

Til Landbrugsstyrelsen

Levering på bestillingen "Status for forskning og anvendelse af gene drives i Danmark, herunder potentielle anvendelser"

Landbrugsstyrelsen har i en bestilling sendt d. 16. september 2019 bedt DCA – Nationalt Center for Fødevarer og Jordbrug – om input til besvarelse af følgende tre spørgsmål: 1) Examples of research or applications of GMOs made by new techniques and on gene drive organisms in the country, 2) Guidelines for environmental risk, og 3) Usefulness in the country. Besvarelsen skal bruges som grundlag for en præsentation Landbrugsstyrelsen skal holde ved en workshop i Tallin senere i oktober.

Besvarelsen i form af vedlagte notat er for punkt 1 og 3 udarbejdet af videnskabelig assistent Claus Krogh fra Institut for Molekylærbiologi og Genetik, og punkt 2 er udarbejdet af Professor Christian Frølund Damgaard og Seniorforsker Christian Kjær, begge fra Institut for Bioscience. Lektor Kim Hebelstrup fra Institut for Molekylærbiologi og Genetik og Seniorrådgiver Morten Strandberg Institut for Bioscience har stået for fagfællebedømmelse af henholdsvis punkt 1 og 3, og punkt 2.

Besvarelsen er udarbejdet som led i "Rammeaftale om forskningsbaseret myndighedsbetjening mellem Miljø- og Fødevareministeriet og Aarhus Universitet" under ID 1.21 i "Ydelsesaftale Planteproduktion 2019-2022".

Venlig hilsen

Ulla Sonne Bertelsen
Specialkonsulent, DCA-centerenheden



Status for forskning og anvendelse af gene drives i Danmark, herunder potentielle anvendelser

1 Eksempler på forskning og anvendelser af GMO'er lavet med nye (forædlings)teknikker og på "gene drive" organismer i Danmark

Af Claus Krogh Madsen, Institut for Molekylærbiologi og Genetik

Forskning og anvendelser af nye forædlingsteknologier baseret på "Site Directed Nucleases" (SDN)

Nye forædlingsteknikker baseret på SDN har vakt stor interesse i dansk planteforskning. På Aarhus universitet, Sektion for Afgrodegenetik og Bioteknologi, indledtes forskning på området i 2012 med de første forsøg vedrørende mutationer induceret med TALENS i byg (Holme et al 2017). Med den hastige udvikling af CRISPR/Cas9 systemet overtog dette i løbet af et par år som den foretrukne SDN metode. Konkret er der / har der været aktiviteter hvor SDN metoder er anvendt til at modulere fytase ekspression i byg, øge anthocyanin indholdet i gulerødder og mindske ethylenfølsomheden i *Campanula*. Disse projekter har alle et klart anvendt sigte idet fytase er et vigtigt enzym for udnyttelsen af fosfor i foder, anthocyaniner udnyttes som naturlige farvestoffer i fødevarerindustrien og ethylenfølsomheden er afgørende for holdbarheden af *Campanula* blomster (Holme et al 2017; Innovationsfondsprojekt: "NEWPLAN"; GUDP Projekt: "SCaPGE"). På Københavns Universitet har man implementeret CRISPR/Cas9 systemet i modelplanten *Arabidopsis thaliana* og anvender det til justere aktiviteten af metalionpumper. Man har desuden beskæftiget sig med "rewilding" konceptet som drejer sig om at genintroducere nyttige genvarianter som er tabt under kulturplanternes domesticering. Dette kan f.eks. gøres ved at bruge anvende SDN teknologi til at redigere de pågældende gener (Palmgren et al 2015).

Forskning og anvendelser af andre nye teknologier

Foruden SDN teknikkerne arbejdes der med molekylære metoder til screening af store mutantpopulationer (TILLING mfl., Till et al 2003). Her anvendes traditionelle metoder til at inducere mutationerne, men i kraft af stadig mere effektive screeningsmetoder har man nu en høj sandsynlighed for at finde en bestemt mutation (Innovationsfondsprojekt: "LESSISMORE"). Derved nærmer den traditionelle mutationsforædling og SDN teknikkerne sig hinanden.

SDN teknologi som "gene drives"

I nogle arter er det vist at SDN teknologierne kan fungere som gene drives gennem den homologe reparations vej (homology directed repair pathway (HDR))(Barret et al 2019). Med den nuværende

viden er dette næppe effektivt i planter fordi de altovervejende reparer DNA brud men en anden mekanisme (nonhomologous end joining (NHEJ)). NHEJ giver ikke den samme mutation hver gang så derfor kan man ikke gennem denne mekanisme "drive" en helt bestemt genvariant. Man kan dog "drive" det resultat at målgenet inaktiveres. Ønskes en gene drives effekt i strengeste forstand kan man i stedet bruge den beslægtede base redigeringsmetode. Her skabes ikke brud på DNA strengen. I stedet ændres blot et enkelt basepar (Brinch-Pedersen *et al.*, 2018). SDN- og base redigerings teknologierne kan have en gene drives effekt så længe konstrukterne forbliver i genomet. Ved de applikationer der hidtil er set i Danmark er der imidlertid ikke noget behov for at bibeholde konstrukterne i planterne efter den ønskede mutation er introduceret. Det er derfor oplagt at fjerne dem ved almindelig udkrydsning inden en evt. kommerialisering. Det er således muligt at opnå fordelene ved de nye forædlingsteknikker uden en – oftest uønsket – gene drives effekt.

Forskning, anvendelser og potentiale af gene drives

Der er ikke blevet identificeret danske forskningsprojekter der søger at udnytte gene drives effekten som sådan. Overordnet set synes potentialet for en udnyttelse af gene drives i afgrødeplanterne at være begrænset. For det første er det ikke sikkert, at en sort med en gene drive kan opnå sortsbeskyttelse da UPOV konventionen tilsiger, at en sort skal være ensartet og stabil (Kap. 3, art. 8 og 9¹). Samme kriterier ligger til grund for optagelse på EU's sortsliste. En plante population, hvor en gene drive ændrer den genetiske struktur for hver generation, kan næppe siges at være ensartet og stabil. Der kan dog tænkes anvendt gene drives i afgrøder, hvor der markedsføres F1 hybrid frø, eksempelvis majs. Her kunne en gene drive udnyttes til at sikre hybridens en bestemt genvariant uden, at denne behøver at være i begge forælderlinjer.

Teoretisk set kan gene drives også anvendes til bekæmpelse af ukrudt og uønskede invasive plantearter. Til dette kan man tænke sig to grundlæggende strategier 1) direkte populations kontrol (f.eks. ved at kompromittere artens fertilitet) eller 2) sensitivering (f.eks. ved at øge artens følsomhed overfor et bestemt herbicid) (Barret et al 2019). Tiltagende forekomst af herbicidresistent ukrudt er et problem i landbruget. Derfor forudses en vis interesse for sensitiveringsløsningen internationalt. Endvidere er netop denne strategi velegnet til en baseredigerings løsning fordi herbicidresistens ofte skyldes enkelt mutationer i herbicidets mål.

2. Gene drive – miljøspørgsmål

Af Christian Damgaard og Christian Kjær, Institut for Bioscience

Den økologiske risikovurdering af GMO'er vurderer om de genetisk modificerede egenskaber potentielt kan have negative konsekvenser for arter, natur, økosystemer og miljø. Risikovurdering af GMO kan kun foretages i konkrete tilfælde, dvs. et givet transgen i en givet genetisk baggrund (case-by-case). Man kan således ikke risikovurdere en bioteknologisk fremgangsmåde generelt.

¹ <https://www.upov.int/export/sites/upov/upovlex/en/conventions/1991/pdf/act1991.pdf>

Specielt for gene-drive teknikken er, at det er muligt, at udrydde en art i et givet område, fx at udrydde malariabærende myg syd for Sahara (Det Etske Råd 2017). Denne mulighed giver anledning til nogle generelle overvejelser ved den økologiske betydning af at udrydde en art.

Effekter af at udrydde en art i et økosystem

Forskellige arter har forskellige funktioner i økosystemer, men der vil også typisk være nogen redundans i forskellige arters funktion, således at hvis en art bliver udryddet vil dens funktion i nogen grad blive erstattet af andre arter.

For eksempel, vil enkelte arters funktion som fødekilde eller/og predator kunne overtages af andre arter, selv om det også potentielt kan lede til uforudsigelige kaskadeeffekter hvor flere arter uddør som respons på en enkelt arts uddøen (de Ruiter et al. 2005; Eklöf and Ebenman 2006).

Mulig reetablering af oprindeligt økosystem

Et andet forhold som ikke umiddelbart er en del af den økologiske risikovurdering, men som kan være relevant at vurdere i nogle konkrete tilfælde, er muligheden for at anvende refugier til at reetablere det oprindelige økosystem.

Hvis det er muligt at etablere isolerede refugier for vildtypen, fx i laboratoriet, vil udsætning af individer med gene drive gener som er koblet til fx hanlig sterilitet i et givet område, medføre at populationen inkl. gene drive gener uddør i det givne område, man vil så efterfølgende kunne reintroducere vildtypen i området hvis dette skulle være ønskværdigt. Dog vil selv en temporær lokal udryddelse af en art potentielt kunne påvirke økosystemet i en uheldig retning.

I forbindelse med malariabærende myg kunne man forestille sig at introducere gene drive systemet i områder hvor malaria parasitten findes og når så myg, gene drive system, og malaria parasit er uddød kan man reintroducere myggen fra refugieområder uden malaria parasit.

Risikovurderingsmetoder

I behandlingen af risikovurdering af gene drive systemer er det bemærkelsesværdigt, at den videnskabelige risikovurdering ikke nævnes som et muligt redskab i OECD's rapport om myggens biologi (OECD 2018) som udelukkende diskuterer "concept of familiarity" (for en kritik af "concept of familiarity" se Damgaard and Løkke 2001), og Det Etske Råds rapport (Det Etske Råd 2017) som udelukkende diskuterer forsigtighedsprincippet.

Generelt anbefaler vi at anvende den videnskabelige risikovurdering, hvor både sandsynlighed og økologisk effekt af et opstillet økologisk scenarie estimeres eller vurderes, i risikovurderingen af GMO (Damgaard 2002; Damgaard and Løkke 2001).

Ved udryddelse af arter vha. gene drive vil det foruden den videnskabelige risikovurdering også være vigtigt hvordan en potentiel udsættelse kommunikeres ud i offentligheden (Brossard et al. 2019).

Foreløbige retningslinjer for konkrete risikovurderinger

I forhold til den risikovurdering der gennemføres for traditionelle GMO'er er der specielt to forhold der bør inkluderes for gene drives som afstedkommer populations- eller artsuddøen lokalt eller globalt. Det omfatter en vurdering af 1) økosystemeffekten ved at fjerne en art fra artspuljen og 2) om den nye genotype vil spredes (uønsket) til nye områder.

1. En vurdering af betydningen af at fjerne en art fra artspuljen kræver en viden om det økologiske netværk i et givent økosystem, dvs. den pågældende arts interaktion med andre arter i økosystemet og andre arters evne til at erstatte den art. De relevante arter kan eksempelvis være begrænset af andre resurser eller forhold der gør at de ikke fuldt kan erstatte den art der er fjernet. Det er ofte en information der ikke umiddelbart er tilgængelig.
2. I og med at denne type af modifikationer kan spredes i populationer også mod et selektionspres vil det betyde at arter modificeret på denne måde potentielt kan spredes til områder uden for udsætningsområdet. Det betyder at det vil være nødvendigt at lave en risikovurdering af etablering/spredning (sandsynlighed for introduktion, spredningsevne og kortlægning af spredningsveje). Dette vil kunne læne sig op ad tilgangen som er brugt for invasive arter som blandt andet inkluderer spredningsveje, sandsynlighed for naturlig eller uønsket/tilfældig introduktion til nye områder. Det kunne eksempelvis være uønsket hvis en invasiv art blev lokalt udryddet ved hjælp af gene drives, men egenskaben inden da blev spredt til artens oprindelige udbredelsesområde.

Slide forslag til møde i Tallinn

Guidelines for environmental risk?

Environmental risk assessment of product - not techniques

Case-by-case

Special ecological circumstances in the case of species eradication

3. Nytteværdien i Danmark

Af Claus Krogh Madsen, Institut for Molekylærbiologi og Genetik

Nye forædlingsteknikker vurderes generelt at have et stort potentiale i Danmark. Brug af gene drives i afgrøde- eller ukrudtsplanter synes for nærværende at have et langt mindre potentiale. Specielt brugen i ukrudtsplanter og invasive arter forudsætter et paradigmeskifte i forhold til ønsket om at kontrollere spredning af genetisk modificerede organismer (containment).

Litteraturliste

- Barrett LG, Legros M, Kumaran N, Glassop D, Raghu S and Gardiner DM. 2019. Gene drives in plants: opportunities and challenges for weed control and engineered resilience. *Proc. R. Soc. B.* 286.
- Brinch-Pedersen H, Gregersen PL, Bæksted Holme I, Hebelstrup K, Hougs L, Boelt B, Petersen KK og Gylling M. 2018. Vidensyntese om nye planteforædlingsteknikker og deres effekt på dansk landbrug; *DCA rapport* nr. 127, 2018
<http://web.agrsci.dk/djfpublikation/index.asp?action=show&id=1270>.
- Brossard D, Belluck P, Gould F, Wirz CD. 2019. Promises and perils of gene drives: Navigating the communication of complex, post-normal science. *Proc Natl Acad Sci.* 116(16):7692.
- Damgaard C. 2002. Quantifying the invasion probability of genetically modified plants. *BioSafety.* 7:Paper 1 (BY02001) Online Journal - URL: <http://www.bioline.org.br/request?by02001>.
- Damgaard C, Løkke H. 2001. A critique of the "concept of familiarity" as used in the ecological risk assessment of genetically modified plants. *BioSafety.* 6:Paper 1 (BY01001) Online Journal - URL: <http://www.bioline.org.br/request?by01001>.
- de Ruiter PC, Wolters V, Moore JC. 2005. Dynamic food webs: Multispecies assemblages, ecosystem development and environmental change. *Elsevier*.
- Det Etske Råd. 2017. Udtalelse om gene drive og crispr til fjernelse af uønskede arter.
<http://www.etiskraad.dk/~media/Etisk-Raad/Etske-Temaer/Genteknologi/Publikationer/2017-Udtalelse-om-gene-drive-og-CRISPR.pdf>
- Eklöf A, Ebenman BO. 2006. Species loss and secondary extinctions in simple and complex model communities. *Journal of Animal Ecology.* 75(1):239-246.
- GUDP projekt: "SCaPGE (Sustainable Campanula by Precise Genome Editing)". Projektperiode: 2016-2018. Online artikel om projektet:
<http://mbg.au.dk/aktuelt/nyhed/artikel/baeredygtighed-ligger-i-generne-1/>.
- Holme IB, Wendt T, Gil-Humanes J, Deleuran LC, Starker CG, Voytas DF, Brinch-Pedersen H. 2017. Evaluation of the mature grain phytase candidate HvPAPhy_a gene in barley (*Hordeum vulgare* L.) using CRISPR/Cas9 and TALENs. *Plant Mol. Biol.* 95: 111–121.
- Innovationsfondsprojekt: "LESSISMORE (Sustainable intensification of barley cultivation)". Projektperiode: 2017 – 2021. Online artikel om projektet: <http://mbg.au.dk/en/news-and-events/news-item/artikel/researchers-recreate-wild-crops-for-the-beer-of-the-future/>
- Innovationsfondsprojekt: "NEWPLAN". Projektperiode: 2015-2018. Online artikel om projektet: <http://mbg.au.dk/forskning/corefaciliteter/forskningsraadsbevillinger/newplan/>.
- OECD. 2018. Document of the biology of mosquito aedes aegypti, harmonisation of regulatory oversight in biotechnology. Safety Assessment of Transgenic Organisms in the Environment, Volume 8. Paris: OECD. <https://www.oecd.org/env/ehs/biotrack/safety-assessment-of-transgenic-organisms-in-the-environment-volume-8-9789264302235-en.htm>
- Palmgren MG, Edenbrandt AK, Vedel SE, Andersen MM, Landes X, Østerberg JT, Falhof J, Olsen LI, Christensen SB, Sandøe P et al. 2015. Are we ready for back-to-nature crop breeding? *Trends Plant Sci.* 20:155–164.
- Till BJ, Reynolds SH, Greene EA, Codomo CA, Enns LC, Johnson JE, Burtner C, Odden AR, Young K, Taylor, NE et al. 2003. Large-Scale Discovery of Induced Point Mutations With High-Throughput TILLING. *Genome Res.* 13:524–530.