikrinant atsparumą vandens trūkumui, druskingumui ar šalnoms buvo įrodyta panaudojant tradicinius augalų transformacijos metodus (59). *Arabidopsis* augalo atsparumas saurai buvo padidintas įvedant mutaciją OST2 gene, kuri lėmė greitesnį lapų žiotelių užsidarymą (60). Kukurūzo geno ARGOS8, dalyvaujančio etileno atsako kelyje, 5' regione esančios sekos buvo pakoreguotos įvedant natūraliai randamą promotorių. Toks augalas sugebėjo ne tik išgyventi, bet ir būti derlingesnis sausros sąlygomis (61).

### **5.4 Atsparumas herbicidams**

Piktžolės konkuruoja su žemės ūkio kultūromis dėl vandens, maistingų medžiagų, šviesos, vietos bei kitų resursų ir taip ženkliai sumažina derlių. Nenuostabu, kad kovai su piktžolėmis buvo sugalvoti įvairūs kontrolės metodai. Vienas iš populiariausių metodų – herbicidai – dažnai nutaikyti į svarbius augalų metabolizmo kelių veiksnis, todėl naikina ne tik piktžoles, bet gali pakenkti ir kultūriniais augalams. Herbicidų naudojimas turi didelę ekonominę naudą, nes pakelia derlingumą, tačiau gali sukelti pavojų žmogaus sveikatai, neigiamai veikti gamtą ir aplinkinę

biologinę įvairovę (46). Iš pradžių siekiant išvesti herbicidams atsparius augalus buvo panaudojama tradicinė transgenezė, įterpiant į kultūras fermentus, kurie skaido herbicidus. Ten, kur buvo naudoti šie augalai, stipriai sumažėjo piktžolių kontrolei skirtos išlaidos ir neigiami chemikalų naudojimo padariniai (62).

Herbicidai dažnai būna nutaikyti į fermentą, kuris dalyvauja svarbiame metaboliniame kelyje. Pavyzdžiui, chemikalai (imidazolinonai, sulfonilkarbamidai) dažnai inhibuoja acetolaktato sintazę (ALS), kuri yra labai svarbi augalui sintetinant svarbias šakotąsias aminorūgštis (izoleuciną, leuciną, valiną). Panaudojant genų redagavimo metodus (ODM, TALEN ar Cas9) buvo modifikuotas įvairių augalų (bulvių, ryžių, sojos, kukurūzų) ALS aktyvusis centras ir gautos veislės, kurių neinhibavo šie chemikalai (62). Panaši strategija leido gauti ir glikofosfatui atsparius linus ir ryžius (63, 64). Šiuo atveju buvo modifikuotas EPSPS genas, kuris koduoja pagrindinį glikofosfato taikinį – 5-enolpiruvilšikimato-3-fosfato sintazę, kuri dalyvauja aromatinių aminorūgščių sintezės pirmtako šikimato sintezės kelyje.

## **5.5 Pagerintos maistinės savybės**

NGMM gali padėti pagerinti kultūrų maistines savybes ir leisti užauginti sveikesnę maistą. Šiuo metu yra naudojama keletas technologijų. Pirmiausiai yra bandoma sumažinti neigiamai mitybą veikiančių medžiagų kiekį maistinėse kultūrose. Fitatai, kuriuos sintetina daugelis kultūrų, sudaro kompleksus su baltymais bei mineralais ir trukdo šių maisto medžiagų įsisavinimui. Siekiant sumažinti fitatų kiekį kukurūzuose buvo išjungtas ZmIPK genas, dalyvaujantis fitato sintezės kelyje. Kita kenksminga medžiaga yra akrilamidas - potencialus kancerogenas, kuris susidaro vykstant redukcijos reakcijai tarp cukrų (pvz. gliukozės ar fruktozės) ir laisvų aminorūgščių (pvz. asparagino) skrudinant bulves. TALEN pagalba išjungus Vlnv geną, kurio koduojamas fermentas atsakingas už sacharozės skaldymą į gliukozę ir fruktozę, gautos bulvės, kurias kepanant nesusidaro akrilamidas (65). Cas9 nukleazės buvo panaudotos ir gauti kviečius, gaminančius neįmunogeninį glitimą, taip pat pomidorus, gaminančius didesnius antioksidanto likopeno kiekius (46).

Augalinių kultūrų, tokių kaip bulvės ar kukurūzai, gaminamas krakmolos gali būti vienos iš dviejų formų: linijinės (amilozė) arba šakotos (amilopektinas). Augalai, kurie sintetina amilopektiną, bet ne amilozę, dėl šio cukraus savybių daugelyje šalių yra vertinami labiau. Jis



lengviau skaldomas, be to pasižymi vaškine tekstūra. Bulvių ir kukurūzų „vaškinės“ rūšys, gaminančios tik amilopektiną, buvo išvestos ir tradiciniais metodais, bet yra sunku palaikyti tokių augalų savybes ilgą laiką. Todėl tik amilopektiną sintetinančių bulvių ir kukurūzų kultūroms sukurti buvo naudojama Cas9 genų redagavimo technologija. Bulvių atveju SDN-1 technologijos pagalba buvo išjungti visi 4 GBSS geno aleliai, tuo tarpu kukurūzuose buvo išjungtas Wx1 genas, dalyvaujantis krakmolo biosintezėje (66, 67).

Cas9 technologija buvo panaudota ir siekiant pakeisti sėklose esantį aliejaus kiekį norint pagerinti tiek maistines savybes, tiek biokuro išeią. Sėklose esančio aliejaus sudėtį galima keisti arba pakeičiant esamų riebiųjų rūgščių santykį, arba pridėdant naujų naudingų riebiųjų rūgščių. Didelis kiekis polinesočiųjų aminorūgščių, tokių kaip linoleno rūgštis, nėra naudingas dėl mažo oksidacinio stabilumo. Panaudojant genų redagavimo technologiją galima keisti riebiųjų rūgščių kiekį išjungiant riebiųjų rūgščių desaturazes (angl. *fatty acid desaturases*, FAD). Pavyzdžiui, išjungus sojų FAD2-A1 ir FAD2-1B fermentus naudingos oleino riebiosios rūgšties kiekis išaugo net 4 kartus (46, 59).

## **5.6 Galimas NGMM pritaikymas Lietuvoje**

Lietuvoje NGMM technologijos šiuo metu nevystomos, tačiau, esant tokiai galimybei, jos galėtų būti ekonomiškai naudingos dėl potencialo didinti kultūrinių augalų derlingumą ir atsparumą šaloms, kuris leistų išvengti su tuo susijusių nuostolių. Šios savybės taip pat padėtų minimizuoti pasėliams naudojamus žemės plotus ir taip užtikrintų geresnę gyvosios gamtos bei biologinės įvairovės apsaugą.

Kitas galimas panaudojimo būdas remiasi atsparumo ligoms didinimu. Staigiai išplitusios ligos gali pridaryti didžiulių nuostolių žemės ūkiui. Tai rodo alyvmedžių bakterinės infekcijos siaučiančios Italijoje pavyzdys (68) arba kiaulių maro virusinės infekcija, dėl kurios šiais metais buvo sunaikinta apie ketvirtadalis pasaulio kiaulių (69). Galimybė naudoti kultūras, pasižyminčias atsparumu ligoms, padėtų sumažinti dėl staigių epidemijų kylančius nuostolius.

Ir galiausiai, pavojingų ar nenaudingų medžiagų negaminančios kultūros, pavyzdžiui, bulvės be akrilamido arba naudingas riebalų rūgštis gaminantys augalai, suteiktų galimybę kasdien vartoti maistingesnius ir naudingesnius maisto produktus.

## 6. NGMM Lietuvoje ir pasaulyje

Mūsų žiniomis šiuo metu Lietuvoje NGMM naujų augalų veislių kūrimui nėra naudojama. Aplinkos ministerija nėra gavusi paraiškų ir patvirtinusi leidimų ([www.gmo.am.lt](http://www.gmo.am.lt)). Tai patvirtina ir mokslinių publikacijų analizė. Tačiau tokie darbai vyksta kitose Europos Sąjungos šalyse. Belgijoje pradėti lauko tyrimai panaudojant CRISPR tikslių nukleazių pagalba modifikuotus kukurūzus. Prancūzija vykdo 2012 m. pradėtą Genius projektą, kurio metu kuria biotechnologinius metodus ir įrankius leisiančius modifikuoti augalus (70). Keli projektais susiję su NGMM panaudojimu bei poveikio aplinkai vertinimu vykdomi Vokietijoje (4). Ispanijoje naujų lauko tyrimų, susijusių su NGMM taip pat nebuvo pradėta. Ispanija, Danija ir Prancūzija 2017-2019 buvo užsakę mokslines analizes apie galimą NGMM poveikį aplinkai ir žmogaus sveikatai. Visų jų išvados panašios - nei patys NGMM metodai, nei greitesnis naujų rūšių sukūrimas nekelia papildomų rizikų lyginant su tradiciniais mutagenezės. Tas pačias modifikacijas galima gauti tiek panaudojant tradicinę mutagenezę tiek NGMM, todėl sukurtus organizmus būtų logiška reguliuoti pagal naujas savybes, o ne panaudotą metodą jiems gauti (2, 30).

Už ES ribų NGMM reglamentacija aiškesnė ir šia kryptimi vyksta daug tyrimų (5, 6, 71). Daugelis šalių nusprendė atsižvelgti į tai kad NGMM įvedamos mutacijos yra analogiškos toms, kurios atsiranda natūraliai arba tradicinės atsitiktinės mutagenezės būdu. JAV Maisto ir vaistų tarnyba (angl. *Food and Drug Administration*, FDA) nusprendė, kad panaudojant NGMM išvestos veislės nebus reguliuojamos tol, kol mutacijos yra tokios pat, kokios gali atsirasti natūraliais būdais (71, 72). Kanada apsisprendė pereiti prie produkto savybėmis grįstos reguliacijos, tai yra, bus neatsižvelgiama, koku būdu išvesta veislė, bet į tai, kokias naujas savybes ji turi. Poveikis sveikatai ir aplinkai bus vertinamas tik tada, jei atsiranda naujos savybės, nepriklausomai ar augalo rūšis išvesta NGMM pagalba, ar tradicinės mutagenezės būdu (73). Australija pasirinko kiek griežtesnį variantą nei JAV, čia augalų veislės nebus kontroliuojamos tik tokiu atveju, jei NGMM poveikyje nebus įstatyta nauja DNR seka (74). Kinijos reguliacinė aplinka kol kas nėra aiški, tačiau manoma, kad siekdama patenkinti didėjanti maisto kiekio poreikį ši šalis investuoja labai dideles lėšas genų redagavimo pritaikymui naujų veislių išvedimui (5). Taip pat reikia paminėti, kad Rusijoje pradedama 1.7 milijardų dolerių vertinama programa 30 naujų veislių išvedimui panaudojant genų redagavimą (6). Atsižvelgiant į aplinkinių šalių sprendimus, ES ateityje gali tapti nekonkurencinga žemės ūkio srityje, bei jos gyventojai praras galimybę gyventi sveikesnėje aplinkoje ir vartoti sveikesnį bei kokybiškesnį maistą.

## **7. Siūlomas NGMM reglamentavimas Lietuvoje**

Genetiškai modifikuotų organizmų panaudojimą Lietuvoje reglamentuoja Lietuvos Respublikos genetiškai modifikuotų organizmų įstatymas, kuris yra suderintas su Europos Parlamento ir Tarybos direktyva 2001/18/EB dėl genetiškai modifikuotų organizmų apgalvoto išleidimo į aplinką ir panaikinanti Tarybos direktyvą 90/220/EEB. Pagal 2001/18/EB direktyvą ir Lietuvos Respublikos genetiškai modifikuotų organizmų įstatymą GMO yra laikomi visi organizmai, išskyrus žmogų, kuriuose genetinė medžiaga pakeista tokiu būdu, kuris paprastai nepasitaiko poruojantis ir (arba) natūralios rekombinacijos būdu. Pagal 2001/18/EB direktyvą išimtis taikoma tik tradiciniams mutagenezės metodams. NGMM, tokie kaip genų redagavimas, kurie yra paremti naujaisiais biotechnologijų mokslo atradimais ir leidžia tiksliai modifikuoti pasirinkto organizmo genetinę informaciją, sukurti jau po 2001/18/EB direktyvos. Dėl šios priežasties nebuvo sutarta kaip reguliuoti NGM metodais modifikuotus organizmus. Ilgą laiką šalys narės galėjo pačios apsispręsti, tačiau 2018 m. liepos 25 d. Europos teisingumo teismas priėmė sprendimą, kad visi organizmai, sukurti panaudojant mutagenezę, įskaitant genų redagavimą ir, turi būti traktuojami kaip GMO ir reguliuojami 2001/18/BE direktyvos. Išimtis taikoma tik tradiciniams mutagenezės metodams. Reikia pažymėti, kad šis sprendimas išaiškino tik mutagenezės technikų reguliavimą. Tuo tarpu kitų NGMM, tokių kaip epigenomo redagavimas ar metodai, kuriuose naudojamas transgenas neperduodamas palikuoniams, reguliavimo mechanizmas kol kas lieka neaiškus.

## 8. Išvados ir rekomendacijos

Nors 2018 m. Liepos 25 d. Europos teisingumo teismo priimtas sprendimas GMO reglamentavimą Europos Sąjungoje padarė aiškesnį, jis neišsprendė iššūkių, su kuriais susiduria ES ir visa žmonija. Visų pirma, didėjanti žmonių populiacija ir klimato kaita reikalauja naujų derlingesnių kultūrinių augalų veislių, gebančių prisitaikyti prie kintančių aplinkos sąlygų. NGMM metodai leidžia tiksliai ir greitai modifikuoti augalų DNR ir taip išvesti veisles su reikalingomis savybėmis. Daugelis NGMM leidžia įvesti DNR modifikacijas, kurios yra identiškos natūraliai atsirandančioms arba gaunamoms tradicinės mutagenozės būdais. Be to, moksliniai tyrimai rodo, kad šie metodai yra žymiai tikslesni už transgenezę, o daugeliu atveju net ir už tradicinę mutagenozę, kuriai išimtis yra taikoma. Todėl moksliniu požiūriu būtų logiška, jei NGMM pagalba gautos veislės būtų reguliuojamos paprasčiau nei transgenezės būdu gauti GMO. Kadangi tos pačios mutacijos gali atsirasti tiek natūraliai, tiek dėl tradicinės mutagenozės, tiek dėl NGMM, būtų logiška, jei pagrindinis kriterijus reguliacijai būtų gauto produkto savybės.

Daugelis ES prekybos partnerių (JAV, Australija, Japonija) nusprendė nereguliuoti NGMM metodu gautų rūšių jei įvestos mutacijos tolygios atsiradusioms dėl natūralių priežasčių. Labai logiškas yra Kanados sprendimas organizmus reguliuoti ir kontroliuoti ne pagal tai kokių būdu jie gauti, bet kokias naujas savybes jie įgyja. Juk neigiamą poveikį žmogaus sveikatai ir aplinkai sukelti gali ne pati DNR modifikacija, bet naujai įgytos organizmo savybės. Be to tą pačią mutaciją galima gauti tiek natūraliai, tiek tradicinės mutagenozės būdu, tiek NGMM pagalba. NGMM produktų nereguliavimas kitose šalyse sukels didelių iššūkių ES priežiūros institucijoms, nes tokių modifikacijų neįmanoma atskirti nuo natūralių. Dėl šių priežasčių tokių produktų patekimas į rinką negalėtų būti kontroliuojamas, jeigu tiekėjas nenurodys, kad buvo panaudotos genų redagavimo technologijos. Neaišku kaip tokiu atveju būtų užtikrinamas monitoringas ir reguliavimas.

GMO apibrėžimas, naudojamas 2001/18/EB direktyvoje, buvo priimtas 1990 m. ir yra moksliniu požiūriu pasenęs. Šiuo metu jau yra žinoma, kad taškinės mutacijos atsiranda ir visiškai natūraliai, tačiau prie natūralių DNR modifikacijos būdų 2001/18/EB direktyvoje nėra priskiriamos. Be to, daugelis NGMM tik pažymi mutacijos vietą, o DNR modifikacija įvedama natūraliai ląstelėse vykstančio proceso – DNR reparacijos – pagalba. Atsižvelgiant į šiuos argumentus mokslinė bendruomenė mano, kad siekiant išlaikyti ES konkurencingumą, saugoti aplinką ir biologinę įvairovę bei suteikti žmonėms saugesnius maisto produktus būtina peržiūrėti

GMO reguliaciją Europos Sąjungoje tam, kad ji atitiktų naujausiais moksliniais tyrimais pagrįstas žinias apie NGMM. Kad būtų rastas optimalus sprendimas būtina plati visų suinteresuotų grupių (visuomenės, mokslininkų, verslo, politikų) diskusija sprendimui priimti. Todėl atsakingoms Lietuvos institucijoms rekomenduojame palaikyti planuojamą 2001/18/EB direktyvos peržiūrą, kad tokios diskusijos galėtų vykti visos ES mastu.

## 9. Literatūros sąrašas

1. Joint Research Renter (2011) New plant breeding techniques. State-of-the-art and prospects for commercial development.  
<http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC63971>
2. High Council for Biotechnology (HCB) (2017) An opinion on NPBTs.  
<http://www.hautconseildesbiotechnologies.fr/fr/avis/avis-sur-nouvelles-techniques-dobtention-plantes-new-plant-breeding-techniques-npbt>
3. EFSA Panel,G.M.E.P. (2012) Scientific opinion addressing the safety assessment of plants developed through cisgenesis and intragenesis. *EFSA J.*, **10**, 2561.
4. Eckerstorfer,M.F., Engelhard,M., Heissenberger,A., Simon,S. and Teichmann,H. (2019) Plants Developed by New Genetic Modification Techniques—Comparison of Existing Regulatory Frameworks in the EU and Non-EU Countries. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **7**.
5. Cohen,J. (2019) To feed its 1.4 billion, China bets big on genome editing of crops. *Science*, 10.1126/science.aay8951.
6. Dobrovidova,O. (2019) Russia joins in global gene-editing bonanza. *Nature*, **569**, 319–320.
7. Laaninen,T. (2019) New plant-breeding techniques: Applicability of EU GMO rules.  
[https://www.europarl.europa.eu/thinktank/en/document.html?reference=EPRS\\_BRI\(2019\)642235](https://www.europarl.europa.eu/thinktank/en/document.html?reference=EPRS_BRI(2019)642235)
8. Lusser,M. and Davies,H. V. (2013) Comparative regulatory approaches for groups of new plant breeding techniques. *N. Biotechnol.*, **30**, 437–446.
9. SAM (2018) Scientific Perspective on the Regulatory Status of Products Derived from Gene Editing and the Implications for the GMO Directive. 10.2777/407732.
10. Komor,A.C., Kim,Y.B., Packer,M.S., Zuris,J.A. and Liu,D.R. (2016) Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, **533**, 420–424.
11. Barrangou,R., Fremaux,C., Deveau,H., Richards,M., Boyaval,P., Moineau,S., Romero,D.A. and Horvath,P. (2007) CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science*, **315**, 1709–1712.
12. Lu,R., Martin-Hernandez,A.M., Peart,J.R., Malcuit,I. and Baulcombe,D.C. (2003) Virus-induced gene silencing in plants. *Methods*, **30**, 296–303.
13. Unver,T. and Budak,H. (2009) Virus-Induced Gene Silencing, a Post Transcriptional Gene Silencing Method. *Int. J. Plant Genomics*, **2009**, 1–8.
14. Gasiunas,G., Barrangou,R., Horvath,P. and Siksnyš,V. (2012) Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **109**, E2579-2586.
15. Jinek,M., Chylinski,K., Fonfara,I., Hauer,M., Doudna,J.A. and Charpentier,E. (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, **337**, 816–21.
16. Gaudelli,N.M., Komor,A.C., Rees,H.A., Packer,M.S., Badran,A.H., Bryson,D.I. and

- Liu, D.R. (2017) Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, 10.1038/nature24644.
17. Gasiunas, G. and Siksnys, V. (2013) RNA-dependent DNA endonuclease Cas9 of the CRISPR system: Holy Grail of genome editing? *Trends Microbiol.*, **21**, 562–7.
  18. Bitinaite, J., Wah, D.A., Aggarwal, A.K. and Schildkraut, I. (1998) FokI dimerization is required for DNA cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **95**, 10570–10575.
  19. Kim, Y.G., Cha, J. and Chandrasegaran, S. (1996) Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **93**, 1156–1160.
  20. Klug, A. and Rhodes, D. (1987) Zinc Fingers: A Novel Protein Fold for Nucleic Acid Recognition. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **52**, 473–482.
  21. Moscou, M.J. and Bogdanove, A.J. (2009) A Simple Cipher Governs DNA Recognition by TAL Effectors. *Science*, **326**, 1501–1501.
  22. Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A. and Bonas, U. (2009) Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors. *Science*, **326**, 1509–1512.
  23. Li, T., Huang, S., Jiang, W.Z., Wright, D., Spalding, M.H., Weeks, D.P. and Yang, B. (2011) TAL nucleases (TALNs): hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain. *Nucleic Acids Res.*, **39**, 359–372.
  24. Christian, M., Cermak, T., Doyle, E.L., Schmidt, C., Zhang, F., Hummel, A., Bogdanove, A.J. and Voytas, D.F. (2010) Targeting DNA Double-Strand Breaks with TAL Effector Nucleases. *Genetics*, **186**, 757–761.
  25. Kim, Y.B., Komor, A.C., Levy, J.M., Packer, M.S., Zhao, K.T. and Liu, D.R. (2017) Increasing the genome-targeting scope and precision of base editing with engineered Cas9-cytidine deaminase fusions. *Nat. Biotechnol.*, 10.1038/nbt.3803.
  26. Mishra, R., Joshi, R.K. and Zhao, K. (2019) Base editing in crops: current advances, limitations and future implications. *Plant Biotechnol. J.*, 10.1111/pbi.13225.
  27. Thakore, P.I., Black, J.B., Hilton, I.B. and Gersbach, C.A. (2016) Editing the epigenome: technologies for programmable transcription and epigenetic modulation. *Nat. Methods*, **13**, 127–137.
  28. Xie, N., Zhou, Y., Sun, Q. and Tang, B. (2018) Novel Epigenetic Techniques Provided by the CRISPR/Cas9 System. *Stem Cells Int.*, **2018**, 1–12.
  29. Norkunas, K., Harding, R., Dale, J. and Dugdale, B. (2018) Improving agroinfiltration-based transient gene expression in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Methods*, **14**, 71.
  30. The Danish Agricultural Agency (2018) New plant breeding techniques – is there a risk? [lbst.dk/fileadmin/user\\_upload/NaturErhverv/Filer/Styrelsen/Moed\\_os/Orientation\\_paper\\_Risc\\_ENG.pdf](http://lbst.dk/fileadmin/user_upload/NaturErhverv/Filer/Styrelsen/Moed_os/Orientation_paper_Risc_ENG.pdf)
  31. Fu, Y., Sander, J.D., Reyon, D., Cascio, V.M. and Joung, J.K. (2014) Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat. Biotechnol.*, 10.1038/nbt.2808.
  32. Tsai, S.Q., Zheng, Z., Nguyen, N.T., Liebers, M., Topkar, V. V., Thapar, V., Wyvekens, N., Khayter, C., Iafrate, A.J., Le, L.P., *et al.* (2015) GUIDE-seq enables genome-wide profiling

- of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. *Nat. Biotechnol.*, **33**, 187–197.
33. Kosicki,M., Tomberg,K. and Bradley,A. (2018) Repair of double-strand breaks induced by CRISPR–Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements. *Nat. Biotechnol.*, **36**, 765–771.
  34. Pacher,M., Schmidt-Puchta,W. and Puchta,H. (2007) Two Unlinked Double-Strand Breaks Can Induce Reciprocal Exchanges in Plant Genomes via Homologous Recombination and Nonhomologous End Joining. *Genetics*, **175**, 21–29.
  35. Lin,Y., Fine,E.J., Zheng,Z., Antico,C.J., Voit,R.A., Porteus,M.H., Cradick,T.J. and Bao,G. (2014) SAPTA: a new design tool for improving TALE nuclease activity. *Nucleic Acids Res.*, **42**, e47–e47.
  36. Hendel,A., Fine,E.J., Bao,G. and Porteus,M.H. (2015) Quantifying on- and off-target genome editing. *Trends Biotechnol.*, **33**, 132–140.
  37. Zhou,C., Sun,Y., Yan,R., Liu,Y., Zuo,E., Gu,C., Han,L., Wei,Y., Hu,X., Zeng,R., *et al.* (2019) Off-target RNA mutation induced by DNA base editing and its elimination by mutagenesis. *Nature*, **571**, 275–278.
  38. Xin,H., Wan,T. and Ping,Y. (2019) Off-Targeting of Base Editors: BE3 but not ABE induces substantial off-target single nucleotide variants. *Signal Transduct. Target. Ther.*, **4**, 9.
  39. Slaymaker,I.M., Gao,L., Zetsche,B., Scott,D.A., Yan,W.X. and Zhang,F. (2016) Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*, **351**, 84–88.
  40. Kleinstiver,B.P., Pattanayak,V., Prew,M.S., Tsai,S.Q., Nguyen,N.T., Zheng,Z. and Joung,J.K. (2016) High-fidelity CRISPR–Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature*, **529**, 490–495.
  41. Hajiahmadi,Z., Movahedi,A., Wei,H., Li,D., Orooji,Y., Ruan,H. and Zhuge,Q. (2019) Strategies to Increase On-Target and Reduce Off-Target Effects of the CRISPR/Cas9 System in Plants. *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 3719.
  42. Peterson,B.A., Haak,D.C., Nishimura,M.T., Teixeira,P.J.P.L., James,S.R., Dangl,J.L. and Nimchuk,Z.L. (2016) Genome-Wide Assessment of Efficiency and Specificity in CRISPR/Cas9 Mediated Multiple Site Targeting in Arabidopsis. *PLoS One*, **11**, e0162169.
  43. Qi,W., Zhu,T., Tian,Z., Li,C., Zhang,W. and Song,R. (2016) High-efficiency CRISPR/Cas9 multiplex gene editing using the glycine tRNA-processing system-based strategy in maize. *BMC Biotechnol.*, **16**, 58.
  44. Maghari,B.M. and Ardekani,A.M. (2011) Genetically modified foods and social concerns. *Avicenna J. Med. Biotechnol.*, **3**, 109–17.
  45. Ricroch,A.E. and Hénard-Damave,M.-C. (2015) Next biotech plants: new traits, crops, developers and technologies for addressing global challenges. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 10.3109/07388551.2015.1004521.
  46. Sedeek,K.E.M., Mahas,A. and Mahfouz,M. (2019) Plant Genome Engineering for Targeted Improvement of Crop Traits. *Front. Plant Sci.*, **10**.
  47. Wang,F., Wang,C., Liu,P., Lei,C., Hao,W., Gao,Y., Liu,Y.-G. and Zhao,K. (2016) Enhanced Rice Blast Resistance by CRISPR/Cas9-Targeted Mutagenesis of the ERF Transcription



- Factor Gene OsERF922. *PLoS One*, **11**, e0154027.
48. Bai,X., Wu,B. and Xing,Y. (2012) Yield-related QTLs and Their Applications in Rice Genetic ImprovementF. *J. Integr. Plant Biol.*, **54**, 300–311.
  49. Zuo,J. and Li,J. (2014) Molecular Genetic Dissection of Quantitative Trait Loci Regulating Rice Grain Size. *Annu. Rev. Genet.*, **48**, 99–118.
  50. Song,G., Jia,M., Chen,K., Kong,X., Khattak,B., Xie,C., Li,A. and Mao,L. (2016) CRISPR/Cas9: A powerful tool for crop genome editing. *Crop J.*, **4**, 75–82.
  51. Ma,X., Zhu,Q., Chen,Y. and Liu,Y.-G. (2016) CRISPR/Cas9 Platforms for Genome Editing in Plants: Developments and Applications. *Mol. Plant*, **9**, 961–974.
  52. Li,M., Li,X., Zhou,Z., Wu,P., Fang,M., Pan,X., Lin,Q., Luo,W., Wu,G. and Li,H. (2016) Reassessment of the Four Yield-related Genes Gn1a, DEP1, GS3, and IPA1 in Rice Using a CRISPR/Cas9 System. *Front. Plant Sci.*, **7**.
  53. Savary,S., Ficke,A., Aubertot,J.-N. and Hollier,C. (2012) Crop losses due to diseases and their implications for global food production losses and food security. *Food Secur.*, **4**, 519–537.
  54. Peng,A., Chen,S., Lei,T., Xu,L., He,Y., Wu,L., Yao,L. and Zou,X. (2017) Engineering canker-resistant plants through CRISPR/Cas9-targeted editing of the susceptibility gene CsLOB1 promoter in citrus. *Plant Biotechnol. J.*, **15**, 1509–1519.
  55. Li,L., Piatek,M.J., Atef,A., Piatek,A., Wibowo,A., Fang,X., Sabir,J.S.M., Zhu,J.-K. and Mahfouz,M.M. (2012) Rapid and highly efficient construction of TALE-based transcriptional regulators and nucleases for genome modification. *Plant Mol. Biol.*, **78**, 407–16.
  56. Oliva,R., Ji,C., Atienza-Grande,G., Huguet-Tapia,J.C., Perez-Quintero,A., Li,T., Eom,J.-S., Li,C., Nguyen,H., Liu,B., *et al.* (2019) Broad-spectrum resistance to bacterial blight in rice using genome editing. *Nat. Biotechnol.*, **37**, 1344–1350.
  57. Nekrasov,V., Staskawicz,B., Weigel,D., Jones,J.D.G. and Kamoun,S. (2013) Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat. Biotechnol.*, **31**, 691–693.
  58. Gollmack,D., Li,C., Mohan,H. and Probst,N. (2014) Tolerance to drought and salt stress in plants: Unraveling the signaling networks. *Front. Plant Sci.*, **5**.
  59. Haun,W., Coffman,A., Clasen,B.M., Demorest,Z.L., Lowy,A., Ray,E., Retterath,A., Stoddard,T., Juillerat,A., Cedrone,F., *et al.* (2014) Improved soybean oil quality by targeted mutagenesis of the fatty acid desaturase 2 gene family. *Plant Biotechnol. J.*, **12**, 934–940.
  60. Osakabe,Y. and Osakabe,K. (2014) Genome editing with engineered nucleases in plants. *Plant Cell Physiol.*, 10.1093/pcp/pcu170.
  61. Shi,J., Gao,H., Wang,H., Lafitte,H.R., Archibald,R.L., Yang,M., Hakimi,S.M., Mo,H. and Habben,J.E. (2017) ARGOS8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. *Plant Biotechnol. J.*, **15**, 207–216.
  62. Lombardo,L., Coppola,G. and Zelasco,S. (2016) New Technologies for Insect-Resistant and Herbicide-Tolerant Plants. *Trends Biotechnol.*, **34**, 49–57.

63. Li,J., Meng,X., Zong,Y., Chen,K., Zhang,H., Liu,J., Li,J. and Gao,C. (2016) Gene replacements and insertions in rice by intron targeting using CRISPR–Cas9. *Nat. Plants*, **2**, 16139.
64. Sauer,N.J., Mozoruk,J., Miller,R.B., Warburg,Z.J., Walker,K.A., Beetham,P.R., Schöpke,C.R. and Gocal,G.F.W. (2016) Oligonucleotide-directed mutagenesis for precision gene editing. *Plant Biotechnol. J.*, **14**, 496–502.
65. Clasen,B.M., Stoddard,T.J., Luo,S., Demorest,Z.L., Li,J., Cedrone,F., Tibebu,R., Davison,S., Ray,E.E., Daulhac,A., *et al.* (2016) Improving cold storage and processing traits in potato through targeted gene knockout. *Plant Biotechnol. J.*, **14**, 169–176.
66. Waltz,E. (2016) CRISPR-edited crops free to enter market, skip regulation. *Nat. Biotechnol.*, **34**, 582–582.
67. Andersson,M., Turesson,H., Nicolia,A., Fält,A.-S., Samuelsson,M. and Hofvander,P. (2017) Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts. *Plant Cell Rep.*, **36**, 117–128.
68. Abbott,A. (2018) Italy’s olive crisis intensifies as deadly tree disease spreads. *Nature*, **563**, 306–307.
69. MacKenzie,D. (2019) A quarter of all pigs have died this year due to African swine fever. *New Sci.*
70. Genius project (2012) <https://www.inra-transfert.fr/en/actualites/102-8-projets/303-genius>
71. Waltz,E. (2018) With a free pass, CRISPR-edited plants reach market in record time. *Nat. Biotechnol.*, **36**, 6–7.
72. Editorial (2018) A CRISPR definition of genetic modification. *Nat. Plants*, **4**, 233–233.
73. Friedrichs,S., Takasu,Y., Kearns,P., Dagallier,B., Oshima,R., Schofield,J. and Moreddu,C. (2019) An overview of regulatory approaches to genome editing in agriculture. *Biotechnol. Res. Innov.*, **3**, 208–220.
74. Mallapaty,S. (2019) Australian gene-editing rules adopt ‘middle ground’. *Nature*, 10.1038/d41586-019-01282-8.