Оценка на риска и критерии за оценка на риска от растения, произведени чрез целеви мутагенеза, цисгенеза и интрагенеза

Оценка на риска

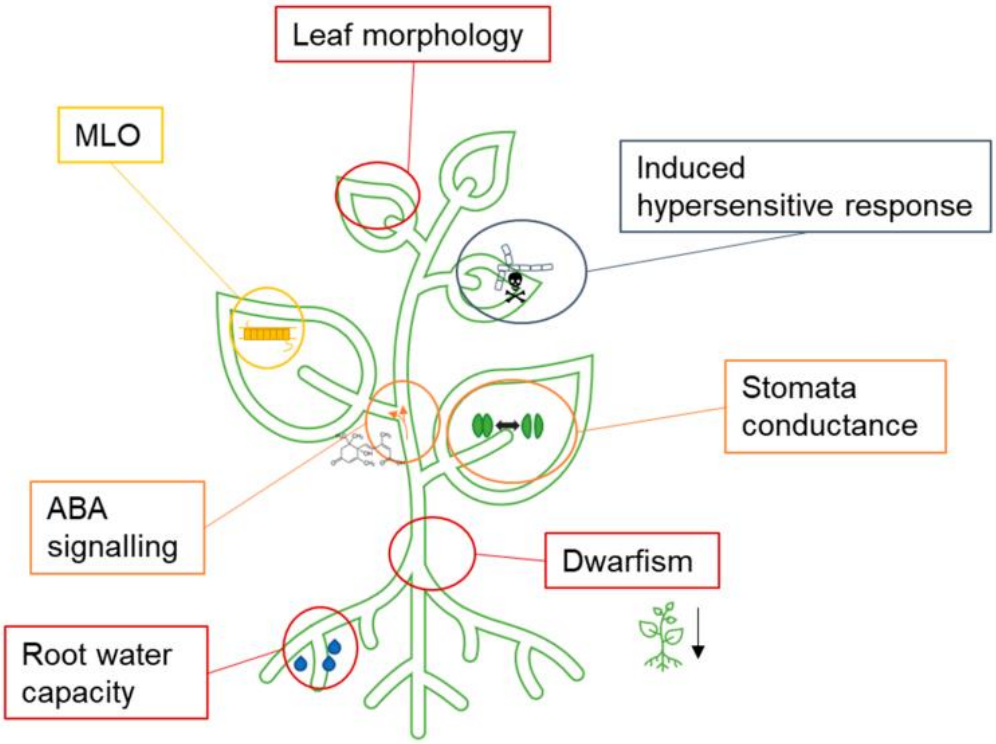
През последните десетилетия напредъкът в биотехнологиите доведе до **разработването на нови геномни техники (NGT)**, т.е. техники, **способни да променят генетичния материал на организъм, които са се появили или са разработени след 2001 г.**, а съгласно Директива 2001/18/ЕО бе прието съзнателното освобождаване на генетично модифицираните организми (ГМО) в околната среда. Съдът на ЕС през 2018 г. дава разяснението, че организмите, произведени чрез целенасочена мутагенеза, са ГМО, предмет на изискванията в ГМО законодателството на ЕС. **Техниките за целенасочена мутагенеза** са **нови геномни техники (NGT)**, за разлика от техниките за произволна мутагенеза. Въз основа на законодателството за ГМО, **определенията и законовите норми важат и за организми, произведени от други NGT, включително техники за цисгенеза**.

Генетичните техники **мутагенеза, цисгенеза и интрагенеза** са генетични инженерни техники, процеси, които **променят генетичната структура на организма чрез модифициране, премахване или въвеждане на ДНК**.

Целева мутагенеза е общ термин, използван за описване на техники, които **предизвикват специфични мутации в избрани целеви локуси в генома**. Промените настъпват без въвеждане на генетичен материал.

Цисгенезата се отнася до **модифициране на генетичния материал на организъм с последователност от същия вид или тясно свързан такъв**. **Новата последователност** съдържа **точно копие на секвенцията, която вече присъства в генетичния фонд на селекционерите**, което представлява съвкупността от цялата генетична информация за даден вид, която е на разположение за използване от селекционерите в растениевъдството.

Интрагенезата се отнася до **модифициране на генетичния материал на организма с комбинация от различни последователности от един и същ вид или един тясно свързан**. **Новата последователност** съдържа **преподредено копие на секвенциите, които вече присъстват в генетичния фонд на селекционерите**.



Фигура 1: Преглед на целевите характеристики, модифицирани посредством NGT: характеристики на устойчивост на суша и устойчивост на патогени, морфологични промени като толерантност към суша, вътреклетъчни промени, R гени, S гени, MLO (Локус О), ABA, абсцицинова киселина.

Нови геномни техники е **сборен термин за редица биотехнологични инструменти, най-известните от които са сайт-насочени нуклеази (SDN)**, като например генните ножици **CRISPR/Cas**. Новото **редактиране на генома (NGE)** може да предизвика **широк спектър от различни промени в целевите области на растителните геноми**, вариращи от **едноточкови мутации** до **много сложни промени** (напр. промяна на **множество гени едновременно или въвеждане на трансгени**). Тези технологии могат, но не непременно, да въведат нова генетична информация от други видове. Те обаче могат да доведат до различни мутации, **причиняващи специфични модели на генетични промени** (т.е. генотипове), които **могат да доведат до нови черти (т.е. фенотипове)**, които могат да **надхвърлят това, което е постижимо с конвенционалното развъждане**, и които **могат да «избягат» от границите на организацията на генома**, като естествено ограничават резултата от конвенционалното развъждане (*Kawall, 2019*). Например, Bt токсините в растенията се появяват само ако растенията са трансгенни и същото важи за много генотипове и фенотипове на растения, получени от NGE. Това е така, дори ако не са вмъкнати допълнителни гени, както се вижда от примери като пшеница, за която се предполага, че има по-малко глутен (*Sánchez-Leon et al., 2018*) или по-малко акриламид (*Raffan et al., 2021*), домати с повишено съдържание на GABA (*Nonaka et al., 2017*) и камелина с промени в масления състав (*Kawall, 2021*). **Предвидените характеристики в растенията, споменати по-горе, са свързани със специфични рискове за потребителите (напр. производство**

на нови протеини или други промени в растителния състав), както и за земеделието (напр. повишена чувствителност към болести по растенията или вредители по растенията) и околната среда (например прекъсване или нарушаване на междувидовата взаимовръзка).

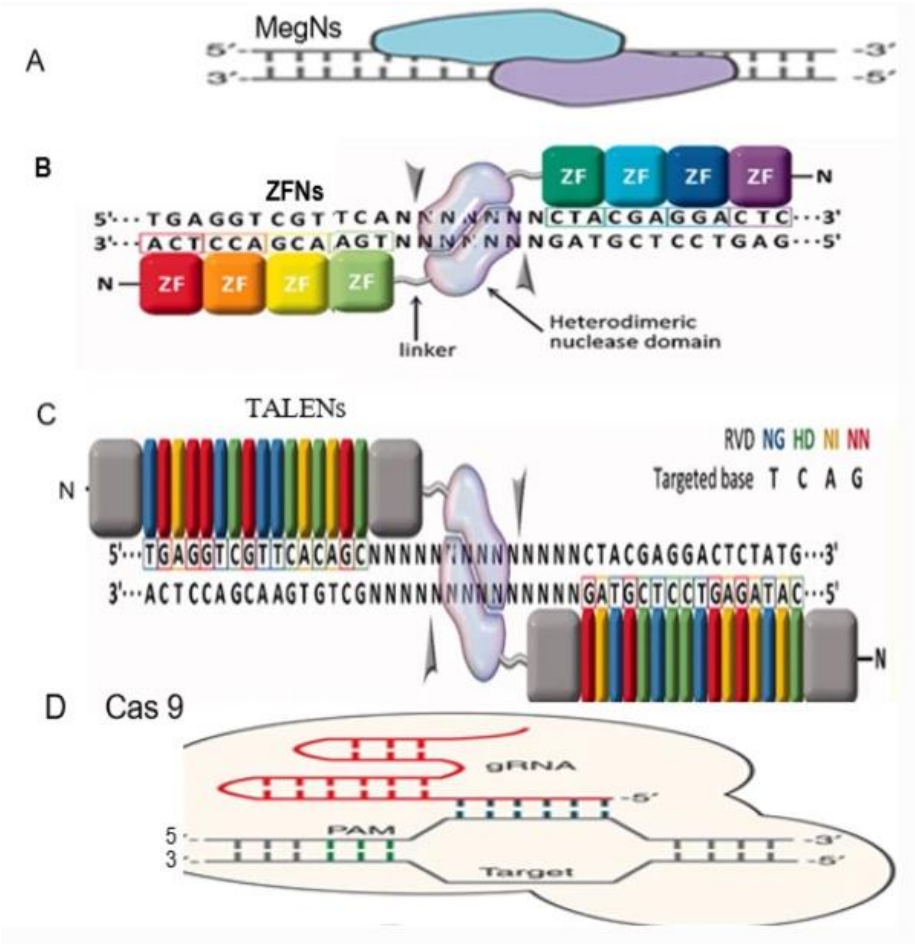
Важно е, че рисковете от прилагането на новите геномни техники в растенията не са причинени само от предвидените характеристики, но също и от техническите процеси: например в повечето случаи една от първите стъпки в NGE включва използването на по-стари техники за генно инженерство за вмъкване на ДНК за генните ножици в растителните клетки. Известно е, че **тези нецелеви методи** (като „*gene gun*“ и използване на *Agrobacterium tumefaciens*) **предизвикват непреднамерени промени в генома или епигенома на растението** (*Forsbach et al., 2003; Gelvin, 2017; Jupe et al., 2019; Liu et al., 2019; Makarevitch et al., 2003; Windels et al., 2003*).

В допълнение, **действието на генните ножици може да бъде неточно**, напр. **рязане на грешни места в генома или неволно вмъкване на допълнителна ДНК**, като по този начин причинява **непредвидено производство на нови биологично активни молекули** (като протеини или РНК) или **неволна намеса в генната регулация**. **Тези нежелани ефекти**, произтичащи от техническия процес, могат да възникнат на целевото място или на други места в генома („извън целта“) (*Biswas et al., 2020; Kapahnke et al., 2016 Kosicki et al., 2018; Lalonde et al., 2017; Höijer, et al., 2021*) и могат да бъдат много различни от спонтанните промени в генома. Причината: **подобно на планираните ефекти, нежеланите ефекти могат да «избягат» от границите на естествената организация на генома** (*Testbiotech 2021b, Eckerstorfer et al., 2021; Kawall et al., 2020*).

Докладът на JRC (JRC, 2021 г.) разделя **NGT на четири основни групи**:

- **Група 1** се състои от NGT, които създават DSB в ДНК. Тази група включва т.нар. „сайт насочени нуклеази (SDN)“.
- **Група 2** се състои от NGT, които създават едноверижни скъсвания (SSB) или никакво скъсване в ДНК веригите.
- **Група 3** включва техники, които засягат епигенома, с промени, които засягат начина, по който се експресира ДНК.
- **Група 4** включва NGT, които действат директно върху РНК, а не върху ДНК.

Група 1 включва техники, които разчитат на индукция на DSB, последван от опит на клетката да го поправи. Гамата от молекулярни инструменти, които могат да причинят DSB, включва **SDN** и ензими, които разпознават целевата ДНК чрез взаимодействия протеин-ДНК, като **ендонуклеази**, **нуклеази тип цинкови пръсти** (ZFN) и **наподобяващи транскрипция активаторни нуклеази** (TALEN) и **нуклеази, които разчитат на целенасочено взаимодействие между РНК и ДНК** (система CRISPR/Cas9).



Фигура 2: Схематична диаграма на четирите типа ендонуклеази, използвани в технологиите за редактиране на гени/геноми: A: мегануклеази (MegN), които обикновено разцепват своя ДНК субстрат като хомодимер. В Нуклеази тип цинкови пръсти (ZFN) разпознават своите целеви места, които са съставени от два мономера с цинкови краища, които обграждат къса спейсерна последователност, разпозната от домейна на разцепване fokI. C: Подобна на активатор на транскрипция ефекторна нуклеаза (TALEN) се състои от два мономера; TALEN разпознава целеви сайтове, които обграждат fok1 нуклеазен домен, за да предизвикат разцепване на ДНК. D: Системата CRISPR/Cas9 е изградена от протеин Cas9 с два нуклеазни домена, както и единична водеща РНК (sgRNA).

Като се има предвид новото определение за цисгенеза/интрагенеза, експертната група по ГМО счита SDN-3 от група 1, за най-подходящата техника.

Група 2 съдържа **механизми за редактиране на генома**, които **индуцират SSB**, вместо DSB. **Олигонасочена мутагенеза**, **базово редактиране** и **първично редактиране** принадлежат към тази група, но последната е единствената, разглеждана в рамките на мандата на ЕК, тъй като е доказано, че позволява вмъкване на дълги екзогенни последователности (& 100 bp), в целевия локус (*Anzalone et al., 2022*).

Първичното редактиране (PE) изисква **cas протеин**, способен да **произвежда SSB**, заедно с **обратна транскриптаза (RT), и основен гайд локус за редактиране на РНК** (pegRNA), който разпознава целевия сайт. RT копира РНК на водещия локус в

ДНК, вмъквайки желаната модификация (*Anzalone et al., 2019*). Съобщава се за сравнително нова вариация на PE, наречена TwinPE, която използва две pegRNA, всяка насочена към различна ДНК верига. При действието на RT всяка pegRNA създава 3' шапка, образувайки междинна последователност, която замества оригиналните последователности. **Предимството на тази техника** е **възможността за вмъкване на много по-големи екзогенни последователности**, в сравнение с вмъкването, постижимо с конвенционалното PE (*Anzalone et al., 2022*).

Горепосочените техники имат отношение към настоящия мандат, но не представляват изчерпателен списък, тъй като тези технологии търпят постоянно развитие.

<u>В обобщение</u> може да се каже, че **няма такова нещо като „безплатен обяд“**: огромният технически потенциал на инструменти, като генни ножици CRISPR/Cas, също предизвиква нови и специфични рискове. И двете: предназначените промени и нежеланите ефекти могат да се различават значително от тези, които могат да бъдат причинени от нецеленасочена мутагенеза и конвенционални кръстосвания. Следователно **не могат да се направят общи заключения относно безопасността на растенията, получени от процесите на NGE, без подробна оценка на риска**.

Таблица 1: Видове култури и техники за модификация на растенията посредством NGT, които са в процес на разработка и изпитване:

Plant	Intended Trait	Loci	Genetic Changes	Method	Development Stage	Reported Effect
Glycine max, soybean	Drought and salt tolerance	GmDrb2a and GmDrb2b	Knock-out mutations in GmDrb2a and GmDrb2b (SDN1)	CRISPR/Cas	Field trial registered (USDA)	Not described—in Arabidopsis AtDRB2 dependent micro-RNAs are involved in the abiotic stress response
Zea mays, maize	Improved drought tolerance and yield stability	Confidential information deleted	Base editing in not-specified genes (SDN2)	CRISPR/Cas	Field trial registered (USDA)	Not described in detail: plants with improved drought tolerance and yield stability
Zea mays, maize	Improved drought tolerance and corn yield	*Cis*-regulatory region of ARGOS8	Exchange of the promoter (SDN3) -> change in the expression of the transcription factor ARGOS8	CRISPR/Cas	Field trials 2015; 8 locations in the US in total, each with random block design	Increase in grain yield by 2–3% under drought stress at flowering time. No increase (slight decrease 2–3%) under drought stress during grain ripening
Oryza sativa, rice	Drought tolerance	OsABA8ox2	Knock-out mutation in OsABA8ox2 (SDN1)	CRISPR/Cas	Crop—greenhouse/lab trial	Improved drought tolerance through increased ABA sensitivity, reduced ABA degradation and vertical root growth
Oryza sativa, rice	Drought tolerance	OsSRL1 and OsSRL2	Knock-out mutation in OsSRL1 and OsSRL2 (SDN1); subsequent hybridisation with wild type	CRISPR/Cas	Crop—greenhouse/lab trial	Increased survival rate under drought stress, but slightly lower yield under unstressed conditions; in hybrid plants with half-rolled leaves the yield was slightly higher than that of wild-type lines
Oryza sativa, rice	Drought tolerance	OsSRL1 and OsSRL2	Knock-out mutation in OsSRL1 and OsSRL2 (SDN1); subsequent hybridisation with wild type	CRISPR/Cas	Crop—greenhouse/lab trial	Increased survival rate under drought stress, but slightly lower yield under unstressed conditions; in hybrid plants with half-rolled leaves the yield was slightly higher than that of wild-type lines
Brassica napus, canola	Drought tolerance	BnaRGA, BnaA6.RGA	Quadruple knock-out mutant of the BnaRGA gene and simple gain-of-function mutant in the BnaA6.RGA gene (SDN1)	CRISPR/Cas	Crop—greenhouse/lab trial	Gain-of-function mutant with increased drought tolerance and higher ABA sensitivity than wild type, quadruple mutant with low drought tolerance

Arabidopsis	Drought tolerance	*cis*-regulatory region of AtAREB1	Activation of gene expression through modification of the chromatin status by AtHAT1 (SDN2) in the cis-regulatory region of AtAREB1	CRISPR-dCas9HAT	In model organism	Higher gene expression of AtAREB1; dwarf phenotype; faster stomatal closure and better survival rate under drought stress
Arabidopsis	Functional analysis under abiotic stress	HSFA6a und HSFA6b	Knock-out mutations in HSFA6a und HSFA6b (SDN1)	CRISPR/Cas	In model organism	Double mutant with abiotic and osmotic stress tolerance
Glycine max, soybean	Functional analysis under abiotic stress	GmMYB118	Knock-out mutation in GmMYB118 (SDN1) and overexpression	CRISPR/Cas and genetic engineering	Crop—greenhouse/lab trial	Reduced tolerance and lower proline and chlorophyll content in the knock-out—improved properties in the overexpression
Oryza sativa, rice	Functional analysis under abiotic stress	OsNCED3	Knock-out mutation in OsNCED3 (SDN1) and overexpression	CRISPR/Cas and genetic engineering	Crop—greenhouse/lab trial	Reduced tolerance to drought, longer growth, more open stomata due to lower ABA levels in the knock-out—improvement compared to wild type in the overexpression
Oryza sativa rice	Functional analysis under abiotic stress	OsDST	Knock-out mutation in OsDST (SDN1)	CRISPR/Cas	Crop—greenhouse/lab trial	Lower stomatal density and improved water balance under drought stress; high salt stress tolerance; no noticeable phenotype under normal conditions
Solanum lycopersicum, tomato	Functional analysis under abiotic stress	SlMAPK3	Knock-out mutation in SlMPAK3 (SDN1)	CRISPR/Cas	Crop—greenhouse/lab trial	Lower drought tolerance and stronger wilt syndrome in knock-out plants
Solanum lycopersicum, tomato	Functional analysis under abiotic stress	SlNPR1	Knock-out mutation in SlNPR1 (SDN1)	CRISPR/Cas	Crop—greenhouse/lab trial	Lower drought tolerance and more open stomata in knock-out plants
Solanum lycopersicum, tomato	Functional analysis under abiotic stress	SlLBD40	Knock-out mutation in SlBD40 (SDN1) & overexpression	CRISPR/Cas and genetic engineering	Crop—greenhouse/lab trial	Improved drought tolerance in knock-out lines due to increased water retention capacity—overexpression led to a lower drought tolerance
Cicer arietinum, chickpea	Functional analysis under drought stress and method	Ca4CL, CaRVE1	Knock-out mutations in Ca4CL, CaRVE1	CRISPR/Cas	Crop—greenhouse/lab trial	Validation of genome-editing method in chickpea using protoplast transfection
Triticum aestivum, wheat	Drought tolerance	TaERF3 and TaDREB2	Knock-out mutations in TaERF3 and TaDREB2 (SDN1)	CRISPR/Cas	Crop—greenhouse/lab trial	DREB2 and ERF3 were identified in wheat and rice as important genes in the drought stress response; in wheat, the expression of TaERF3 and TaDREB2 reacts to drought stress

Таблица 2: Преглед на растенията в процес на разработване посредством NGT, насочени към устойчивост към нишковидни патогени:

Plant	Intended Trait	Loci	Genetic Changes	Method	Development Stage	Reported Effect
Brassica napus, canola	Fungi pathogen resistance	Confidential information deleted	Confidential information deleted	Gene editing, not specified	Registered for commercialisation	Resistance to fungal pathogens
Oryza sativa japonica, rice	Resistance to rice blast	OsERF922	Knock-out mutation (SDN1)	CRISPR/Cas	Crop—field trial/greenhouse	~50–70% higher resistance
Citrullus lanatus, water melon	Resistance to *Fusarium oxysporum*	ClPSK1	Knock-out mutation (SDN1)	CRISPR/Cas	Crop—greenhouse/lab trial	19–60% higher resistance
Solanum lycopersicum, tomato	Multi-resistance	SlDMR6	Knock-out mutation (SDN1)	CRISPR/Cas	Crop—greenhouse/lab trial	~20% higher resistance to 3 pathogens
Solanum lycopersicum, tomato	Resistance to powdery mildew	SlMLO1	Knock-out mutation (SDN1)	CRISPR/Cas	Crop—greenhouse/lab trial	Complete resistance
Solanum lycopersicum, tomato	Resistance to powdery mildew	PMR4	Knock-out mutation (SDN1)	CRISPR/Cas	Crop—greenhouse/lab trial	Higher resistance to powdery mildew
Solanum lycopersicum, tomato	Resistance to Botrytis cinerea	SlNPR1	Knock-out mutation (SDN1)	CRISPR/Cas	Crop—greenhouse/lab trial	33–40% higher resistance
Triticum aestivum, wheat	Resistance to powdery mildew	TaEDR1-A, -B und -D	simultaneous Knock-out in 3 loci (SDN1)	CRISPR/Cas	Crop—greenhouse/lab trial	Reduction of infection by ~50%
Triticum aestivum, wheat	Resistance to powdery mildew	TaMLO-A, -B, D	Knock-out mutation (SDN1)	TALEN	Crop—greenhouse/lab trial, 2 varieties	Complete resistance
Vitis vinifera, grape	Resistance to Botrytis cinerea	VvWRKY52	Knock-out mutation (SDN1)	CRISPR/Cas	Crop—greenhouse/lab trial	50% higher resistance

Потенциалните ползи и рискове от NGT

В сравнение с рисковете, **Комисията на ЕС подчертава потенциалните ползи**: „**Растенията, получени от NGT, имат потенциала да допринесат за целите на Европейската зелена сделка и по-специално за стратегиите „От фермата до вилицата“ и за биоразнообразието и Целите на ООН за устойчиво развитие** за по-устойчива и стабилна агрохранителна верига. **Примери** за потенциални ползи включват растения, **по-устойчиви на вредители, болести и условия на околната среда или на последици от изменението на климата** или растения, **изискващи по-малко природни ресурси, торове или продукти за растителна защита**. NGT могат също **да подобрят съдържанието на хранителни вещества в растенията** за **по-здравословни диети или да намалят съдържанието на вредни вещества като токсини и алергени**.

Ясно е, че **NGE** и **инструменти като CRISPR/Cas** имат **впечатляващ технически потенциал**, въпреки това, по отношение на целите на Зелената сделка, Стратегиите „От фермата до трапезата“ и за биоразнообразието, както и целите на SDG, **този потенциал се нуждае от критична и обстойна оценка на рисковете**.

Въвеждането на трансгенни растения преди повече от две десетилетия дойде с подобни обещания. Въпреки факта, че тези обещания и очаквания не са се материализирали (*Schulz et al., 2021*), индустрията все още се опитва да поддържа и развива тези технологии. По този начин, преди да се твърди, че NGT може да реши проблемите по отношение на биоразнообразието, устойчивото земеделие и изменението на климата, **първо трябва да има подробна оценка на опита, натрупан от геномно редактирани или модифицирани растения, които вече са на пазара**.

По отношение на биоразнообразието, устойчивото селско стопанство и изменението на климата, няма съмнение, че, наред с други неща, **емисиите на парникови газове, дължащи се на човешка дейност, оказват нарастващ натиск върху екосистемите и биоразнообразието**. **Инвазивните видове, вредители и патогени застрашават биоразнообразието и продоволствената сигурност**. **По-екстремни климатични условия**, включително суша, наводнения и студ, вече **застрашават много регион**и. В резултат на това **биоразнообразието, екосистемите и селското стопанство ще претърпят бързи промени и ще претърпят сериозни щети**. В много случаи **околната среда вече е неблагоприятно повлияна от други човешки дейности**, а изменението на климата причинява допълнителен стрес, което води до потенциални повратни точки в продължаващото изчезване на много видове. Каква е ролята, която могат да играят генетично модифицираните растения в този контекст? Можем ли, например, да използваме NGT, за да създадем растения, които са толерантни към различни фактори на околната среда точно навреме? Можем ли да защитим биоразнообразието и продоволствената сигурност, като селектираме, например, дървета с „оптимизиран“ геном? И в допълнение, трябва ли да «изтрием» по-малко благоприятните видове с техники като NGT? **Всички тези въпроси изискват мултидисциплинарен подход и сериозна оценка на въздействието на всички**

изброени фактори, както и оценка на потенциала на тези нови геномни техники за повишаване на продоволствената сигурност, здравето и благосъстоянието на хора и животни, и по-устойчиви условия на околната среда.

Еволюцията се основава на генетично и биологично разнообразие, което като система може да продължи да се развива, много често използвайки вече съществуващи решения. Смята се, че скоростта на изменението на климата, причинена от човешката дейност, надхвърля всичко, на което естественият свят е бил изложен някога в продължение на милиони години. От друга страна, изследванията, проведени върху растенията, показват, че много видове имат невероятен потенциал да се адаптират и коеволюират в променящите се условия на околната среда, като използват и епигенетични механизми. В допълнение, генетичното разнообразие в рамките на видовете и екологичните мрежи е от ключово значение за предоставянето на достатъчно широк набор от възможни решения на предстоящите нови проблеми. На този фон има изобилие от научни доказателства в подкрепа на стратегии, насочени към увеличаване на разнообразието в агроекологичните системи (GIZ, 2020 г.), същото важи и за горите (*Morin et al., 2018, Isbell et al., 2015*). **Генно модифицираните растения**, от друга страна, **могат да насърчат неочаквани или нежелани еволюционни ефекти** в такива сложни системи, които от своя страна **могат да прекъснат фино настроените взаимодействия между видовете и динамиката на коеволюцията**. Потенциалното **освобождаване на генетично модифицирани/редактирани организми за борба или смекчаване на изменението на климата не бива да са водещи и да им се възлагат фалшиви надежди**: **ако не се спре изменението на климата чрез ограничаване на антропогенните фактори, никоя технология няма да може да предотврати изчезването на хиляди видове и няма да осигури «чудотворни» растения, които да защитят ежедневния живот в биосфера, която е извън равновесие**.

Документите на Европейската комисия (ЕК) отправят много критики по отношение на настоящата регулаторна система и законодателната рамка. В документите се посочва, че **сегашното законодателство за ГМО вече не би било подходящо** за целта. Това е тясно свързано с гледната точка на тези заинтересовани страни с икономически интерес от бърз достъп до пазара за нови продукти, постигнати чрез GE. **Необходим е много по-всеобхватен анализ на силните и слабите страни от употребата на NGT**, като се вземе предвид достатъчно широк набор от различни гледни точки. Не на последно място трябва да се признае, че **досега неконтролираното разпространение на ГМО растения** (както се наблюдава в САЩ, Канада, Австралия, Япония и Мексико) **е предотвратено в ЕС най-вече поради съществуващите механизми в действащите законови разпоредби**.

Регулаторна рамка и законодателство

Законодателството на ЕС за ГМО (https://ec.europa.eu/food/plants/genetically-modified-organisms/gmo-legislation_en) приложимо за растенията, получени чрез нови геномни техники включва Директива 2001/18/ЕО относно съзнателното освобождаване в околната среда на ГМО, Регламент (ЕО) № 1829/2003 относно ГМ храни и фуражи и Регламент (ЕО) № 1830/2003 относно проследимостта и етикетирането на ГМО и

техните хранителни и фуражни продукти. Оценките за 2010-2011г. (https://ec.europa.eu/food/plants/genetically-modified-organisms/gmo-legislation/evaluation-gmolegislation_en) на законодателството за ГМО и проучването на Комисията от 2021 г. (https://ec.europa.eu/food/plants/genetically-modified-organisms/new-techniques-biotechnology/ec-study-newgenomic-techniques_en) относно NGT са посочили, че по отношение на растенията, получени чрез някои NGT и техните продукти, **сегашното законодателство вече не е подходящо за целта и се нуждае от адаптиране към научния и технологичен прогрес**. Въз основа на тези оценки и проучвания първоначалната оценка на въздействието (https://ec.europa.eu/info/law/better-regulation/have-your-say/initiatives/13119-Legislation-for-plants-producedby-certain-new-genomic-techniques_en) идентифицира следните проблеми, свързани с прилагането на настоящото законодателство към растения, произведени чрез целенасочена мутагенеза и цисгенеза:

- **Правната несигурност** в Директива 2001/18/ЕО (и друго законодателство, основаващо се на нея) е засилена от развитието на биотехнологиите, с **неясни или недефинирани термини и понятия**;
- **Текущият регулаторен надзор и изисквания** не са адаптирани към произтичащите от това различни рискови профили и в някои случаи може да бъде **непропорционално или неадекватно**;
- **Законодателството за ГМО включва изисквания за разрешаване, проследимост и етикетиране**, които пораждат **предизвикателства при одобрението и правоприлагането** за NGT продукти;
- Настоящата законодателна рамка **не взема предвид дали продуктите имат потенциала да допринесат за устойчивостта**.

Европейската комисия е поискала от Европейския орган за безопасност на храните (ЕОБХ) да бъдат разгледани заключенията от предишни научни становища и съответните ръководства на ЕОБХ в тази област и да се **предложат подходящи критерии, които да бъдат взети предвид при оценката на риска на растенията, произведени чрез нови геномни техники**. Разгледаните научни документи обхващат оценката на генетично модифицирани растения, растения, разработени чрез цисгенеза и интрагенеза, целева мутагенеза, синтетична биология и оценка на алергенността и безопасността на протеините на хранителни и фуражни продукти, получени чрез биотехнологии.

Част от **научните оценки на риска и становищата на ЕОБХ** са:

Scientific opinion addressing the safety assessment of plants developed through cisgenesis and intragenesis - https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2561

Scientific opinion addressing the safety assessment of plants developed using Zinc Finger Nuclease 3 and other Site-Directed Nucleases with similar function - https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2943

Applicability of the EFSA Opinion on site-directed nucleases type 3 for the safety assessment of plants developed using site-directed nucleases type 1 and 2 and oligonucleotide-directed mutagenesis - https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/6299

Работата на ЕОБХ е да оценява безопасността на храните за хората, животните и околната среда. Декларацията относно критериите за оценка на риска на растенията, произведени чрез целева мутагенеза, цисгенеза и интрагенеза, обобщава работата, която е първата стъпка в създаването на стабилна научно обоснована рамка за оценка на рисковете от тези техники в храните и фуражите, и за околната среда, за всеки отделен случай. Това включва изброяване къде могат да се прилагат съществуващите методологии за оценка на риска и подчертаване на пропуските в настоящите подходи и изисквания за данни. Ролята на ЕОБХ не е да казва как трябва да се развива европейското селско стопанство или дали са необходими нови технологии за постигане на целите на политиката, като например по-устойчиви продоволствени системи. ЕОБХ ще продължи да предоставя техническа помощ и научни консултации на мениджърите на риска в областта на генното инженерство, за да се гарантира, че храните са безопасни за потребителите в ЕС. **Данни за България от въпросниците и консултациите относно употребата на NGT и продукти, резултат от употреба на нови геномни техники биха могли да бъдат намерени на следния линк**: https://food.ec.europa.eu/system/files/2021-04/gmo_mod-bio_stake-cons_ms-reply-bgr.pdf

В доклад на ЕОБХ са предложени **шест основни критерия за подпомагане на оценката на риска от растения, произведени с помощта на генно-инженерни техники на целева мутагенеза, цисгенеза и интрагенеза**.

Някои растения, произведени с нови геномни техники, могат да имат само малки промени, които могат да възникнат и в природата или чрез конвенционално размножаване. Други могат да имат множество и обширни модификации, които могат да бъдат подобни на тези в растенията, произведени чрез установени техники на генетична модификация, използвани през последните две десетилетия.

Критерии предложени от ЕОБХ да бъдат прилагани и използвани за оценка на рисковете от растения, произведени от целева мутагенеза, цисгенеза и интрагенеза

Критериите, предложени от учените на ЕОБХ, включват две основни направления: относно молекулярната характеристика на генетичната модификация, въведена в приемното растение (**първите четири критерия**). Те **оценяват**:

1. Ако е **налице чужда („екзогенна“) ДНК** последователност;
2. Ако отговорът е „да“, **дали последователността е от генния фонд на животновъдите и селекционерите;**
3. **Как се интегрира последователността**, например случайна ли е или е насочена?
4. Ако **някой гостоприемников ген е бил „прекъснат“ (разделен) от нововъведената последователност.**

Изброените 4 критерии са **предназначени да установят дали цисгенните и интрагенните последователности са променили гените на растението**

гостоприемник. **Ако те не са**, или ако не е установен риск, когато е засегнат чужд ген, **се прилагат още два критерия (критерии 5 и 6)**:

5. Има ли **история на употреба**?
6. Ако това не е така, **структурата и функцията на модифицираните версии на ДНК последователността („алел“)** следва да бъдат **внимателно оценени**.

Последните два критерия се прилагат и за растения, произведени чрез целева мутагенеза.

История на употреба и оценката ѝ

Оценката на историята на употреба следва да бъде **важна част от пропорционалната оценка на риска на цисгенните, интрагенните и растенията, постигнати чрез целева мутагенеза**, тъй като новомодифицираните версии на ДНК („алел“) може вече да са налице в природата. Концепцията е добре установена в оценките на ГМО, разработени преди 2001 г. Доказването на **история на употреба се основава на доказателства за консумация на част или цялото растение** като храни и/или фуражи и производни продукти **в продължение на значителен период от време**, **без доказателства за вредни последици за потребителя, и че експозицията от нова употреба ще бъде в обхвата на „историята на употреба**. Подобни подходи се използват при оценката на рисковете за околната среда.

Когато историята на употреба на растение, съдържащо новомодифицираната ДНК последователност (алел), не може да бъде доказана в достатъчна степен, нейната структура и функция следва да бъдат внимателно оценени (стъпка 6 от предложените критерии).

Какво са страничните ефекти от генетичните събития?

Странични ефекти са **нежелани мутации, които се въвеждат на места в геномите, различни от предвидените**. За растенията, в които новомодифицираната ДНК последователност е успешно интегрирана в растителния геном, ще има случаи, при които потенциалът за нежелани ефекти, е минимален и когато това се случи, изискванията за данните за оценката на риска могат да бъдат намалени за всеки отделен случай.

Две скорошни проучвания на ЕОБХ – мащабно проучване от 2021 г. и проучване на Евробарометър от 2022 г. относно безопасността на храните – са разкрили **ниска осведоменост за новите геномни техники сред гражданите на ЕС**. Евробарометър посочва, че **използването на нови биотехнологии в производството на храни не е често споменавано безпокойство на гражданите**, като само 8% от тези, които са запознати с проблема, също го посочват като един от петте си основни опасения за безопасността на храните. Въпреки това, проучването разкрива „**Какви са възможните рискове“ като важна информационна празнина за гражданите**, като около две трети (69%) желаят да знаят повече за това.

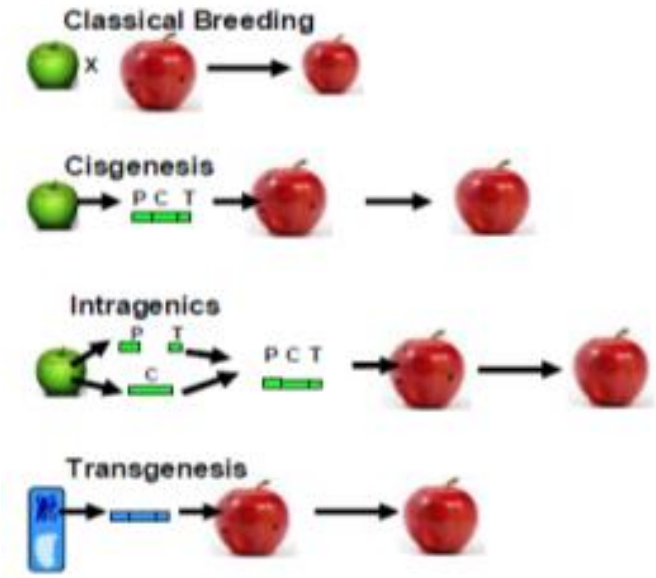
ЕОБХ ще проведе открита среща със заинтересованите страни с интерес към тази тема на 12 декември 2022 г. По време на събитието ще бъдат поканени участниците в интерактивна панелна дискусия, която ще се съсредоточи изключително върху оценката на риска и научните аспекти на новите геномни техники.

Термини и понятия:

- **Генетичен фонд на животновъдите/селекционерите:** източниците на гени/алели, налични за конвенционална селекция на растения, се наричат „генен фонд на селекционерите“. Животновъдите правят разлика между първични, вторични и третични генетични групи. Всеки първичен генен фонд се състои от един култивиран вид и други таксономични видове, с които той може да се кръстосва свободно. Вторичният генетичен фонд включва видове, които могат да бъдат кръстосвани само с член на първичния генен фонд, но които произвеждат поне някои плодородни хибриди. Третичният генетичен фонд се състои от тези видове, които са по-далечно свързани с член на първичния генен фонд, но които могат да бъдат кръстосани само с помощта на усъвършенствани техники. Животновъдите и селекционерите непрекъснато разширяват третичния генетичен фонд и ще продължат да го правят и в бъдеще, като прилагат и нови геномни техники.
- **Цисгенеза:** генетична модификация, включваща генетичен материал, получен от генетичния фонд на животновъдите и селекционерите и предаден на гостоприемника, като се използват различни техники за доставка; включените последователности съдържат точно копие на секвенция, която вече присъства в генетичния фонд на животновъдите.
- **Установени генетични техники** (EGT)**:** геномните техники, разработени преди 2001 г., когато е приета Директива 2001/18/ЕО.
- **Екзогенна ДНК последователност:** ДНК, произведена по какъвто и да е начин извън целевия организъм.
- **Интрагенеза:** генетична модификация, включваща генетичен материал, получен от генетичния фонд на животновъдите и предаден на гостоприемника, като се използват различни методи за доставка; включените последователности съдържат преподредено копие на секвенциите, които вече присъстват в генетичния фонд на селекционерите.
- **Олигонуклеотид:** Участък от нуклеинова киселина, състоящ се от относително малък брой нуклеотиди.
- **Мутагенеза, насочена към олигонуклеотид (**ODM**):** подход, който се основава на използването на олигонуклеотиди за въвеждане на целеви мутации в генома, обикновено на един или няколко съседни нуклеотида. Генетичните промени, които могат да бъдат получени чрез ODM, включват замествания, вмъквания или заличавания.
- **Сайт насочена нуклеаза (**SDN**):** ензим, който разпознава специфична последователност и разцепва ДНК и обикновено създава двойно скъсване. Могат да се използват три вида SDN ензимни групи:

- **SDN-1:** нуклеаза тип 1 предизвиква случайни мутации (замествания, вмъквания и делеции) в целевия геномен локус на растението
- **SDN-2:** сайт насочена нуклеаза тип 2 използва шаблонна ДНК за генериране на прогнозирана модификация (т.е. планирана модификация на секвенцията) на прицелния геномен локус на растението
- **SDN-3:** сайт насочена нуклеаза тип 3 въвежда голям участък от донорна ДНК (до няколко килобази) в предварително определен геномен локус.

- **Трансгенеза:** процесът на стабилно въвеждане на ген(и) от всякакви несъвместими видове или синтетичен ген, който не съществува в природата, в генома на даден реципиентен организъм и разпространението на такъв(тези) ген(и) след това.
- **Целева мутагенеза:** общ термин, използван за описване на по-нови техники на мутагенеза, които предизвикват мутации в избрани целеви места в генома.
- **Цисгенно растение:** растение, получено чрез цисгенеза (напр. чрез EGT или SDN-3)
- **Интрагенно растение:** растение, получено чрез интрагенеза (напр. чрез EGT или SDN-3)
- **Трансгенно растение:** растение, получено чрез трансгенеза
- **Геномно редактирано растение** (GE растение)**:** растение, получено чрез прилагане на целеви техники на мутагенеза.



Characters	Cisgenesis	Intragenesis	Transgenesis
Source of gene	Plant itself or from crossable species	plant itself or from crossable species	Could be from any organism
Nature of gene	Natural gene	Natural gene	Natural/artificial gene
Methods of gene transfer	Mainly Agrobacterium-mediated	Mainly Agrobacterium and some time RNAi	Any methods of recombinant DNA technology
Marker gene	Removed	Removed	Contain marker gene
Change in gene pool	No change	No change	Change

Фигура 3: Схематично и таблично представени разликите между интра-, цис- и трансгенеза

Тъй като цисгенните или интрагенните растения могат да бъдат получени чрез NGT, Европейската комисия актуализира определението за цисгенеза и интрагенеза,

които понастоящем се считат за „генетични модификации, включващи генетичен материал, получен извън организма гостоприемник и предаден на гостоприемника, като се използват различни техники за въвеждане на новите последователности; включените последователности съдържат точно копие (цигенеза) или преподредено копие (интрагенеза) на секвенции, които вече присъстват във вида или в съвместим вид.

Цели на Европейската комисия, както е описано в дадения мандат:

- **Идентифициране на потенциалните рискове**, които растенията, получени чрез цисгенни и интрагенни подходи, биха могли да породят за хората, животните и околната среда.
- **Сравнение на горепосочените рискове** с тези, свързани с растения, получени чрез конвенционални техники за селекция на растения, и растения, получени с NGT.
- Да се определи **дали съществуващите насоки за оценка на риска са приложими**, изцяло или частично, и дали са достатъчни за цисгенни и интрагенни растения.
- В случай че съществуващите насоки за оценка на риска се считат за неприложими, частично приложими или недостатъчни, за **да се определи по кои аспекти съществуващите насоки следва да бъдат актуализирани**, адаптирани или допълнени.

Критерии за оценка на риска на растенията произведен чрез целева мутагенеза, цисгенеза и интрагенеза

Шестте основни критерия ще служат **за подпомагане на оценката на риска от тези растения.** Първите четири критерия, както бе споменато, са свързани с молекулярната характеристика на генетичната модификация, въведена в реципиентното растение. Четирите критерия оценяват дали е налице екзогенна ДНК секвенция(и) (Критерий 1), дали тази последователност произтича от генетичния фонд на животновъдите и селекционерите (Критерий 2), вида интеграция (Критерий 3) и дали е прекъснат ендогенен растителен ген (Критерий 4). В зависимост от оценката на горните критерии, продуктът може да бъде геномно редактирано растение, където няма екзогенна ДНК последователност, или цисгенно или интрагенно растение, където цисгенната и интрагенната последователност се въвеждат чрез целенасочено вмъкване и не се прекъсват растителни ендогенни гени. В тези случаи се оценяват още два критерия, за да се оцени историята на безопасната употреба (критерий 5) и структурата и функцията на новия алел (критерий 6). Ако цисгенната и интрагенната последователност се въвеждат чрез случайна интеграция без прекъсване на ендогенен ген или когато не е установен риск при прекъсване на ендогенен ген, ще бъдат оценени и критерии 5 и 6. **Оценката на историята на безопасна употреба** е **важна част от оценката на риска от цисгенни, интрагенни и геномно редактирани растения**, тъй като нововъведеният алел може вече да присъства в природата. Когато обаче **историята на безопасната употреба не може да бъде доказана в достатъчна степен, функцията и структурата на въведения алел следва да бъдат внимателно оценени**. Включени са и препоръки относно аспектите, които се нуждаят от по-нататъшно разработване за пълна приложимост на предложените критерии.

Някои от модификациите на генетичния материал, получен чрез целева мутагенеза, цисгенеза или интрагенеза, също могат да бъдат получени чрез естествени мутации/вариации и конвенционални техники за развъждане. Гореспоменатото проучване на ЕК е взело предвид наличните научни становища на ЕОБХ и е стигнало до заключението, че **настоящият регулаторен надзор и изискванията не са адаптирани към различните рискови профили на растенията, произведени чрез целева мутагенеза, цисгенеза и интрагенеза, а в някои случаи могат да бъдат непропорционални или неадекватни**.

ЕОБХ счита, че растенията, произведени чрез целева мутагенеза, цисгенеза и интрагенеза, в някои случаи не представляват нови опасности в сравнение с растенията, произведени с класическа мутагенеза или конвенционални техники за развъждане. За **растенията, произведени чрез целева мутагенеза**, ЕОБХ стигна до **заключението, че количеството експериментални данни, необходими за оценката на риска, зависи главно от въведената модифицирана черта и за всеки отделен случай ще са необходими по-малко експериментални данни в сравнение с растенията, произведени чрез трансгенеза, интрагенеза или цисгенеза**. Що се отнася до цисгенезата и интрагенезата, ЕОБХ стигна до заключението, че за оценка на риска от тези растения ще са необходими по-малко данни за всеки отделен случай в сравнение с трансгенните растения.

Въз основа на това и с цел подходящ регулаторен надзор, който поддържа високо равнище на защита на здравето на хората и животните и на околната среда, ЕК определи **редица елементи на политиката, които да бъдат взети предвид**. Те включват **изисквания за оценка на риска**, пропорционални на съответния риск, **изисквания по отношение на данните и проучванията**, в съответствие с рисковите профили и за всеки отделен случай, като **се вземат предвид критерии като използваната специфична техника, вида на изменението или новостта на фенотипната черта**. Такъв списък от критерии трябва да бъде доразвит и би могъл да се използва в подкрепа на оценката, за всеки отделен случай, на вида и количеството данни, необходими за извършване на оценката на риска на растенията, произведени чрез целева мутагенеза, цисгенеза и интрагенеза.

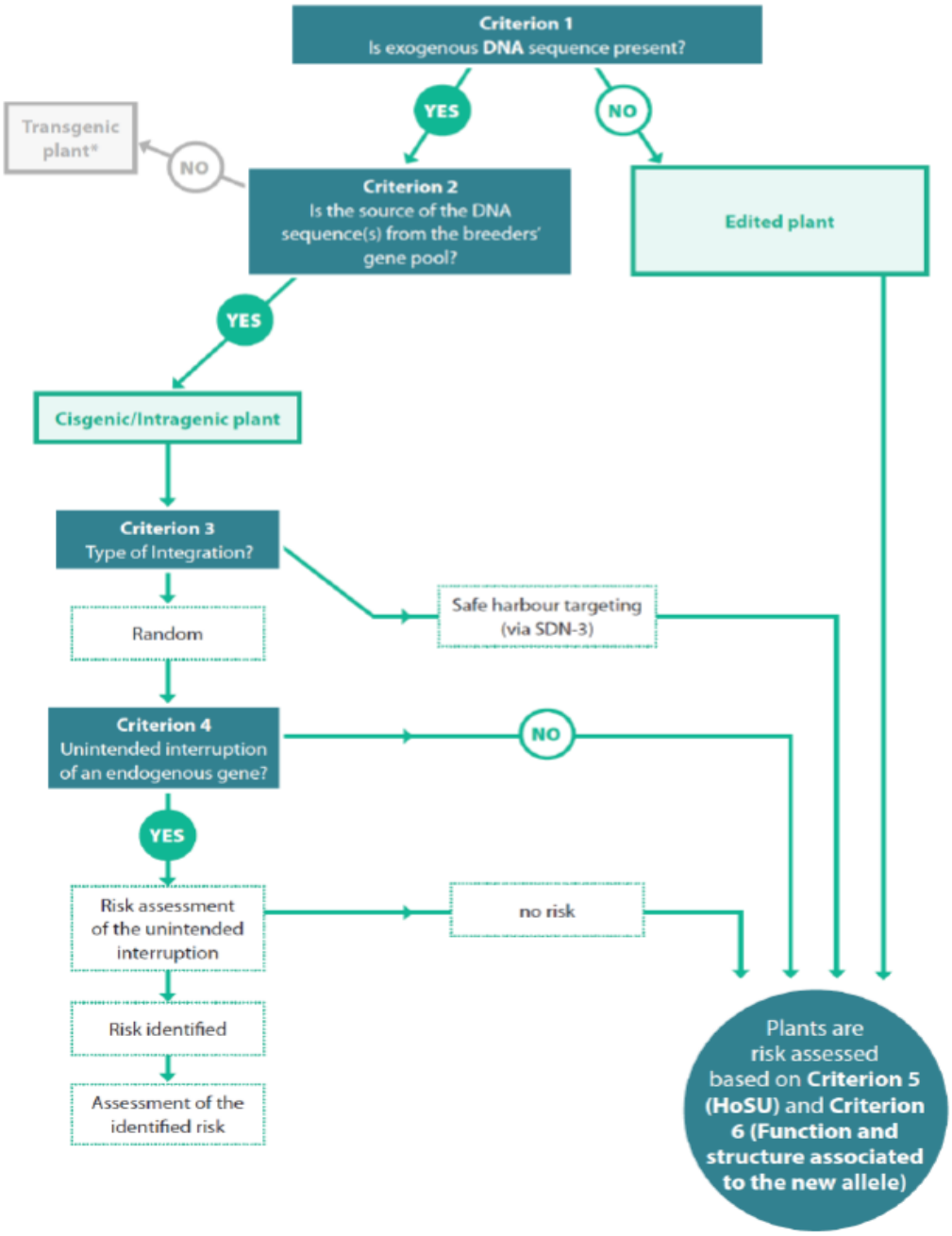
Понятието „критерии“ в рамките на настоящия мандат следва да се разбира като отнасящо се до **елементи (напр. използваната специфична техника, вида на изменението или новостта на фенотипната черта), които следва да бъдат взети предвид, за да се оцени, за всеки отделен случай, вида и количеството данни, необходими за извършване на оценката на риска за растенията, произведени чрез целева мутагенеза, цисгенеза и интрагенеза**. Съгласно настоящия мандат от ЕОБХ не се изисква да разработва изисквания за вид данни за оценката на риска на тези растения.

Критерии за оценка на риска на растенията и техните продукти, разработени чрез целева мутагенеза, цисгенеза и интрагенеза

Предложените критерии, се считат за „елементи, които следва да бъдат взети предвид, за да се оцени, за всеки отделен случай, риска от растенията, произведени чрез

целева мутагенеза, цисгенеза и интрагенеза”. Предложените критерии, както стана ясно, са разработени, като се вземат предвид i) молекулярните характеристики на генетичната(ите) модификация(и), въведена(и) в генетично модифицирано растение, и ii) характеристиките на изразената черта по отношение на аспектите на храните и фуражите (FF) и оценката на риска за околната среда (ERA).

На *фигура 4* се предлага *дърво на решенията, обобщаващо критериите* за оценка на риска:



Критерий 1: има ли екзогенна ДНК последователност(и)?

Критерий 1 се основава на **молекулярната характеристика на генетичната модификация, въведена в генома на генетично модифицираното растение**. По-

конкретно критерий 1 има за **цел да оцени дали генетично модифицираното растение съдържа екзогенна ДНК последователност**. Могат да се разграничат два възможни сценария:

- Генетично модифицираното растение съдържа екзогенна ДНК последователност(и): в този случай източникът на ДНК последователността трябва да се разглежда в съответствие с критерии 2, 3 и 4.
- Генетично модифицираното растение не съдържа екзогенна ДНК последователност: генетично модифицираното растение е създадено чрез целева мутагенеза, например, използвайки SDN-1 или SDN-2 подходи, генериращи GE растение. Растението GE е свободно от екзогенна ДНК секвенция.

Критерий 2: ДНК секвенцията(ите) от генния фонд на развъдчиците/селекционерите ли е?

Генетично модифицираното растение, което съдържа екзогенна ДНК секвенция(и) ще бъде оценено съгласно критерий 2, който **оценява дали източникът на ДНК секвенцията(ите) е(са) от генетичния(те) фонд(ове) на селекционерите**. Два възможни сценария могат да бъдат разграничени в критерий 2:

- ДНК секвенцията(ите) не е(са) от генния фонд на животновъдите: генетично модифицираното растение, което съдържа екзогенна ДНК секвенция(и) извън генетичния фонд на селекционерите, се счита за трансгенно растение. Оценката на риска се извършва в съответствие с изискванията, които понастоящем се прилагат за оценка на риска на генетично модифицираните растения. Следва да се отбележи, че трансгенните растения са извън обхвата на мандата на ЕК.
- ДНК секвенцията(ите) е(са) от генния фонд на животновъдите: генетично модифицираното растение е произведено чрез подходи за цисгенеза или интрагенеза, които генерират цисгенно или интрагенно растение в съответствие с дадените определения. Поради това подходът за оценка на риска следва да продължи съгласно критерий 3.

Критерий 3: Какъв е видът интеграция?

Критерий 3 се прилага **само за цисгенни и интрагенни растения**. Цисгенната и интрагенната последователност могат да бъдат въведени чрез:

- EGT, която на случаен принцип би въвела цисгенна и интрагенна последователност в растителния геном. Полученото цисгенно или интрагенно растение може да бъде допълнително категоризирано въз основа на критерий 4.
- SDN-3, който ще въведе цисгенната и интрагенната последователност в определен геномен локус, за който е взето решение *a priori*. За растения, произведени чрез успешна стратегия за SDN-3, ще има случаи, в които потенциалът за нежелани ефекти (напр. позиционни и нецелеви ефекти) е значително намален в сравнение със случайните вмъквания или конвенционалното развъждане. Поради това е

необходима гъвкавост в изискванията за данните за оценките на риска на генетично модифицираните растения, произведени чрез SDN-3.

Критерий 4: Има ли непреднамерено прекъсване на ендогенен ген?

Критерий 4 се **прилага само за цисгенни или интрагенни растения, за които видът на вмъкване е бил случаен, или за подходи SDN-3**, за които GSH не е доказан. Оценката на ефекта от вмъкването може да доведе до 2 възможни варианта:

- в случай че i) е нарушен ендогенен растителен ген, но е установен риск, или ii) изобщо не са нарушени ендогенни гени, подходът за оценка на риска следва да се процедира съобразно препоръките.
- в случай че ендогенен ген е бил нарушен и ако след оценката на риска се идентифицира риск, се оценява този риск.

Критерий 5: История на употреба

Историята на употреба включва **история на безопасна употреба (HoSU) за потребители и/или животни и познаване на околната среда, които са ключови елементи при оценката на растенията, произведени чрез целева мутагенеза, цисгенеза и интрагенеза**. Данните относно HoSU и охарактеризирането й могат да помогнат при определянето на вида и количеството данни, необходими за извършване на оценката на риска на тези растения.

Доказването на HoSU се основава на доказателства, че част или цялото растение е било част от диетата на хора и животни (храни и/или фуражи и производни продукти) в продължение на значителен период от време, без доказателства за неблагоприятни последици, и че експозициите от нова употреба ще бъдат в обхвата на тези от „историческата“ употреба. Например Канада оценява HoSU за нови храни въз основа на броя на поколенията, които консумират такива продукти, докато Европа се позовава на времева рамка от най-малко 25 години консумация (*Fernandez, Paoletti, 2018*).

Някои аспекти на HoSU за потребителите и/или животните, които следва да се вземат предвид, са:

- Дали въведеният или модифициран ген и неговият продукт при местните видове вече съставлява значителна част от диетата или се консумира само от време на време в малки количества. Променя ли се новият модел на потребление в сравнение с този на предишната употреба? Кои части или тъкани на консумираното в момента растение са в диетата? Това адекватно ли обхваща новата употреба?
- Дали са необходими специфични етапи на преработка преди генно модифицираното/редактираното растение да се консумира безопасно (напр. накисване, продължителна термична обработка, отстраняване на определени части). Трябва ли тези стъпки да бъдат приложени към новата употреба и дали това е осъществимо?
- Дали приемът на хранителни вещества, витамини, алергени и токсини от новата употреба е в рамките на тези на историческата употреба или в рамките на приемливи

нива въз основа на общата диета. Обръщане на внимание на всички части на новосъздаденото растение, които могат да имат особено високи или ниски нива на някои компоненти.

По отношение на критерий 5 могат да се разграничат два възможни сценария след оценката на историята на употреба:

- HoSU и/или история на употреба могат да бъдат демонстрирани: растението донор и/или генът/алелът и свързаната с него черта имат история на консумация като храна и фураж и/или представяне в околната среда. Например ДНК секвенцията, получена чрез целева мутагенеза, цисгенеза или интрагенеза, и свързаната с нея фенотипна черта вече присъстват в консумирания сорт. В други случаи растението донор може да няма история за консумация като храна и фураж, но може да е било използвано в конвенционалното развъждане за интрогенни алелни варианти, придаващи агрономично важни фенотипни черти. В този случай оценката на риска може да се съсредоточи върху познаването на този отгледан сорт, специфичния модифициран или въведен алел и предвидената черта (т.е. HoSU). Когато HoSU може да бъде доказан, за оценката на риска може да не са необходими допълнителни данни за редактираната(ите) последователност(и), цисгенната и интрагенната последователност и техните продукти. Освен това изследването на околната среда може да спомогне за намаляване на степента на научна несигурност, свързана с новото растение, а оттам и на броя на хипотезите, които трябва да бъдат тествани във фазата на характеризиране на риска. Няколко примера, за които HoSU може да бъде демонстрирано, са обсъдени от експертната група по ГМО в предишното становище на ЕОБХ от 2012г.
- HoSU не могат да бъдат доказани: Не е доказано наличието на ген/алел и свързаната с него характеристика в растение, предвидено за консумация като храна и фураж и/или култивиране. В този случай оценката на риска може да се съсредоточи върху функцията и структурата, свързани с този алел.

Критерий 6: функция и структура, свързани към новия алел

Когато **HoSU не може да бъдат доказани в достатъчна степен, оценката на риска следва да се съсредоточи върху функцията и структурата, свързани с новия алел**. Оценката на риска следва също така да отчита вероятността такъв алел да бъде получен чрез конвенционално развъждане (естествена или индуцирана вариация). В случай че нововъведеният алел е от кръстосан вид, но история на употреба не може да бъде доказана, при оценката на безопасността на генния продукт следва да се вземе предвид фактът, че този алел е в генетичния фонд на животновъдите.

При оценката на риска следва да се вземат предвид допълнителни аспекти на нововъведения или модифициран алел, например:

- Дали първоначалната функция на модифицирания алел е запазена или дали новият алел е придобил някаква допълнителна функция в сравнение с първоначалната.

- Дали новият алел има потенциал да генерира продукт, който може да бъде токсичен или алергенен.
- Дали новият алел се характеризира с променено ниво на експресия в сравнение с изходното донорно растение или дали продуктът на алелната вариация показва различна локализация/разделяне в сравнение с изходното донорно растение.

Описаните по-горе аспекти могат да помогнат за насочване на оценката на риска. Следва обаче да се отбележи, че в този доклад на ЕОБХ не може да бъде предоставен изчерпателен списък, като се има предвид широкият спектър от продукти, които могат да бъдат генерирани от целева мутагенеза, цисгенеза и интрагенеза.

Допълнителни съображения

За да разработят тези критерии, ЕОБХ използва информацията, която вече е разработена и обсъдена в съответните публикувани научни становища на ЕОБХ (експертна група на ЕОБХ по ГМО, 2012; 2020; 2021; 2022 г.). В тези становища ЕОБХ подчерта някои аспекти, които **изискват по-нататъшно обсъждане, особено от значение за сложните продукти, и тяхната оценка на безопасността в съответствие с действащата регулаторна рамка** и приложимите насоки на ЕОБХ. В някои от тези случаи в растението могат да бъдат въведени **множество генетични модификации, като се използват целенасочени подходи за мутагенеза**. Тези мутации може **да не са генетично свързани**, подобно на трансгенните генетично модифицирани растения с подредени събития. ЕОБХ заключава, че **оценката на риска за растения с голям брой въведени/модифицирани последователности** съобразно Регламент за изпълнение (ЕС) № 503/2013, може да бъде **трудна или дори неприложима**. Освен това, в случай че множество растителни ендогенни гени бъдат модифицирани чрез целева мутагенеза, за да се произведат много нови протеини, ЕОБХ стигна до заключението, че оценката на всички тези нови протеини също би била предизвикателство съгласно настоящата регулаторна рамка. ЕОБХ стигна до заключението, че **сравнителният анализ** може **невинаги да е приложим за някои растения, с редактиран геном, със сложни характеристики**, за които не може да бъде идентифициран сравнителен показател. В този случай настоящите насоки следва да бъдат преразгледани, за да се подкрепи оценката на риска за тези растения, като се използва сравнителен анализ спрямо множество сравними данни или чрез самостоятелна оценка, за която следва да бъде разработена подходяща процедура. И накрая, ЕОБХ извършва анализ на потенциалните странични ефекти, предизвикани от прилагането на целеви техники за мутагенеза.

За мандата на ЕК са дадени отговори на конкретни въпроси за всеки от продуктите и растителните култури, произведени чрез цис- , транс- и интрагенеза.

Цел 1 и 2: Идентифициране на потенциалните рискове, които растенията, получени чрез цисгенни и интрагенни подходи, биха могли да породят за хората, животните и околната среда; сравнение на горепосочените рискове с тези, свързани с растения, получени чрез конвенционални техники за селекция на растения, и растения, получени с NGT

По отношение на растения, постигнати чрез цисгенеза/интрагенеза и производни продукти, които вече са обхванати в становището на ЕОБХ от 2012 г., са разгледани следните въпроси:

AQ1. Какви са рисковете, които цисгенните/интрагенните растения биха могли да породят за хората, животните и околната среда, които са идентифицирани в становището за цисгенезата от 2012 г.?

AQ2. Има ли налична нова информация, която би могла да окаже въздействие върху оценката на риска на растенията и производните продукти, включени в становището на ЕОБХ от 2012 г.?

AQ3. Има ли нови техники/подходи, разработени от 2012 г. насам, които биха могли да се използват за получаване на цисгенни/интрагенни растения, както е определено в становището от 2012 г.?

AQ4. Ако съществуват нови техники/подходи, какви са потенциалните рискове, които могат да възникнат в сравнение с вече обхванатите в становището от 2012 г.?

По отношение на растения за цисгенеза/интрагенеза и производни продукти, които не са обхванати в становището на ЕОБХ от 2012 г., са разгледани следните въпроси:

AQ1. Какви са новите растения и производните продукти, които биха могли да бъдат получени чрез нови подходи, по-специално с използването на NGT, които биха могли да доведат до цисгенни/интрагенни растения съгласно определението, дадено в рамките на настоящия мандат?

AQ2. Какви биха могли да бъдат рисковете, които тези растения и производни продукти биха могли да породят за хората, животните и околната среда, в сравнение с рисковете, свързани с растенията, получени чрез конвенционални техники за селекция на растения и растения, получени с NGT?

Цел 3: Да се определи дали съществуващите насоки за оценка на риска са приложими, изцяло или частично, и дали са достатъчни за цисгенни и интрагенни растения.

За растения за цисгенеза/интрагенеза и производни продукти, които вече са обхванати в становището на ЕОБХ от 2012 г., е разгледан следният въпрос:

AQ1. Все още ли са валидни заключенията от становището на ЕОБХ от 2012 г. относно приложимостта на съществуващите насоки, като се вземат предвид публикуваните нови насоки и информацията, предоставена след публикуването на настоящото становище?

За растения за цисгенеза/интрагенеза и производни продукти, които не са включени в становището на ЕОБХ от 2012 г., е разгледан следният въпрос:

AQ1. Приложими ли са изцяло или частично съществуващите насоки за оценка на риска и достатъчни ли са за тези нови растения и производни продукти?

Цел 4: В случай че съществуващите насоки за оценка на риска се считат за неприложими, частично приложими или недостатъчни, да се определи по кои аспекти съществуващите насоки следва да бъдат актуализирани, адаптирани или допълнени.

AQ1. Кой аспект (ако има такъв) от съществуващите насоки следва да бъде актуализиран, адаптиран или допълнен?

За по-голяма яснота експертната група по ГМО е счела за целесъобразно да разгледа заедно ToR1 и ToR2, тъй като и двете изискват анализ на потенциалните рискове, породени от цисгенни/интрагенни растения.

В становището на ЕОБХ (ЕОБХ, експертна група по ГМО 2012а) се разглеждат рисковете за хората, животните и околната среда чрез сравняване на растенията, получени чрез цисгенеза и интрагенеза, с растения, получени чрез конвенционална селекция и чрез трансгенеза. За да се идентифицират рисковете, е разгледан списък на потенциалните опасности, включително: източника на ДНК и безопасността на генните продукти; промени в генома на гостоприемника на мястото на въвеждане и на друго място; потенциалното наличие на нерастителни последователности в новополученото растение; фенотипната изява на чертата.

За да се оцени приложимостта на настоящите насоки, становището е съсредоточено върху Насоките за оценка на риска от храни и фуражи от генетично модифицирани растения (група на ЕОБХ по ГМО, 2011а) и Насоките относно оценката на риска за околната среда от генетично модифицирани растения (Панел за ГМО на ЕОБХ, 2010 г.).

Становище на ЕОБХ относно SDN-3

Относно SDN-3, от експертната група по ГМО е поискано 1) да определи рисковете от гледна точка на въздействието върху хората, животните и околната среда, като осемте изброени техники, използвани в модификацията на култури и самите модифицирани растения биха могли да бъдат сравнени с растенията, получени чрез конвенционални техники за селекция, и второ, с растения, получени с по-стари техники за генетична модификация, и 2) да определи дали е налице необходимост от нови насоки или дали съществуващите насоки за оценка на риска следва да бъдат актуализирани или доразвити, в очакване на пускането на пазара на растителни продукти, получени чрез използването на новите геномни техники.

За да се справи с гореспоменатите цели, панелът за ГМО първоначално се е фокусирал върху растения, разработени посредством цинковата нуклеаза 3 (ZFN-3). **Становището** е разработено така, за **да включва всички техники със сайт насочени нуклеази (SDN), които предизвикват генетичните модификации**, включващи техниката ZFN-3: Техниката SDN-3 е насочена към вмъкване на ДНК в предварително дефиниран геномен локус. Този локус може или не да има голямо сходство с ДНК, която трябва да бъде въведена, тъй като целта на техниката SDN-3 е да позволи вмъкване или обмен на цели гени или всяка друга ДНК последователност в конкретен локус. По този

начин, SDN-3 техниката може да се използва за трансгенеза, както и за цисгенеза и интрагенеза. **Индукцията на DSB (двойно скъсване) в определен локус с SDN значително увеличава целенасоченото интегриране на ДНК, което в противен случай би се интегрирало на случаен принцип в генома на реципиентното растение**. Поради това използването на SDN дава възможност за вмъкване на ДНК в конкретен локус в растителния геном. Интегрирането на ДНК може да бъде медиирано чрез HR (хомоложна рекомбинация) или чрез NHEJ (*Mammalian non-homologous DNA end joining* - нехомоложно крайно присъединяване) (SDN-3–NHEJ техника), в зависимост от наличието или не на сходство в последователностите - между ДНК, която ще бъде интегрирана и целевия локус.“

При разглеждането на **опасностите, свързани с растенията**, разработени чрез SDN-3 подходи, в сравнение с трансгенните и конвенционално отглежданите растения, **основните съображения**, направени от експертната група по ГМО, включват: **източника на ДНК и безопасността на генните продукти**; **промени в генома на гостоприемника на мястото на въвеждане и други** (включително потенциалното наличие на нерастителни последователности при вмъкването и изразяването на ген, кодиращ определена фенотипна черта/модификация и генната експресия, както и потенциалните по-широки приложения на тези техники).

В съответствие със своята политика за откритост и прозрачност ЕОБХ е провела публични консултации с държавите-членки (ДЧ) на ЕС, и със заинтересованите страни.

По отношение на ToR1 и ToR2: За растения, подложени на цисгенеза/интрагенеза и производни техники, които вече са обхванати в становището на ЕОБХ от 2012 г., са разгледани следните въпроси за оценка:

Какви са рисковете, които цисгенните/интрагенните растения биха могли да породят за хората, животните и околната среда, които са идентифицирани в становището относно цисгенезата от 2012 г.?

В научното становище на ЕОБХ относно оценката на безопасността на растенията, разработени чрез цисгенеза и интрагенеза (Панел за ГМО на ЕОБХ, 2012a), цисгенезата се описва като въвеждане в растение на „специфични алели/гени, присъстващи в генетичния фонд на животновъдите, без промяна в ДНК последователността“. В това определение цисгенът съответства на родителския ген, включително интрони, 5' и 3' UTR и флангинг промотора и терминаторния участък. В становището на ЕОБХ от 2012 г. интрагенезата се описва като въвеждането в дадено растение на генетични елементи, „създадени чрез рекомбинация на генетични елементи като промотори, кодиращи последователности и терминатори на различни гени в генетичния фонд на селекционера“ за този конкретен растителен вид. Важно е да се отбележи, че **цисгенезата и интрагенезата се различават от трансгенезата по източника на въведените генетични елементи**, което в случай на трансгенеза включва „нови комбинации от генетичен материал извън генетичния фонд на животновъдите“. Освен това в този документ се посочва също, че „**цисгенезата и интрагенезата използват същите техники на трансформация като трансгенезата**“.

В този контекст и в обобщение **опасностите от цисгенни и интрагенни растения са свързани, в сравнение с трансгенните и традиционно отглежданите растения, с източника на ДНК и безопасността на генните продукти, промяната на генома на гостоприемника на мястото на въвеждане и на други места, както и потенциалното наличие на нерастителни последователности и експресирането на вмъкнатите гени**, кодиращи желаната фенотипна черта и **потенциалните му по-широки последици**.

Що се отнася до източника на ДНК и безопасността на генния продукт, научното становище на ЕОБХ в крайна сметка стига до заключението, че **капацитетът за генериране на нови токсини или алергени или за промяна на състава на цисгенните растения няма да бъде различен от този на конвенционалните растения**. Въпреки това, "когато при интрагенеза се използва свързан с растителен произход ген, **могат да възникнат някои нови комбинации от генетични елементи, които не се срещат в цисгенни и конвенционално отглеждани растения и те могат да представляват нови фенотипни варианти с нови опасности**. Могат да бъдат идентифицирани и опасности, които са специфични за трансгенните растения, тъй като трансгените и техните генни продукти могат да бъдат получени от всеки източник, включително от нерастителни видове.“

По отношение на промените в генома на гостоприемника, научното становище на ЕОБХ посочва, че цигенезата и интрагенезата използват същите техники на трансформация като трансгенезата, т.е. случайно вмъкване на ДНК фрагмент в генома. Следователно **цисгенните, интрагенните и трансгенните растения не причиняват други опасности по отношение на прекъсването на ендогенните гени или създаването на нови ДНК връзки с генома на гостоприемника**. В становището също се припомня, че **потенциалът за „случайни“ промени в генома, причинени от събитието на вмъкване, не се ограничава до трансгенеза, цисгенеза и интрагенеза**. Известно е, че **този вид мутагенеза** се среща **естествено чрез произволното движение на множеството мобилни генетични елементи** като транспозони и ретротранспозони, **които присъстват във всички растителни геноми**. В научното становище на ЕОБХ се споменава все пак, че **тези непреднамерени промени в генома по време на трансгенеза, интрагенеза и цисгенеза биха могли да доведат до проблем, свързан с безопасността**. Все пак същите механизми и видове непреднамерени изменения на генома възникват по време на конвенционалното размножаване, тъй като е добре известно, че растителният геном не е фиксиран обект.

Що се отнася до потенциалното наличие на ДНК секвенции, които не са растителни, становището посочва, че „по дефиниция **цисгенните и интрагенните растения не трябва да съдържат векторни генетични последователности от бактериален произход**“.

Що се отнася до **изменението на експресията на гените на реципиента**, в становището на ЕОБХ се описва, че „като се има предвид известната пластичност на растителния геном, **конвенционалното развъждане се очаква да доведе до промени в моделите на геномна експресия в потомството в сравнение с родителските**

линии“. Що се отнася до въведените последователности чрез цисгенезата, интрагенезата и трансгенезата, научното становище на ЕОБХ анализира ефекта на вмъкването съобразно позицията на интеграция на чуждия ген и посочва, че „**случайната интеграция на цис-/интра-/трансгена в растителните геноми може да повлияе на експресията на гените или да повлияе на функционалността на регулаторните елементи около мястото на интеграция**. **Въведената ДНК може също така да има засилващ или заглушаващ ефект върху експресията на гените** на реципиента. Не трябва да се забравя, че **функционалността на промотора** е основно **свързана с определяне нивото на генната експресия**, но също така „**промоторите на растителни гени** могат да **имат регулаторни елементи**, които са разположени на няколко килобази от транскрипционния начален локус или разположени надолу по веригата или в рамките на транскрибирания регион„ и **прогнозирането на нивата на генна експресия понастоящем не е възможно на база теоретични познания**“.

Има ли нова налична информация, която би могла да окаже въздействие върху рисковете оценка на растенията и производните продукти, включени в становището на ЕОБХ от 2012 г.?

Примери за проведени изпитвания и анализ на трансгенни, интрагенни и цисгенни растения:

Holme et al., 2012 докладват за анализ на ечемични растения, съдържащи допълнително копие на гена, кодиращ фитаза, включително собствените му промоторни и терминаторни последователности, което е довело до 2,6 - 2,8 - кратно увеличение на фитазната активност, потенциално интересна за агрономите фенотипна черта. Въведеният цисген е ограден от 36 синтетични и 19 ДНК гранични нуклеотиди, които са единствените нуклеотиди с неечемичен произход в крайното растение. Проследяването на активността на фитазата в зърното потвърждава 2,2-кратно увеличение на активността при полеви условия. Това проучване също така показва потенциала за подреждане на различни фитаза цисгени с цел увеличаване на фитазната активност.

По отношение на интрагенезата *Miroshnichenko et al., 2020* в своето проучване докладват, че са подложили на анализ на растения, трансформирани чрез вмъкване на обратен повтор на фрагмент от картофен ген *eIF4E1*, отделен от функционален интрон от картофения rbsc1 ген, под контрола на картофени Lhca3 промотор и терминаторна последователност. Това модифицирано растение показва частично заглушаване на ендогенните гени *eIF4E1* и *eIF4E2* и високо ниво на вирусна резистентност.

Almeraya, Sánchez-de-Jiménez, 2016 обследват биотрансформация на интрагенна конфигурация, състояща се от кодираща последователност на протеиновия ген на царевичната активаза *RuBisCo* под контрола на промотора и терминатора на *RuBisCo,* което е довело до преекспониране на протеина *RuBisCo* активаза. Въпреки че не са напълно охарактеризирани тези растения, те по принцип следва да съдържат само последователности с произход от царевица.

Данните, включени в докладите за характеризиране на цисгенните и интрагенните растения, публикувани от 2012 г. насам, включително разгледаните по-горе, **не показват допълнителни опасности в сравнение с вече установените в становището на ЕОБХ от 2012 г.** Освен това след публикуването на становището на ЕОБХ от 2012 не са предоставени нови данни, които биха оспорили заключенията в документа.

Има ли нови техники/подходи, разработени от 2012 г. насам, които може ли да се използва за получаване на цисгенни/интрагенни растения, както е определено в становището от 2012 г.?

От 2012 г. насам използването на NGT, и по-специално на подходите на **CRISPR**, е широко възприето в публичните и частните научноизследователски лаборатории. Една от възможните употреби на сайт насочените нуклеази е целенасоченото интегриране на последователности, техника, наричана SDN-3. **SDN-3** може да **се използва за въвеждане на цисген/интраген на определено място в генома, за да се гарантира, например, неговата експресия или да се сведе до минимум въздействието върху генома на реципиента**. Една от най-често срещаните техники, използвани при селекцията на растения от развъдчиците и агрономите на растения, е да се въведе черта (често кодирана от един ген, напр. резистентност към патоген) от съвместим див вид в култивиран чрез кръстосване и след това последователно отглеждане с култивирания сорт. **Новополученият сорт** носи **интегрирания ген, но също така и областите на ДНК от дивите видове от двете страни на интегрирания ген**. Понякога **тези региони** носят гени, които имат **отрицателно въздействие върху фенотипа на новия сорт**. След това е **много трудно за селекционера да елиминира тези гени, които са генетично свързани с гена, който представлява интерес**. **NGT позволява** чрез цисгенеза **да се въведе само генът, представляващ интерес, без съседните региони**, или в замяна на ортоложния ген, който би могъл да се счита за подход, подобен на „SDN-2“, или чрез подход SDN-3 в предварително определен локус в генома на култивирания сорт.

Въпреки че **от 2012 г. насам не са предложени нови заявления за комерсиализация на продукти, получени от цисгенеза или интрагенеза**, получени чрез техники SDN-2 или SDN-3, **изключително бързото развитие на NGT** през последните години (*Huang, Puchta, 2019*) следва да улесни създаването на такива растения и би следвало, както бе споменато в становищата на ЕОБХ, **оценката на риска да е по-лесна**, бърза и да не се нуждае от допълнителни данни.

Ако съществуват нови техники/подходи, какви са потенциалните рискове това може ли да се случи в сравнение с вече обхванатите в становището от 2012 г.?

Експертната група на ЕОБХ по ГМО в становището си относно оценката на **безопасността на растенията, разработени с помощта на нуклеаза 3 цинкови пръсти и други нуклеази с подобна функция**, заключава, че **техниката SDN-3 може да оптимизира геномната среда за генна експресия и да сведе до минимум опасностите, свързани с нарушаването на гени и/или регулаторни елементи в**

генома на реципиента, които могат да възникнат, когато цисген, интраген или трансген е интегриран в генома. Освен това през 2020 г. експертната група по ГМО **не е идентифицирала нови опасности, конкретно свързани с геномната модификация, произведена чрез SDN-2, в сравнение с SDN-3 и конвенционалното развъждане**. Следователно производството на цисгенни растения чрез **подходите SDN-2 или SDN-3** би **могло да сведе до минимум опасностите, свързани с въведената ДНК и респективно фенотипната черта**, тъй като те вече съществуват в генния фонд на селекционерите и в този аспект „новите растения“ биха били подобни на растенията, получени чрез класическа селекция. В допълнение, **използването на SDN-2 подобни или SDN-3 подходи** за производство на цисгенни или интрагенни растения ще **сведе до минимум потенциалните промени в генома на гостоприемника, наблюдавани по време на случайната интеграция чрез EGT**, и ще избегне възможния негативен ефект.

По отношение на растения за цисгенеза/интрагенеза и производни продукти, които не са обхванати в становището на ЕОБХ от 2012 г., са разгледани следните въпроси за оценка на риска:

Какви са новите растения и производните продукти, които могат да бъдат получени използване на нови подходи, по-специално с използването на NGT, които биха могли да доведат до цисгенни/интрагенни растения в съответствие с определението, дадено в рамките на настоящия мандат?

Към настоящия момент експертната група по ГМО **не е запозната с никакви цисгенни или интрагенни растения и производни продукти, постигнати чрез NGT, които са близки до комерсиализация в ЕС**. За новите растения и производните продукти, както е определено по-рано, в една публикация на *Shi et al., 2017* се докладва последователност, въведена в кръстосан вид чрез NGT (г.). Авторите описват CRISPR/Cas-медииран подход за вмъкване на промотора на царевицата GOS2 в 5' UTR региона на ARGOS8. Целевите фенотипни черти са свързани с устойчивост на патогени на царевицата и увеличаване на добива. В друг експеримент авторите заменят промотора на родителската линия с конститутивния промотор на GOS2. И при двата варианта, с генна редакция, нивата на транскрипция на ARGOS8 са значително по-високи от тези, наблюдавани при дивите типове растения, като вследствие на това се подобрява добивът на зърно при стресови условия на суша. И при двете техники промоторът на GOS2 е интегриран чрез CRISPR/Cas и чрез хомоложна генна редакция на ДНК, като се използва една sgRNA при вмъкването на промотора и две sgRNA в замяната на промотора. Този **научен труд е ясен пример за въвеждане на последователност, присъстваща за друг вид, за да се създаде алелна вариация за повишаване на толерантността към засушаване на културите**.

Какви биха могли да бъдат рисковете, които тези растения и производни продукти биха могли да представляват за хората, животните и околната среда в сравнение с рисковете, свързани с растения, получени чрез конвенционални техники за селекция на растения, и растения, получени с NGT?

Гамата от цисгенни/интрагенни растения и производни продукти обхваща различни видове модификации, които могат да доведат до различни потенциални опасности. Оригиналните или пренаредените последователности могат да бъдат насочени към регулаторните последователности на ендогенни гени. В този случай цисгенното/интрагенното растение няма да произвежда новоекспресиран протеин по отношение на конвенционалното му съответствие. Основната предвидена потенциална опасност би била свързана с модификациите и/или нивото на експресия на ендогенния протеин.

Оригиналните или пренаредените последователности също могат да бъдат насочени към кодиращата последователност на ендогенен ген с цел промяна на експресирания протеин. В този случай и в зависимост от въведената модификация, експресираният протеин може да се счита за новоекспресиран протеин (NEP), а потенциалните опасности, свързани с неговото изразяване, ще трябва да се оценяват за всеки отделен случай.

Всички тези цисгенни и интрагенни растения и производни продукти ще бъдат произведени чрез целенасочено въвеждане/модификация (напр. чрез SDN3), което допълнително свежда до минимум потенциалните опасности, свързани с нарушаването на други гени и/или регулаторни елементи в генома на реципиента.

ToR3: Да се определи дали съществуващите насоки за оценка на риска са приложими изцяло или частично и дали са достатъчни за цисгенни и интрагенни растения.

Заключенията от становището на ЕОБХ от 2012 г. относно приложимостта на съществуващите насоки все още са валидни, като се вземат предвид публикуваните нови насоки и информацията, предоставена след публикуването на настоящото становище.

ЕОБХ в становището си от 2012 г. стига до заключението, че „като се има предвид, че цисгените са получени от генния фонд на животновъдите и съдържат техен промотор и терминатор, следва **да се обмисли възможността за актуализиране на съществуващите насоки относно оценката на риска, за да се въведе допълнителна гъвкавост**. Както вече беше обсъдено, след публикуването на научното становище на ЕОБХ (експерт по ГМО на ЕОБХ, 2012а) не са предоставени нови данни, които биха оспорили заключенията, изложени в този документ, и следователно заключенията относно приложимостта на съществуващите насоки по отношение на цисгенните/интрагенните растения и производните продукти, обхванати в становището на ЕОБХ от 2012 г., остават валидни.

Както се предвижда в становището от 2012 г., вече може да бъде постигната сайт насочена интеграция. В тези случаи, както е обсъдено в становището на ЕОБХ за SDN-3, рискът, свързан с интегрирането в генома, може да бъде сведен до минимум и може да са необходими по-малко изисквания за оценката на тези растения. Следователно, когато тези техники се използват за производството на цисгенни или интрагенни растения, **необходимостта от гъвкавост при оценката би била още по-обоснована**.

Оценката на риска по отношение на храните и фуражите в научното становище на ЕОБХ (Панелът по ГМО на ЕОБХ, 2012) заключава, че „**общият подход и всички елементи, описани в насоките за оценка на риска от храни и фуражи, съдържащи генно модифицирани растения** (група на ЕОБХ по ГМО, 2011 г.), понастоящем **са достатъчни за оценката на цисгенните/интрагенните растения и производните храни и фуражи**.

Въпреки това, за оценката на хранителни и фуражни продукти, получени от цисгенни растения и интрагенни растения, може да се предвиди, че **за всеки отделен случай са необходими по-малко специфични за събитието данни**. Впоследствие **всички елементи на тези насоки за оценка на безопасността на храните и фуражите са въведени в Регламент (ЕС) № 503/2013**, **заедно с допълнителни изисквания**, като например задължително 90-дневно изследване на диетата при плъхове. Също така е доразвита оценката на потенциалната алергенност на новоекспресираните протеини и на цялото генетично модифицирано растение. В случай на **цисгенни/трансгенни растения**, когато е добре документирано, че растението донор **има история на безопасна употреба** като храна и фураж, **някои части от сравнителния анализ, токсичността, алергенността или оценка на консумацията може да не са необходими**. По този начин експертната група по ГМО потвърждава, че общият подход и всички елементи, описани в горепосочените документи с насоки и регламент за изпълнение, понастоящем са достатъчни за оценката на цисгенни/интрагенни растения и храни и фуражи. Експертната група по ГМО счита също така, че **заключенията на становището на ЕОБХ от 2012 г. относно оценката на храни и фуражи, получени от цисгенни и интрагенни растения, остават непроменени**.

По отношение на оценката на риска за околната среда научното становище на ЕОБХ относно оценката на безопасността на растенията, разработени чрез цисгенеза и интрагенеза, потвърждава, **че всички елементи, описани в насоките за оценката на риска за околната среда на генетично модифицираните растения, могат да се прилагат за цисгенни/интрагенни растения, и целесъобразността на прилагането на специфични елементи от насоките се определя за всеки отделен случай**. Експертната група по ГМО потвърждава, че заключенията от научното становище на ЕОБХ (Експертна група по ГМО на ЕОБХ, 2012) остават валидни. Освен това експертната група по ГМО публикува насоки относно агрономното и фенотипното характеризиране на растенията, постигнати посредством NGT (Панел за ГМО на ЕОБХ, 2015 г.), които са приложими за етапите от сравнителната оценка, които за всеки отделен случай ще бъдат необходими за оценката на цисгенните и интрагенните растения.

За растения, постигнати чрез цисгенеза/интрагенеза и производни продукти, които не са обхванати в становището на ЕОБХ от 2012 г., е разгледан следният въпрос за оценка:

Приложими ли са изцяло съществуващите насоки за оценка на риска или частично и достатъчно за тези нови растения и производни продукти?

Използването на NGT за въвеждане на оригинални или пренаредени последователности на кръстосани видове в специфични локуси от реципиентния геном дава възможност за промяна на регулаторните последователности, промоторите, интроните, терминаторите или кодиращите региони, за да се промени моделът/нивото на експресия на даден ген или последователността, характеристиките (алергенност, токсичност, хранителни стойности и т.н.), функцията и стабилността. Съответно **обхватът от растителните фенотипни характеристики и продуктите от растителен произход, които могат да бъдат получени, е по-широк от предложения в становището от 2012 г. и изискванията, необходими за тяхната оценка на риска, могат да варират за всеки отделен случай**. **Гъвкавостта при оценката на риска би била от особено значение**.

Ако **първоначалната или синтезираната последователност** е **насочена към регулаторни последователности на ендогенни гени**, **растението няма да произвежда новоекспресиран протеин и следователно изискванията**, които са за оценка на потенциалните опасности, **може да не са от значение**. Въпреки това основната потенциална опасност, ще бъде свързана с модификациите, насочени към експресивния модел на ендогенния протеин. Функциите на ендогенния протеин и фактът, че изменението на експресията остава в обхвата или е извън него, което съществува в конвенционалните сортове, ще бъдат взети предвид, за да се определи евентуалната необходимост от специфична оценка на риска от тази потенциална опасност.

В случаите, **когато първоначалната или синтезираната последователност на модифицираната култура е насочена към кодиращата последователност** на ендогенен ген с цел промяна на продуцирания протеин, и с цел промяна на първичната му функция (напр. промяна на ензимната активност, специфичност на субстрата, стабилност на протеина), **експресираният протеин** може да се счита за **новоекспресиран** протеин и **опасностите, свързани с неговата експресия, ще трябва да се оценяват за всеки отделен случай**.

Ако **модификацията е целенасочена и се постига с SDN-2 или PE**, то тогава се предполага, че тя е сайт насочена към специфичен локус от генома и **не би следвало да се различава от конвенционалното развъждане и респективно не би представлявала нова опасност и повечето, ако не всички, изисквания за оценка на риска не биха били от значение**. Всички тези цисгенни и интрагенни растения и производни продукти ще бъдат произведени чрез целенасочено въвеждане/модификация (напр. **чрез SDN-3**) на ендогенния ген, който ще бъде модифициран. Поради това те **няма да представляват нови опасности**, свързани с нарушаването на други гени и/или регулаторни елементи в генома на реципиента, а изискванията на Регламент (ЕС) № 503/201310 и насоките, които имат за цел оценка на тези непредвидени ефекти, няма да бъдат от значение. Освен това, тъй като оригиналната последователност няма да представи нови вътрешни ORF (отворена рамка на четене), следва **да бъде оценена само новата ORF на интеграцията**.

Съгласно Регламент (ЕС) № 503/2013 оценката на риска за околната среда на цисгенни/интрагенни продукти ще се оценява за всеки отделен случай. С развитието на

технологиите, с натрупаните до момента становища, литературни прегледи, проучвания и проведени изпитвания, **за всеки отделен случай ще са необходими все по-малко данни за оценката на риска за околната среда на цисгенни или интрагенни растения, получени чрез NGT**. За трите области на оценка на риска съществуващите насоки ще бъдат частично приложими, а частите от насоките, които не са приложими, ще се различават за всеки отделен случай. Поради това **оценката на риска трябва да е гъвкава**, за да се адаптира към всяко конкретно растение и продукт, предмет на оценката.

ToR 4: В случай че съществуващите насоки за оценка на риска се считат за неприложими, частично приложими или недостатъчни, за да се определи по кои аспекти съществуващите насоки следва да бъдат актуализирани, адаптирани или допълнени, кой аспект (ако има такъв) от съществуващите насоки следва да бъде актуализиран, адаптиран или допълнен?

Както е посочено по-горе, за цисгенни/трансгенни растения, за които е добре документирано, че растението донор има история на безопасна употреба като храна и фураж, някои части от сравнителния анализ, токсичността, алергенността или хранителната оценка може да не са необходими. Също така може да се очаква, че повишената прецизност на новите методи за постигане на предвидените ефекти и модификации в сравнение с установените геномни техники постепенно ще позволи по-голяма гъвкавост в необходимите данни, насочени към идентифициране на нежелани ефекти. В този контекст, например, **могат да бъдат преразгледани някои задължителни изисквания, като например 90-дневните изследвания на храненето и диетата при липса на хипотеза за опасност/риск**.

Както е обяснено в ToR3, **поради точността на насочване при интегрирането на екзогенната ДНК последователност**, **обхватът на одобрение** на цисгенните и интрагенните растения и производните им продукти **може значително да се увеличи**. От една страна, могат да се произвеждат растения, при които цисгенът, съответстващ на вече съществуващ алел в генетичния резерв на селекционерите, ще бъде насочен към съответния ендогенен ген (чрез стратегия, подобна на SDN2). Такива растения биха могли да се считат за безопасни като растения, при които гена, представляващ интерес, би бил интегриран чрез класическа селекция. От друга страна, опасностите, свързани с интрагенно растение, при които целенасоченото интегриране на интрагенна последователност може значително да промени функцията и експресията на ендогенен ген, биха могли да бъдат сравними с тези, свързани с трансгенно растение, получено чрез SDN3. Между тези два противоположни случая има континуум и изискванията, необходими за оценката на риска на тези растения, могат да се различават.

Заключения и препоръки

По искане на Европейската комисия ЕОБХ направи оценка дали заключенията от научното становище на ЕОБХ (експертна група по ГМО на ЕОБХ, 2012) относно цисгенезата и интрагенезата остават приложими с оглед на развитието на NGT. От експертната група на ЕОБХ по ГМО е поискано 1) да **идентифицира потенциалните**

рискове, които растенията, получени чрез цисгенни и интрагенни подходи, биха могли да породят за хората, животните и околната среда; 2) **Сравняване на горепосочените рискове с тези, свързани с растения, получени чрез конвенционални техники за селекция** на растения и растения, получени с EGT; 3) **Определяне дали съществуващите насоки за оценка на риска са приложими, изцяло или частично, и достатъчни за цисгенни и интрагенни растения**; 4) В случай че **съществуващите насоки за оценка на риска се считат за неприложими, частично приложими или недостатъчни**, **да се определи по кои аспекти съществуващите насоки следва да бъдат актуализирани, адаптирани или допълнени**.

Експертната група на ЕОБХ по ГМО заключава, че:

- След публикуването на становището на ЕОБХ от 2012 г. **няма нови данни, които да оспорят заключенията, направени в този документ** (група на ЕОБХ по ГМО, 2012 г.). **Заключенията** от научното становище на ЕОБХ от 2012 г. **остават валидни**. Експертната група по ГМО на ЕОБХ отново подчертава, че по отношение на източника на ДНК и безопасността на генния продукт, „опасностите, произтичащи от използването на свързан ген, получен от **растения чрез цисгенеза, са сходни с тези от конвенционалното растениевъдство**, докато за **интрагенните растения могат да възникнат допълнителни опасности**“. Освен това експертната група на ЕОБХ по ГМО счита, че „**цисгенезата и интрагенезата използват същите техники на трансформация като трансгенезата**“ и следователно, що се отнася до промените в генома на гостоприемника, **цисгенните, интрагенните и трансгенните растения**, получени чрез случайно вмъкване, не **причиняват различни опасности**.

Цисгенни/интрагенни растения чрез подходи, подобни на „SDN-2“ или SDN-3, биха могли:

- Да **минимизират опасностите, свързани с въведената ДНК и фенотипна черта**, тъй като те вече съществуват в генния фонд на селекционера и в този аспект биха били подобни на растенията, получени чрез класическа селекция,
- Да **минимизират потенциалните промени в генома на гостоприемника**, наблюдавани по време на случайната интеграция чрез EGT (т.е. нарушаване на други гени и/или регулаторни елементи; създаване на нови ORF),
- Да **избегнат възможния непредвиден и нежелан ефект в двойноверижната ДНК**.

Използването на **NGT позволява генерирането на нови цисгенни/интрагенни растения и производни продукти**, които не са обхванати от научното становище на ЕОБХ от 2012 г. **За тези растения** и производни продукти експертната група на ЕОБХ по ГМО заключава, че:

- Ако **цисгенната/интрагенната последователност е насочена към регулаторни последователности на ендогенни гени**, цисгенното/интрагенното растение няма да произвежда новоекспресиран протеин сравнено с конвенционалното му

съответствие и основната **потенциална опасност би била свързана с вида модификация, техниката за генна редакция и/или нивото на експресия на ендогенния протеин**.

- Ако **цисгенната/интрагенната последователност е насочена към кодиращата последователност на ендогенен ген**, експресираният протеин може да се счита за новоекспресиран протеин (NEP), в зависимост от **въведената модификация, и потенциалните опасности, свързани с неговата експресия, ще трябва да се оценяват за всеки отделен случай**.
- По отношение на **оценката на риска за околната среда всички елементи, описани в настоящите насоки, са достатъчни за оценка на риска от цисгенни/интрагенни растения**.
- Съществуващите **насоки** ще бъдат **частично приложими, тъй като за всеки отделен случай може да не са необходими някои изисквания за оценката на риска**. Поради това **за оценката на риска може да е необходима гъвкавост**, за да се адаптира към всяко конкретно растение и продукт, предмет на оценката.

Настоящите насоки биха могли да се считат за **достатъчни и частично приложими за оценката на растения за цисгенеза/интрагенеза и продукти, получени чрез NGT**.

По искане на Европейската комисия, **ЕОБХ предложи в настоящото изявление няколко критерия за оценка на риска от растения, произведени чрез целева мутагенеза, цисгенеза и интрагенеза. Предложените критерии следва да се разглеждат като съвети, които да бъдат разгледани от ЕК.**

Като се вземат предвид критериите, предложени в настоящия документ и предвид предизвикателствата, разгледани по-горе в текста, **идентифицирането на нежеланите ефекти следва да се основава на HoSU и/или на изследването на функцията и структурата, свързани с модифицираната (в случай на геномно редактирани растения) или вмъкнатата (в случай на цисгенни и интрагенни растения) последователност/алелна вариация**. **HoSU е ключов момент в пълната оценка на риска**. ЕОБХ препоръчва в близко бъдеще **да се разработи определение за HoSU в подкрепа на оценката на риска** в контекста на настоящият доклад и в други области, в които се използват тези нови геномни технологии.

Описаните по-горе аспекти на оценката на риска следва **да се разглеждат като препоръки, които следва да бъдат допълнително разработени, за да се даде възможност за пълна приложимост на критериите, описани в настоящият документ**, и да не посочват изисквания за данни за оценката на риска на тези растения.

Въз основа на прегледа на информацията, извлечена от търсенето на литература и познанията на експертите, експертната група по ГМО заключи, че:

- **Не са установени нови рискове в цисгенни и интрагенни растения, получени с NGT**, в сравнение с вече разгледаните за растения, получени с конвенционално развъждане и EGTs. Поради това **заключенията на научното становище на ЕОБХ**

от 2012 г. (ЕОБХ, експертна група по ГМО 2012а) остават **валидни**. От тези заключения експертната група на ЕОБХ по ГМО потвърждава, че **по отношение на източника на ДНК и безопасността на генния продукт опасностите**, произтичащи от употребата на свързан ген, получен от растения чрез цисгенеза, са **сходни с тези от конвенционалното растениевъдство**, докато за **интрагенните растения могат да възникнат допълнителни опасности**. Освен това експертната група на ЕОБХ по ГМО счита, че **цисгенезата и интрагенезата** използват **същите техники на трансформация** като трансгенезата и следователно **по отношение на измененията на генома** на гостоприемника цисгенни, интрагенни и трансгенни растения, получени чрез случайно вмъкване, **не причиняват различни опасности**.

- Може да са **необходими по-малко изисквания за оценка на цисгенни и интрагенни растения, получени чрез NGT**, поради сайт **целенасочено интегриране** на добавения генетичен материал.
- В случай че растението донор е класифицирано за безопасна употреба като храна и фураж, **някои етапи от сравнителния анализ, токсичността, алергенността или хранителната оценка може да не са необходими.**
- По отношение на **оценката на риска за околната среда всички елементи, описани в действащите насоки, могат да се прилагат за цисгенни/интрагенни растения**. Поради това експертната група по ГМО заключава, че **настоящите насоки са частично приложими и достатъчни**. За всеки отделен случай може да са необходими по-малко данни за оценката на риска от цисгенни или интрагенни растения, получени чрез NGT.

Основните заключения от посочените по-горе становища, свързани с настоящия мандат, са следните:

- **Растенията, произведени чрез техниките SDN-1, SDN-2 и ODM**, **нямат нови опасности** в сравнение с традиционно отглежданите и трансгенните растения.
- Подобни опасности могат да бъдат свързани с цисгенни и конвенционално отглеждани растения, докато **новите опасности могат да бъдат свързани с интрагенни и трансгенни растения**.
- **Съществуващите документи с насоки на ЕОБХ** са **достатъчни и приложими** в случай на растения, произведени чрез цисгенеза и интрагенеза, и **достатъчни и частично приложими в случай на растения, произведени чрез техники SDN-1, SDN-2 и ODM**.
- Съществува **необходимост от гъвкавост в изискванията за данните за оценката на риска**, тъй като за всеки отделен случай може да е необходимо по-малко количество данни.
- В становището на SDN-3 се заключава, че **техниките SDN-3 могат да се използват за цисгенеза/интрагенеза**.

Въпреки че научното становище относно SDN-1, SDN-2 и ODM е много скорошно, датирано от 2020 г., научните становища за цисгенезата/интрагенезата и

SDN-3 датират от 2012 г. Те вземат предвид наличните по това време техники, по-специално *Agrobacterium*-медиирана трансформация и директен генен трансфер, въпреки че някои от съображенията в тях не са свързани с използването на конкретна техника. От 2012 г. насам е настъпило развитие по отношение на научните знания и технологии. По-специално, **техниките за редактиране на генома, включително SDN, вече могат да се използват, самостоятелно или в комбинация с други техники, за производството на цисгенни и интрагенни организми**, в допълнение към EGT.

Изготвил:

Красимира Захариева,

Главен експерт в дирекция ОРХВ, ЦОРХВ

Използвана литература:

- *Public consultation on plants produced by certain new genomic techniques – https://www2.itif.org/2022-eu-consultation-gm-plants.pdf / https://food.ec.europa.eu/system/files/2022-04/sc_modif-genet_pub-cons-factsheet.pdf*
- *https://food.ec.europa.eu/plants/genetically-modified-organisms/new-techniques-biotechnology_en*
- *Criteria for risk assessment of plants produced by targeted mutagenesis, cisgenesis and intragenesis - https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7618*
- *Implications of the EFSA Scientific Opinion on Site Directed Nucleases 1 and 2 for Risk Assessment of Genome-Edited Plants in the EU - Nils Rostoks - https://doi.org/10.3390/agronomy11030572*
- *Risk Assessment of Plants developed by new Genetic Modification Techniques (nGMs) Comparison of existing Regulation Frameworks in non-EU Countries with a Focus on the respective Requirements for Risk Assessment - Michael Eckerstorfer, Anita Greiter and Andreas Heissenberger - https://www.bfn.de/sites/default/files/BfN/service/Dokumente/skripten/skript598.pdf*
- *Scientific opinion addressing the safety assessment of plants developed through cisgenesis and intragenesis - https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2561*
- *Scientific opinion addressing the safety assessment of plants developed using Zinc Finger Nuclease 3 and other Site-Directed Nucleases with similar function - https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2943*
- *Applicability of the EFSA Opinion on site-directed nucleases type 3 for the safety assessment of plants developed using site-directed nucleases type 1 and 2 and oligonucleotide-directed mutagenesis - https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6299*
- *Regulatory approaches for genome edited agricultural plants in select countries and jurisdictions around the world - Jon Entine, Maria Sueli S. Felipe, Jan-Hendrik Groenewald, Drew L. Kershen, Martin Lema, Alan McHughen, Alexandre Lima Nepomuceno, Ryo Ohsawa . Reynante L. Ordonio, Wayne A. Parrott, Hector Quemada, Carl Ramage, Inez Slamet-Loedin, Stuart J. Smyth . Diane Wray-Cahen - https://doi.org/10.1007/s11248-021-00257-8*
- *Testbiotech analysis of the EU Commission's Inception Impact Assessment on "Legislation for plants produced by certain new genomic techniques", published 24 September 2021 - https://www.testbiotech.org/sites/default/files/TBT%20analysis%20of%20EU%20Commission_IIA_NGT.pdf*
- *https://food.ec.europa.eu/system/files/2021-04/gmo_mod-bio_stake-cons_ms-reply-bgr.pdf*
- *Cisgenics - A Sustainable Approach for Crop Improvement - R.S. Telem1, Shabir. H. Wani, N.B. Singh, R. Nandini, R. Sadhukhan, S. Bhattacharya, N. Mandal - https://www.researchgate.net/publication/257128303_Cisgenics_-_A_sustainable_Approach_for_Crop_Improvement*
- *ARGOS8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions - Jinrui Shi, Huirong Gao, Hongyu Wang, H Renee Lafitte,*

Rayeann L Archibald, Meizhu Yang, Salim M Hakimi, Hua Mo, Jeffrey E Habben - https://doi.org/10.1111/pbi.12603

- *https://www.omicsonline.org/open-access/transgenic-cisgenic-intragenic-and-subgenic-crops-2329-8863-1000e123.php?aid=52309#:~:text=The%20crop%20intragenic%20is%20a,into%20a%20host%20crop%20genome.*
- *Intragenesis and cisgenesis as alternatives to transgenic crop development - Inger Bæksted Holme, Toni Wendt,Preben Bach Holm - https://doi.org/10.1111/pbi.12055*
- *Cisgenesis and intragenesis, sisters in innovative plant breeding - Henk J. Schouten, Evert Jacobsen, https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.04.005*
- *Siddique, M.I., Younis, A., Naing, A.H. and Kim, C.K., 2022. Cisgenic Crops and Disease Resistance. In Cisgenic Crops: Potential and Prospects (pp. 145-167). Springer, Cham.*
- *González-Calquín, Christian, Luciano Univaso, and Claudia Stange. "Cisgenesis and Intragenesis as a Biotechnological Tool to Improve Abiotic Stress Tolerance in Commercial Crops." In Cisgenic Crops: Potential and Prospects, pp. 169-181. Springer, Cham, 2022.*
- *Mundembe, R., 2022. Site-Specific Recombination and the Development of Cisgenic Plants.*
- *Ghose, K., Yuan, N., Dampanaboina, L. and Mendu, V., 2022. Cisgenesis in the Era of Genome Editing and Modern Plant Biotechnology. In Cisgenic Crops: Potential and Prospects (pp. 257-279). Springer, Cham.*
- *Miroshnichenko I, Timerbaev V, Okuneva A, Klementyeva A, Sidorova T, Pushin A and Dolgov S, 2020.Enhancement of resistance to PVY in intragenic marker-free potato plants by RNAi-mediated silencing of eIF4Etranslation initiation factors. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 140, 691–705. https://doi.org/10.1007/s11240-019-01746-9*
- *Anzalone, A.V., Gao, X.D., Podracky, C.J., Nelson, A.T., Koblan, L.W., Raguram, A., Levy, J.M., Mercer, J.A. and Liu, D.R., 2022. Programmable deletion, replacement, integration and inversion of large DNA sequences with twin prime editing. Nature Biotechnology, 40(5), pp.731-740.*
- *Nelson, J.W., Randolph, P.B., Shen, S.P., Everette, K.A., Chen, P.J., Anzalone, A.V., An, M., Newby, G.A., Chen, J.C., Hsu, A. and Liu, D.R., 2022. Engineered pegRNAs improve prime editing efficiency. Nature biotechnology, 40(3), pp.402-410.*
- *Genome Editing in Crop Plant Research—Alignment of Expectations and Current Developments - Meike Hüdig , Natalie Laibach and Anke-Christiane Hein - https://doi.org/10.3390/plants11020212*
- *Kawall, K., 2021. Genome-edited Camelina sativa with a unique fatty acid content and its potential impact on ecosystems. Environmental Sciences Europe, 33(1), pp.1-12.*
- *Raffan, S., Sparks, C., Huttly, A., Hyde, L., Martignago, D., Mead, A., Hanley, S.J., Wilkinson, P.A., Barker, G., Edwards, K.J. and Curtis, T.Y., 2021. Wheat with greatly reduced accumulation of free asparagine in the grain, produced by CRISPR/Cas9 editing of asparagine synthetase gene TaASN2. Plant Biotechnology Journal, 19(8), pp.1602-1613.*

- *Sánchez-León, S., Gil-Humanes, J., Ozuna, C.V., Giménez, M.J., Sousa, C., Voytas, D.F. and Barro, F., 2018. Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. Plant biotechnology journal, 16(4), pp.902-910.*
- *Nonaka, Satoko, Chikako Arai, Mariko Takayama, Chiaki Matsukura, and Hiroshi Ezura. "Efficient increase of ɣ-aminobutyric acid (GABA) content in tomato fruits by targeted mutagenesis." Scientific reports 7, no. 1 (2017): 1-14.*
- *Kumar, V., Garg, V.K., Kumar, S. and Biswas, J.K. eds., 2022. Omics for Environmental Engineering and Microbiology Systems. CRC Press.*