

WACŁAW ORCZYK*

Edytowanie genomów roślin uprawnych. Minimum faktów, bez mitów

W roku 2012 w *Science* opublikowano pracę zespołu Jennifer A. Doudna i Emmanuelle Charpentier, w której opisano nowe narzędzie biologii molekularnej CRISPR/Cas9 (Jinek *et al.*, 2012). Umożliwia ono dokonanie zmiany sekwencji nukleotydów DNA w wybranym miejscu DNA, określanej jako edytowanie genomu. Centralnym elementem CRISPR/Cas9 jest kompleks zbudowany z dwóch molekuł: cząsteczki RNA i cząsteczki białka. Zadaniem tego kompleksu w komórce jest rozpoznanie określonego miejsca w genomie oraz przecięcie DNA w tym dokładnie miejscu. Miejsce to jest identyfikowane dzięki krótkiej cząsteczce RNA (naprowadzającym RNA; gRNA), której sekwencja nukleotydowa jest komplementarna do określonego fragmentu DNA. Drugi komponent, białko Cas9, jest enzymem, który przecina dwuniciową cząsteczkę DNA w regionie przyłączenia całego kompleksu gRNA/Cas9. Te dwa etapy, tj. rozpoznanie miejsca w genomie i jego przecięcie, stanowią całą ingerencję narzędzia CRISPR/Cas9 w genom edytowanej rośliny.

Enzymatyczne przecięcie DNA, podobnie jak bardzo często zachodzące naturalne przerwanie DNA, aktywuje systemy naprawcze, obecne w każdej komórce. Efektem ich aktywności jest ponowne połączenie obydwu nici. Odtworzony odcinek, identyczny do tego sprzed naprawy, jest powtórnie rozpoznawany i przecinany przez gRNA/Cas9. Ten cykl przecinania i naprawy powtarzany jest wiele razy aż do chwili, gdy system naprawczy popełni błąd. Może to być eliminacja lub wbudowanie kilku nukleotydów albo zamiana jednego nukleotydu na inny. Taka zmiana sekwencji nukleotydów A, T, G i C w ściśle określonym miejscu DNA, określana terminem mutacja, lub jak w tym przypadku edytowanie, staje się częścią zapisu genetycznego zmienionej komórki i zmienionej rośliny. Mutacja wywołana kompleksem gRNA/Cas9 jest nieodróżnialna w swojej naturze od mutacji naturalnych lub mutacji indukowanych w mutagenезie konwencjonalnej.

Bardzo duże możliwości aplikacyjne CRISPR/Cas9, oczywiste już dla autorów publikacji w „*Science*”, przyciągnęły znaczne fundusze na badania i opracowanie zastosowań praktycznych. W bazie bibliograficznej Web of Science termin „CRISPR/Cas9” wskazuje

* Prof. dr hab. Wacław Orczyk (w.orczyk@ihar.edu.pl), Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy, Radzików

blisko 10 000 publikacji. Znaczenie tego odkrycia zostało potwierdzone uznaniem technologii CRISPR/Cas9 za przełomowe w roku 2015 oraz, półżartem, używaniem skrótu B.C. (*Before CRISPR*) na określenie wszystkich wcześniejszych prób edytowania genomu. Zdecydowana większość publikacji i patentów z obszaru CRISPR/Cas9 dotyczy medycznych zastosowań. Wśród najbardziej spektakularnych są eksperymentalne terapie chorób genetycznych np., pierwsze kliniczne testy terapii anemii sierpowatej oraz beta-talasemii zaplanowane już w roku 2018 (<https://www.technologyreview.com/s/609722/crispr-in-2018-coming-to-a-human-near-you/>) czy próby całkowitej eliminacji wirusa HIV z organizmu (<https://www.biotechniques.com/microbiology-virology/is-there-a-cure-for-hiv-on-the-horizon/>) (Dash *et al.*, 2019).

Wykorzystanie CRISPR/Cas9 w badaniach roślin oraz w hodowli roślin uprawnych jest może mniej spektakularne, ale nie mniej ważne. Rośliny są jedynym producentem żywności i paszy dla zwierząt. Zaspokojenie potrzeb rosnącej populacji wymaga podwojenia produkcji roślinnej do połowy bieżącego stulecia (<http://www.fao.org/3/a-i6583e.pdf>). Zbliżenie się do tego celu wymaga wykorzystania całej wiedzy oraz dostępnych narzędzi, w tym CRISPR/Cas9, do uzyskania roślin, które będą dobrze plonowały w warunkach silnie rosnącej presji patogenów oraz niekorzystnych zmian środowiska: ograniczonej ilości wody, suboptymalnych temperatur i zasolenia gleby. Omówienie przykładów użycia CRISPR/Cas9 do rozwiązania szczegółowych problemów z tego obszaru przekracza możliwości tego opracowania. W tekście poniżej wymienione są tylko najważniejsze strategie wykorzystania CRISPR/Cas9 w hodowli roślin.

Odporność roślin na choroby

Wiedza o genach odporności oraz procesach interakcji rośliny z patogenem pozwala na opracowanie różnych strategii uzyskania roślin odpornych. Skuteczna infekcja zależy często od zahamowania reakcji obronnej oraz wykorzystania roślinnych mechanizmów warunkujących podatność. Zablokowanie tych mechanizmów przez eliminację określonych cząsteczek sygnałnych rośliny uniemożliwia kolonizację przez patogena i rozwój choroby. Inaktywacja przy użyciu CRISPR/Cas9 genów kodujących ww. cząsteczki (są to tzw. geny podatności) potwierdza skuteczność tego podejścia. Tak uzyskane rośliny stają się odporne na szeroki zakres patogenów oraz, co równie ważne, uzyskana odporność jest trudno przełamywana przez ewolucję patogena (Zaidi *et al.*, 2018).

Inne podejście to tworzenie nowych genów odporności. Tutaj najbardziej interesującym przykładem jest uzyskanie genu *mlo* w pszenicy warunkującego odporność na mączniaka, ważnego patogena grzybowego. Szczegółowa wiedza o tym typie odporności pochodzi z badań jęczmienia. Strategia jej wykorzystania w pszenicy, mimo iż zaproponowana wiele lat wcześniej, mogła być zrealizowana dopiero przy użyciu CRISPR/Cas9 (Das *et al.*, 2019).

Wielkość plonu i cechy jakościowe produktów

Wielkość plonu roślin uprawnych zależy od dużej liczby genów regulujących procesy związane z plonowaniem. Są to m.in. regulacja kwitnienia, wielkość kwiatów lub kłosów, wielkość i liczba nasion, rozwój systemu korzeniowego, pobieranie i wykorzystanie składników mineralnych, homeostaza hormonalna (Nadolska-Orczyk *et al.*, 2017). Wyniki wielu prac potwierdzają, że edytowanie określonych genów skutkowało ulepszoną charakterystyką tych cech: większym ziarnem, większą masą tysiąca ziarniaków, wyższym plonem, poprawioną architekturą systemu korzeniowego, lepszym pobieraniem składników mineralnych i związków azotowych (Sedeek *et al.*, 2019; Wolter *et al.*, 2019). Uzyskano również rośliny o podniesionej tolerancji na niekorzystne czynniki środowiskowe, okresową suszę lub zasolenie gleby. Badane i ulepszone są również cechy decydujące o jakości produktów żywnościowych (Fiaz *et al.*, 2019; Kumlehn *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2017).

Jednym z ważniejszych i jednocześnie bardzo złożonych zjawisk decydujących o plonie jest heterozja. Termin ten określa znacznie lepsze plonowanie i wyższą żywotność roślin tylko w pierwszym pokoleniu po krzyżowaniu odpowiednio dobranych form rodzicielskich, dlatego ten efekt jest nietrwały i niezbędna jest ciągła produkcja nasion heterozyjnych. Heterozja została odkryta w latach 30. ubiegłego wieku i od tego czasu jest wykorzystywana do uzyskania wysoko plonujących odmian heterozyjnych. Wang i in., (2019) zaproponowali strategię utrwalenia tego efektu przez edytowanie genów związanych z mejozą i zapłodnieniem. Wykorzystanie tego odkrycia może znacznie zmniejszyć koszt produkcji nasion heterozyjnych oraz zwiększyć plonowanie tych gatunków, dla których dotąd nie uzyskano odmian heterozyjnych.

W 2018 roku, zaledwie 6 lat po opublikowaniu cytowanej powyżej pracy w *Science*, odmiany pięciu gatunków uprawnych, tj. pieczarki, soi, lnianki, prosa i kukurydzy czekają na rejestrację i dopuszczenie do uprawy w USA (Waltz, 2018). W roślinach każdej z tych odmian inaktywowano określony gen, co skutkowało powstaniem nowej cechy użytkowej. W pieczarce inaktywowano gen oksydazy polifenolowej, dzięki czemu owocniki nie brązowieją po zranieniu. W soi inaktywacja dwóch genów skutkowała wyższą tolerancją na suszę i zasolenie. W lniance inaktywacja jednego genu powodowała wyższą zawartość oleju w nasionach i wyższy udział kwasów omega-3. Inaktywacja jeszcze innego, pojedynczego genu w prosie powodowała opóźnienie kwitnienia i przedłużenie czasu wegetacji. W kukurydzy inaktywacja genu syntazy amylozy pozwoliła uzyskać rośliny wytwarzające skrobię składającą się wyłącznie z amylopektyny. Ten typ skrobi, używany w dużych ilościach w przemyśle m.in. papierniczym, jest produkowany z ziemniaków lub kukurydzy. Wymaga to jednak dodatkowego procesu frakcjonowania surowej skrobi na amylozę i amylopektynę, co przy tej modyfikacji nie będzie potrzebne. Wyżej wymienione cechy tych pierwszych pięciu odmian dobrze obrazują kierunki i możliwości

hodowli wspomaganą technologią CRISPR/Cas9. Wśród uzyskanych cech należy wymienić zwiększone plonowanie, prozdrowotną zmianę składu oleju, podniesioną tolerancję na stresy środowiskowe i uzyskanie surowca roślinnego do procesów technologicznych.

Ulepszenie odmian upraw sierocych

Obecnie w tzw. rolnictwie towarowym wykorzystana jest niewielka liczba gatunków (m.in. takich jak: pszenica, ryż, kukurydza i soja), których badania i hodowla są bardzo dobrze finansowane ze źródeł publicznych i prywatnych. W odróżnieniu od nich, istnieje znacznie większa liczba gatunków uprawianych lokalnie. Plony z tych roślin, niemające szczególnie dużego znaczenia w globalnym obrocie żywnością, są kluczowe dla wyżywienia lokalnych społeczności w większości Afryki i Azji. Uprawa tych roślin napotyka dokładnie te same trudności jak uprawa gatunków towarowych (zmiany klimatyczne, brak wody i presja patogenów), jednak ograniczone środki powodują, że ich hodowla pozostaje w tyle. Wśród tych gatunków, określanymi terminem uprawy sieroce (*orphan crops*), są m.in. amarantus, proso, sorgo, fasolnik chiński, kassawa, yam, taro czy sezam (Tadele, 2019). Przewiduje się, że technologia edytowania genów będzie jednym z ważniejszych narzędzi pozwalających na szybkie i znacznie mniej kosztochłonne udoskonalanie odmian tych gatunków (Dawson *et al.*, 2019)

Udomowienie dzikich gatunków roślin

Zmiany środowiska rolniczego (degradacja gleby, zasolenie, znaczne ograniczenia zasobów wody) stymulują do poszukiwania gatunków dzikich, których udomowienie mogłoby uzupełnić listę gatunków obecnie uprawianych. Duża wiedza o zmianach genetycznych, które warunkowały udomowienie obecnie uprawianych gatunków, pozwala planować i wykonać analogiczne zmiany w wybranych gatunkach dzikich (Doebley *et al.*, 2006). Dwa przykłady takich gatunków to tobołek polny, roślina potencjalnie oleista, i mniszek lekarski, potencjalny producent lateksu. Badane są również możliwości powtórzenia procesu udomowienia gatunku już uprawianego. Przykładem jest uzyskanie owocującego pomidora z dzikiego gatunku *Solanum pimpinellifolium* (Li *et al.*, 2018). Zmiana wybranych genów związanych m.in. z kwitnieniem i owocowaniem spowodowała, że gatunek dziki nabrał cech użytkowych uprawnego pomidora, zachowując jednocześnie cechy rośliny dzikiej: wysoką tolerancję na stresy środowiskowe, zasolenie gleby oraz odporność na patogeny. Podobnie jak w przypadku ulepszania upraw sierocych również udomowienie nowych gatunków będzie możliwe przy wykorzystaniu wiedzy i pełnej palety metod genetycznych i biotechnologicznych – w tym edytowania genów.

Decyzja Trybunału Sprawiedliwości UE C-528/16 z 18 lipca 2018

Możliwości wykorzystania technologii CRISPR/Cas9 zostały drastycznie zredukowane w wyniku decyzji Trybunału Sprawiedliwości UE (TSUE) z 18 lipca 2018 roku

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

Decyzja ta jest efektem rozpatrywania sprawy zgłoszonej przez francuski związek rolników *Confédération paysanne* (Skarżący) domagający się całkowitego zakazu uprawy odmian odpornych na herbicydy. Obecnie w EU obowiązuje zakaz uprawy takich odmian, ponieważ otrzymano je dzięki technikom rekombinowanego DNA i są sklasyfikowane jako GMO. Odmiany odporne na herbicydy, uzyskane po edytowaniu genów tj. metodą analogiczną do mutagenyzy konwencjonalnej, mogłyby być zwolnione z restrykcyjnej procedury rejestracji i względnie łatwo wprowadzone do uprawy w Europie.

W decyzji C-528/16 dotyczącej tej sprawy TSUE orzekł, że a) rośliny uzyskane po mutagenyzy konwencjonalnej są wyłączone z obligacji, którym podlegają odmiany GM oraz b) rośliny uzyskane innymi metodami mutagenyzy (w tym CRISPR/Cas9) podlegają regulacjom tak, jak inne rośliny GM.

To rozróżnienie roślin uzyskanych po mutagenyzy konwencjonalnej i po edytowaniu Trybunał uzasadnił długą historią bezpiecznego użycia tych pierwszych i, w domyśle, brakiem podobnej historii dla drugich.

Mutagenyza konwencjonalna, edytowanie genów i opinia rzecznika generalnego TSUE *

Mutagenyza konwencjonalna jest od lat 50. ubiegłego wieku powszechnie wykorzystywana do generowania roślin o nowych cechach użytkowych i do hodowli nowych odmian. Szacuje się, że nie mniej niż 3000 odmian gatunków uprawianych nosi cechy w ten sposób uzyskane. Najbardziej spektakularny przykład to wszystkie wysokoplonujące odmiany ryżu, pszenicy i jęczmienia, uzyskane przez Normana Borlauga w trakcie tzw. Zielonej Rewolucji w drugiej połowie XX wieku. Nowe cechy tych roślin, będące efektem mutagenyzy konwencjonalnej, oraz wyższe o kilkadziesiąt procent plony uratowały przed głodem całe populacje w wielu krajach Azji i Afryki a sam Norman Borlaug został uhonorowany za to Pokojową Nagrodą Nobla w roku 1970. Wyjeżdżając poza miasto, możemy z dużym prawdopodobieństwem założyć, że widziane tam zasiewy pszenicy, kukurydzy, rzepaku i wielu innych upraw, zawierają cechy będące efektem mutagenyzy konwencjonalnej.

Mutagenyza konwencjonalna (radiacyjna lub chemiczna) generuje, jak to oszacowano w rzepaku, od 40 do 130 tys. mutacji w losowych miejscach genomu, w każdej roślinie (Harloff *et al.*, 2012). Dla porównania, edytowanie genu przy użyciu CRISPR/Cas9 powoduje zmianę w jednym miejscu jednego genu docelowego oraz może wywołać od kilku do kilkunastu zmian tzw. niedocelowych. Te ostatnie są bardzo łatwe do zidentyfikowania i wyeliminowania. Efektem końcowym edytowania CRISPR/Cas9 może być więc roślina

* Apel otwarty naukowców europejskich będący odpowiedzią na decyzję TSUE zamieszczamy na końcu niniejszego artykułu jako załącznik.

z jedną mutacją zamierzoną i bez mutacji niedocelowych. Co więcej, natura zmian indukowanych jedną i drugą metodą jest ta sama i – w praktyce – są one nieodróżnialne.

Te fakty, dotyczące zarówno mutagenezy konwencjonalnej, jak i mutagenezy po edytowaniu zostały uwzględnione w opinii rzecznika generalnego TSUE (RG TSUE) Michela Bobka, która została przygotowana dla TSUE w styczniu 2018 jako materiał pomocniczy w wyżej omawianej sprawie (<http://curia.europa.eu/juris/document/document.jsf?text=&docid=198532&pageIndex=0&doclang=PL&mode=req&dir=&occ=first&part=1&cid=779292>). W pierwszej części RG TSUE zdefiniował obszar, którego sprawa dotyczy i wskazał dokładny przedmiot sporu. Jest nim żądanie skarżącego, aby zakazana była uprawa odmian odpornych na herbicydy.

W praktyce rolniczej herbicydy są używane do eliminacji z pól roślin innych niż uprawiane (tzw. chwastów). Jest to ważny, decydujący o plonie zabieg agrotechniczny, który można wykonać ręcznie lub, na dużych obszarach, przy użyciu herbicydów. Odmiany odporne na herbicydy pozwalają na łatwą i selektywną eliminację roślin niepożądanych. Od lat 90. ubiegłego wieku rośliny takie uzyskiwano tylko przy użyciu technik rekombinowanego DNA, były zaliczone do GMO i nie były dopuszczone do uprawy na terenie EU. Dla porównania, na świecie odporne na herbicydy odmiany soi, bawełny, kukurydzy i rzepaku były uprawiane na powierzchni 87 mln ha wg danych z roku 2016. (<http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/52/pptslides/default.asp>).

Techniki edytowania genów pozwalają uzyskać rośliny odporne na herbicydy przez kierunkową zmianę określonego genu. W efekcie białko enzymatyczne kodowane przez zmutowany gen, nie tracąc swojej pierwotnej funkcji biologicznej, staje się niewrażliwe na działanie herbicydu. Tak uzyskane odmiany będące efektem *de facto* mutagenezy mogłyby być wyłączone z wymogów stawianych odmianom GM. Mimo iż herbicydy są i będą powszechnie używane przez wszystkich rolników, to odmiany odporne na herbicyd, nawet takie, do których nie wprowadzono żadnego „obcego DNA”, pozostają nieakceptowalne dla ortodoksyjnych przeciwników GMO.

W dalszej części opinii rzecznika generalnego, nawiasem mówiąc bardzo interesującej i wartej przeczytania, jest analiza prawna sporu (podsumowanie w akapicie 104), przedstawienie stanowiska (akapit 107) oraz wnioski końcowe (część V).

Z tej części pochodzą dwa cytaty będące podsumowaniem opinii:

- 1) „Organizmy uzyskane w drodze mutagenezy są organizmami zmodyfikowanymi genetycznie (...)”,
- 2) „Wyłączenie (...) obejmuje wszystkie organizmy uzyskane dowolną techniką mutagenezy, niezależnie od tego, czy dana technika była stosowana w dniu przyjęcia tej dyrektywy, pod warunkiem że technika ta nie obejmuje wykorzystania rekombinowanych części kwasu nukleinowego lub organizmów zmodyfikowanych genetycznie innych niż uzyskane za pomocą jednej lub większej liczby metod wymienionych w załączniku I B.”

Decyzją C-528/16, TSUE odrzucił argumentację rzecznika generalnego i, przychylając się do żądania związku rolników, włączył wszystkie organizmy uzyskane w drodze mutagenезy, z wyjątkiem mutagenезy konwencjonalnej, do obligacji przewidzianych dla GMO.

W praktyce konsekwencją tej decyzji jest zablokowanie wszystkich korzyści, które ta zupełnie nowa technologia oferuje w rolnictwie i produkcji żywności. Oceniając takie podejście do edytowania genów w roślinach, należy wiedzieć, że zdecydowana większość zastosowań CRISPR/Cas9 to nie rośliny, ale farmacja, techniki diagnostyczne i terapie chorób człowieka (<https://www.cell.com/molecular-therapy-family/molecular-therapy/collections/gene-editing-technology-applications>). Ten obszar jest wyłączony z definicji GMO i, ponieważ w oczywisty sposób niezbędny, nie budzi żadnych kontrowersji.

Komentarze i opinie specjalistów wyrażane na łamach najważniejszych czasopism naukowych krótko po opublikowaniu decyzji TSUE są zgodne: decyzja nie jest merytoryczna, a jej konsekwencją dla Europy będzie eliminacja bardzo ważnej technologii i zahamowanie dziedzin związanych z produkcją żywności (Callaway, 2018). Wśród przewidywanych, najważniejszych efektów długofalowych są m.in. znacznie ograniczone możliwości uzyskiwania roślin adaptowanych do szybko zmieniającego się środowiska oraz spadek konkurencyjności rolnictwa europejskiego.

Należy jeszcze raz bardzo mocno podkreślić, że:

- i) uzyskane po edytowaniu odmiany są biologicznym i użytkowym odpowiednikiem odmian konwencjonalnych,
- ii) typ zmian indukowanych przez CRISPR/Cas9 jest nieodróżnialny żadnymi testami od identycznych zmian indukowanych mutagenезą konwencjonalną,
- iii) mutacja indukowana przez CRISPR/Cas9 jest potencjalnie bezpieczniejsza od mutagenезy konwencjonalnej, ponieważ wywołana zmiana jest rzeczywiście pojedyncza, jest ona w określonym, znanym miejscu w genomie. Mutagenезa konwencjonalna wywołuje kilkadziesiąt tysięcy zmian w każdej roślinie, które są losowo rozrzucone po całym genomie.

Decyzja TSUE, obowiązująca na terenie UE, nie zmieni bardzo dużego zainteresowania tą technologią ani jej coraz większego wykorzystania w hodowli roślin. Globalny rynek najważniejszych produktów żywnościowych i pasz będzie zasilany przez coraz większą liczbę odmian uzyskanych w wyniku mutagenезy zależnej od CRISPR/Cas9. Odmiany te są nieodróżnialne od swoich odpowiedników (potencjalnych lub rzeczywistych) uzyskanych po mutagenезie konwencjonalnej, jednak ich uprawa będzie administracyjnie zablokowana w krajach UE.

Przewidując negatywne konsekwencje decyzji TSUE naukowcy europejscy wystosowali apel otwarty, zamieszczony poniżej tego opracowania, do Parlamentu Europejskiego i Komisji Europejskiej o zharmonizowanie norm prawnych w EU z normami

w innych krajach tak, aby rośliny użytkowe udoskonalone tymi metodami mogły być uprawiane w krajach EU.

Na uwagę zasługuje również europejska inicjatywa obywatelska „Grow Scientific Progress – Crops Matter” <https://www.growscientificprogress.org/> mająca dokładnie ten sam wydźwięk jak niżej publikowany apel otwarty wypracowany przez Komitet Biotechnologii Polskiej Akademii Nauk. W Polsce wszystkie te działania są aktywnie wspierane przez Komitet Biotechnologii Polskiej Akademii Nauk oraz wiele jednostek i zespołów naukowych.

Literatura

- Callaway E. 2018. *EU law deals blow to CRISPR crops*. Nature 560.
- Das A., Sharma N., Prasad M. 2019. *CRISPR/Cas9: A Novel Weapon in the Arsenal to Combat Plant Diseases*. Frontiers in Plant Science 9.
- Dash P.K., Kaminski R., Bella R., Su H., Mathews S., Ahooyi T.M., Chen C., Mancuso P., Sariyer R., Ferrante P., Donadoni M., Robinson J.A., Sillman B., Lin Z.Y., Hilaire J.R., Banoub M., Elango M., Gautam N., Mosley R.L., Poluektova L.Y., McMillan J., Bade A.N., Gorantla S., Sariyer I.K., Burdo T.H., Young W.B., Amini S., Gordon J., Jacobson J.M., Edagwa B., Khalili K., Gendelman H.E. 2019. *Sequential LASER ART and CRISPR Treatments Eliminate HIV-1 in a Subset of Infected Humanized Mice*. Nature Communications 10.
- Dawson I.K., Powell W., Hendre P., Bancic J., Hickey J.M., Kindt R., Hoad S., Hale I., Jamnadass R. 2019. *The role of genetics in mainstreaming the production of new and orphan crops to diversify food systems and support human nutrition*. New Phytol. 224, 37–54.
- Doebley J.F., Gaut B.S., Smith B.D. 2006. *The molecular genetics of crop domestication*. Cell 127, 1309–1321.
- Fiaz S., Ahmad S., Noor M.A., Wang X.K., Younas A., Riaz A., Riaz A., Ali F. 2019. *Applications of the CRISPR/Cas9 System for Rice Grain Quality Improvement: Perspectives and Opportunities*. Int. J. Mol. Sci. 20.
- Harloff H.F., Mittasch J., Dreyer F., Lemcke S., Frolov A., Leckband G., Wu J.G., Jung C. 2012. *A mutation screening platform for rapeseed (Brassica napus L.) and the detection of sinapine biosynthesis mutants*. Theor. Appl. Genet. 124, 957–969.
- Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna A.J., Charpentier E. 2012. *A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity*. Science 337, 816–821.
- Kumlehn J., Pietralla J., Hensel G., Pacher M., Puchta H. 2018. *The CRISPR/Cas revolution continues: From efficient gene editing for crop breeding to plant synthetic biology*. J. Integr. Plant Biol. 60, 1127–1153.
- Li T., Yang X., Yu Y., Si X., Zhai X., Zhang H., Dong W., Gao C., Xu C. 2018. *Domestication of wild tomato is accelerated by genome editing*. Nat. Biotechnol. 36, 1160–1163.
- Nadolska-Orczyk A., Rajchel I.K., Orczyk W., Gasparis S. 2017. *Major genes determining yield-related traits in wheat and barley*. Theoretical and Applied Genetics 130, 1081–1098.
- Sedeek K.E.M., Mahas A., Mahfouz M. 2019. *Plant Genome Engineering for Targeted Improvement of Crop Traits*. Frontiers in Plant Science 10, 114.
- Sun Y.W., Jiao G.A., Liu Z.P., Zhang X., Li J.Y., Guo X.P., Du W.M., Du J.L., Francis F., Zhao

- Y.D., Xia L.Q. 2017. *Generation of High-Amylose Rice through CRISPR/Cas9-Mediated Targeted Mutagenesis of Starch Branching Enzymes*. *Frontiers in Plant Science* 8.
- Tadele Z. 2019. *Orphan crops: their importance and the urgency of improvement*. *Planta* 250, 677–694.
- Waltz E. 2018. *With a free pass, CRISPR-edited plants reach market in record time*. *Nat. Biotechnol.* 36, 6.
- Wang Y.P., Cheng X., Shan Q.W., Zhang Y., Liu J.X., Gao C.X., Qiu J.L. 2014. *Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew*. *Nat. Biotechnol.* 32, 947–951.
- Wolter F., Schindele P., Puchta H. 2019. *Plant breeding at the speed of light: the power of CRISPR/Cas to generate directed genetic diversity at multiple sites*. *BMC Plant Biol.* 19, 176.
- Zaidi S., Mukhtar M.S., Mansoor S. 2018. *Genome Editing: Targeting Susceptibility Genes for Plant Disease Resistance*. *Trends Biotechnol.* 36, 898–906.

Genome editing of crop plants. Facts, no myths

Article published in *Science*, 2012 by Jennifer A. Doudna, Emmanuelle Charpentier and their team presented a novel tool named as CRISPR/Cas9. The original CRISPR/Cas9 tool and the whole system developed from it since then allow making precise changes in the nucleotide sequence in the defined locus of the genome. The article presents the already known as well the potential future applications of the system for improvement of cultivated plants. The separate section is devoted to present the background of the Court of Justice decision C-528/16. Discussed are the far reaching negative consequences of this, based not on the merit decision, for the future of European green biotechnology.

Key words: conventional mutagenesis, Court of Justice C-528/16, CRISPR/Cas9 cultivated plants, domestication, genome editing, orphan crops, pathogen resistance, yield and yield quality

Załącznik

Apel otwarty naukowców europejskich

Naukowcy europejscy pilnie zwracają się do nowo wybranego Parlamentu Europejskiego i Komisji Europejskiej o podjęcie działań zmierzających do dopuszczenia stosowania metod edycji genomów dla zrównoważonego rolnictwa i produkcji żywności.

Europejskie rolnictwo może mieć znaczący wkład w realizację **wyznaczonych przez ONZ celów zrównoważonego rozwoju**. Metody precyzyjnej hodowli roślin, takie jak edycja genomów za pomocą innowacyjnych narzędzi typu CRISPR, pomogą szybciej i skuteczniej osiągnąć te cele.

Aktualna interpretacja prawodawstwa europejskiego (TSUE, sprawa C-528/16) **uniemożliwia stosowanie edycji genomów w zrównoważonym rolnictwie** i produkcji żywności w UE.

Poprawa prawodawstwa europejskiego zharmonizuje je z normami prawnymi w innych krajach i umożliwi europejskim naukowcom, hodowcom, rolnikom i producentom wykorzystanie edycji genomów jako jednego z narzędzi rozwiązywania problemów zagrażających naszej planecie.

Należą do nich rosnąca populacja światowa przy jednoczesnym, alarmującym tempie zmniejszania się różnorodności biologicznej oraz wzrost średniej temperatury na Ziemi. Aby zmierzyć się z tymi i innymi globalnymi wyzwaniami, będziemy musieli nie tylko zmienić mentalność i styl życia, lecz także zwiększyć inwestycje w naukę i ułatwić korzystanie z innowacyjnych technologii.

W konsekwencji rolnictwo i produkcja żywności muszą stać się bardziej zrównoważone. Oznacza to, że z jednej strony ślad ekologiczny rolnictwa musi się zmniejszyć, a z drugiej rolnictwo musi dostosować się do szybko zmieniającego się klimatu. Susza jest jednym z głównych czynników zagrażających plonom. Jesteśmy tego świadkami już dzisiaj w Europie. Rozwiązania tych problemów należy poszukiwać na wiele możliwych sposobów. Doskonalenie odmian roślin ma olbrzymi potencjał, realnie pozwalając otrzymać rośliny, które są mniej podatne na patogeny i bardziej odporne na suszę. **Umożliwi to rolnikom produkcję wysokich plonów przy jednoczesnym zmniejszeniu zużycia chemikaliów i wody***.

* Fungicydy, czyli substancje chemiczne do zwalczania grzybowych chorób roślin, tracą na znaczeniu w uprawie pszenicy dzięki hodowli precyzyjnej. Naukowcy wykorzystali nowoczesne techniki hodowli precyzyjnej do opracowania odmian pszenicy odpornych na mączniaka prawdziwego, główną chorobę grzybową tej rośliny. Tylko w jednym kroku wprowadzili niewielką zmianę

Aby opracować takie odmiany, naukowcy i hodowcy roślin muszą mieć dostęp do możliwie najszerszej gamy narzędzi i metod hodowlanych. Najnowszym odkryciem wzbogacającym zestaw narzędzi hodowcy nowych odmian jest CRISPR. Narzędzie to pozwala naukowcom i hodowcom dokonywać precyzyjnych mutacji i tym samym ulepszać odmiany roślin w szybszy, stosunkowo prosty i znacznie bardziej ukierunkowany sposób w porównaniu z dotychczasowymi technikami hodowlanymi obejmującymi inne rodzaje mutagenyzy. **Naukowcy i hodowcy w UE powinni mieć możliwość wykorzystania precyzyjnych technik hodowlanych takich jak CRISPR, przyczyniając się do bardziej zrównoważonego rolnictwa i zrównoważonej produkcji żywności.**

25 lipca 2018 r. Trybunał Sprawiedliwości Unii Europejskiej orzekł, że rośliny uzyskane za pomocą precyzyjnych technik hodowlanych, takich jak CRISPR, są organizmami zmodyfikowanymi genetycznie (GMO), które w przeciwieństwie do odmian otrzymanych znacznie mniej precyzyjnymi metodami mutagenyzy nie są wyłączone z prawodawstwa dotyczącego GMO. W konsekwencji nawet rośliny o najmniejszych zmianach, w których pośredniczył CRISPR i które w perspektywie bardzo długiego czasu mogłyby również powstać spontanicznie w naturze, podlegają tym przepisom. Zastosowanie europejskiego prawodawstwa dotyczącego GMO stanowi nieuzasadniony próg regulacyjny i jest szczególnie problematyczne dla instytutów badawczych i małych firm hodowlanych. Spełnienie takich samych wymogów jak dla konwencjonalnych GMO jest bezzasadnie skomplikowane i zbyt drogie, aby je spełniły mniejsze, ale naukowo doskonale instytucje.

Unijne prawodawstwo dotyczące GMO zostało uchwalone w 2001 r. i już nie odzwierciedla obecnego stanu wiedzy naukowej. Nie ma naukowych przesłanek, aby traktować **rośliny poddane edycji genomu** inaczej niż konwencjonalne odmiany roślin uprawnych, które mają podobne zmiany uzyskane innymi metodami. Rośliny, które przeszły proste i ukierunkowane edycje genomu za pomocą precyzyjnej hodowli i które nie zawierają obcych genów, **są przynajmniej tak samo bezpieczne jak odmiany powstałe przy użyciu konwencjonalnych technik hodowlanych.**

Konsekwencją orzeczenia TSUE jest to, że stosowanie precyzyjnych technik hodowlanych, takich jak CRISPR, staje się przywilejem wybranej grupy dużych międzynarodowych firm wykorzystujących je tylko w gatunkach głównych roślin uprawnych gwarantujących największe zyski finansowe.

w tak zwanym genie *MLO*, która nadaje odporność na mączniaka. Ten typ zmiany genu *MLO* już istnieje w naturze, ale wprowadzenie go za pomocą konwencjonalnych metod hodowlanych jest bardzo trudne i czasochłonne. Jest to jasny przykład, który pokazuje, jak innowacyjne metody, takie jak CRISPR, mogą znacznie przyspieszyć wprowadzanie korzystnych cech do odmian uprawnych. Podsumowując – uprawa pszenicy *MLO* praktycznie nie będzie wymagać stosowania fungicydów w celu zapobiegania chorobom, dzięki czemu jest idealną rośliną dla rolnictwa zrównoważonego.

Niemożność wprowadzenia na europejski rynek odmian genomowo zedytowanych spowoduje zahamowanie inwestycji w badania i rozwój w europejskim sektorze hodowlanym. W rezultacie dalszy rozwój udoskonalonych odmian w szybszy i bardziej ukierunkowany sposób zostanie w Europie zatrzymany, podczas gdy reszta świata będzie technologię edycji genomu z powodzeniem wykorzystywać.

Unijne przepisy dotyczące GMO różnią się od prawodawstwa w wielu innych krajach. Ich przepisy są bardziej dostosowane do obecnego stanu wiedzy naukowej, wyłączając rośliny ze zmianami mogącymi wystąpić naturalnie lub wynikającymi z konwencjonalnej działalności hodowlanej. **Innymi słowy, w tych krajach rośliny poddane edycji genomu nie podlegają prawodawstwu GMO, umożliwiając naukowcom i hodowcom wykorzystanie edycji genomu dla zrównoważonego rolnictwa i produkcji żywności.**

Różnica w podejściu legislacyjnym doprowadzi prawdopodobnie do zakłóceń w handlu międzynarodowym i wpłynie na bezpieczeństwo żywnościowe w Europie. Jak wspomniano wcześniej, niewielkie zmiany wprowadzone przez precyzyjną hodowlę pojawiają się również spontanicznie w przyrodzie. W związku z tym, że nie jest możliwe określenie pochodzenia tak małych zmian, obecne prawodawstwo UE dotyczące GMO nie może być egzekwowane w odniesieniu do produktów importowanych. **Niewielka zmiana prawodawstwa europejskiego przez harmonizację ram prawnych z innymi krajami świata ma kluczowe znaczenie dla umożliwienia europejskim naukowcom i hodowcom stosowania precyzyjnych metod hodowli, takich jak CRISPR, jako jednego z narzędzi do sprostania globalnym wyzwaniom zrównoważonego rozwoju.** Uwolni to postęp naukowy dla rozwiązywania obecnych problemów cywilizacyjnych.

Europejska społeczność naukowa, sygnatariusze tego apelu, pilnie wzywają instytucje europejskie, w tym Radę Europejską, nowy Parlament Europejski i nową Komisję Europejską, do podjęcia odpowiednich działań prawnych, aby umożliwić europejskim naukowcom i hodowcom zastosowanie edycji genomów dla zrównoważonego rolnictwa. Wykorzystanie edycji genomów ma kluczowe znaczenie dla utrzymania poziomu życia i bezpieczeństwa żywnościowego obywateli europejskich.

UE utrzymuje wysoki standard bezpieczeństwa żywności i środowiska

Należy zauważyć, że niepodleganie przepisom dotyczącym GMO nie oznacza, że takie uprawy i żywność nie podlegają kontroli i prawnym regulacjom. Istnieją ogólne przepisy dotyczące bezpieczeństwa żywności, które stanowią, że żywność wprowadzana na rynek europejski musi być bezpieczna, a prawodawstwo dotyczące ochrony środowiska pociąga uczestników rynku do odpowiedzialności w przypadku wprowadzenia do środowiska upraw powodujących szkody dla różnorodności biologicznej i chronionych siedlisk.