

INSTITŪTA “BIOR”

ATSKAITE

AR JAUNĀM ĢENĒTISKO MODIFIKĀCIJU METODĒM IEGŪTU PĀRTIKAS, DZĪVNIEKU BARĪBAS UN TO PIEDEVU NOTEIKŠANA UN ŠĀDU PRODUKTU ZINĀTNISKĀ RISKA NOVĒRTĒJUMS

Izpildītājs:
Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības
un vides zinātniskais institūts “BIOR”

RĪGA 2021

APSTIPRINU
Zemkopības ministrijas
Veterinārā un pārtikas departamenta direktore
Zanda Matuzale

Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskais institūts "BIOR"

Zemkopības ministrijas pasūtītais zinātniskais pētījums
Līgums Nr. 21-00-SOINV05-000009

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

GALA ATSKAITE

Rīga
2021

Satura rādītājs

Saīsinājumu saraksts.....	5
KOPSAVILKUMS.....	7
ZM LAD projektā 2021. gadā paveiktā darba apraksts.....	9
Projekta mērķis un uzdevumi.....	9
Projekta aktivitātes 2021. gadā.....	11
1. Literatūras analīze par jaunākajām ģenētisko modifikāciju metodēm organismiem, kas tiek izmantoti pārtikas un dzīvnieku barības un to piedevu ražošanā	13
1.1. Ģenētiski modificētu mikroorganismu izmantošana pārtikas un dzīvnieku barības piedevu un uztura bagātinātāju ieguvē un to detekcijas metodes.....	13
1.1.1. Ievads	13
1.1.2. Pārtikas fermentus producējošo baktēriju ģenētiskā materiāla klātbūtnes noteikšana pārtikas fermentu produktos (pēc Deckers et al., 2020)	17
1.1.3. Ģenētiski modificēta <i>B. subtilis</i> celma noteikšana B2 vitamīnu saturošās barības piedevās (pēc Paracchini et al., 2017 un Fraiture et al., 2021)	19
1.1.4. Antimikrobiālās rezistences gēni ģenētiski modificētu mikroorganismu klātbūtnes noteikšanā pārtikas un barības produktos	27
1.1.5. Neautorizētu ģenētiski modificētu baktēriju identificēšana pārtikas enzīmos ar pilna genoma sekvenēšanu (pēc Fraiture et al., 2020d).....	33
1.1.6. Ģenētiski modificētas <i>Bacillus</i> ģints baktēriju plazmīdu antimikrobiālās rezistences gēnu raksturošana, kombinējot īsus un garus sekvenču nolasījumus (pēc Berbers et al., 2020).....	35
1.2. Genomiski rediģēti kultūraugi un citi organismi.....	38
1.2.1. Eiropas Savienības Komisijas pētījums un saistītie pētījumi.....	38
2. Ekspozīcijas novērtējuma rezultāti.....	44
2.1. Pārtikas, dzīvnieku barības un to piedevu paraugu analīžu rezultāti.....	44
2.1.1. Ievads	44
2.1.2. Analizētie paraugi un metodes	45
2.1.2. Rezultāti.....	51
2.2. Jaunu zinātniski analītisko metožu izmantošana darbā ar modeļorganismiem	67
3. Genomiski rediģētu organismu risku vadības rekomendācijas	77
3.1. Ar jauniem genomikas paņēmieniem iegūtu augu riska novērtējums.....	77
3.2. Sintētiskās bioloģijas organismu riska novērtēšana	83
3.2.1. Ievads.....	83
3.2.2. EK mandāts (Terms of Reference)	84
3.2.3. Zinātniskās literatūras analīze par SynBio attīstību (<i>horizon scanning</i>)	85

3.2.4.	SynBio organismu molekulārais raksturojums	86
3.2.5.	SynBio organismu vides riska novērtēšana	87
3.2.6.	Secinājumi	88
3.2.7.	Nākotnes perspektīvas	88
3.3.	Genomiski rediģētu organismu risku vadības rekomendācijas	89
	Izmantotā literatūra	95
	Pielikumi	102
1.	pielikums. Projekta darba grupas sanāksmes PROTOKOLS 1	103
2.	pielikums. Projekta darba grupas sanāksmes PROTOKOLS 2	107
3.	pielikums. Populārzinātniskā raksta manuskripts	109
4.	pielikums. Semināra programma LU doktorantūras skolas studentiem	114

Saīsinājumu saraksts

AGS	<i>Accelerated Growth Salmon</i>
AHAS	Acetohidroksiskābes sintāze
ALS	Acetolaktāta sintāze
AMR	Antimikrobiālās rezistences gēni
AOCS	<i>American Oil Chemists' Society</i>
ASV	Amerikas Savienotās Valstis
BIOR	Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskais institūts "BIOR"
Cas	Ar CRISPR saistītas nukleāzes
CRISPR	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
dPKR	Digitālā polimerāzes ķēdes reakcija
DSBs	<i>Double-strand breaks</i>
EK	Eiropas Komisija
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
EMNs	Meganukleāzes
ENGL	<i>European Network of GMO Laboratories</i>
EPNI	Eiropas Pārtikas nekaitīguma iestāde
ERM	European Reference Materials
ES	Eiropas Savienība
EUGINIUS	<i>EUropean GMO INItiative for a Unified database System</i>
EURL GMFF	<i>European Reference Laboratory for Genetically Modified Food and Feed</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GDO	Gēnu dziņu organisms
GMO	<i>Genetically modified organisms</i>
ĢM	Ģenētiski modificēts
ĢMO	Ģenētiski modificēts organisms
ĢMM	Ģenētiski modificēti mikroorganismi
HGSAM	<i>High Level Group of the Scientific Advice Mechanism</i>
HR	Homologā rekombinācija
ISAAA	<i>International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications</i>
ISU	<i>Iowa State University</i>
JGP	Jauni genomikas paņēmieni
JRC	<i>Joint Research Centre</i>
KVV	Koloniju veidojošās vienības
LAD	Lauku atbalsta dienests
LLP	<i>Low level presence</i>
LMO	Dzīvs modificēts organisms
LOD	Detekcijas limits
LOQ	Kvantifikācijas limits
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NGS	<i>Next generation sequencing</i>
NHEJ	Nehomologā DNS galu savienošana

ODM	<i>Oligonucleotide directed mutagenesis</i>
OECD	Ekonomiskās sadarbības un attīstības organizācija
PKR	Polimerāzes ķēdes reakcija
PVD	Pārtikas un veterinārais dienests
RASFF	<i>Rapid Alert System for Food and Feed</i>
RdDM	RNS atkarīgā DNS metilācija
RE-PCR	<i>Restriction enzyme digestion suppressed PCR</i>
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
RL-PKR	Reālā laika polimerāze ķēdes reakcija
RNAi	RNS interference
RVD	<i>Repeat-variable di-residue</i>
SAM HLG	<i>Scientific Advice Mechanism High-Level Group</i>
SCCS	<i>Scientific Committee on Consumer Safety</i>
SCENIHR	<i>Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks</i>
SCHER	<i>Scientific Committee on Health and Environmental Risks, SCHER</i>
SDN	<i>Site-directed nuclease</i>
SNV	<i>Single nucleotide variation</i>
SSCP	<i>Single-stranded conformation polymorphism</i>
SynBio	Sintētiskā bioloģija/ <i>Synthetic biology</i>
TALE	<i>Transcription activator-like effector</i>
TALENs	<i>Transcription activator- like effector nucleases</i>
USDA APHIS	<i>United States Department of Agriculture Animal and Plant Health Inspection Service</i>
VAAD	Valsts Augu aizsardzības dienests
VInv	Vakuolārā invertāze
WHO	<i>World Health Organization</i>
ZFNs	<i>Zinc finger nucleases</i>
ZM	Zemkopības ministrija

KOPSAVILKUMS

PĀRSKATS PAR LATVIJAS REPUBLIKAS ZEMKOPIBAS MINISTRIJAS LAUKU ATBALSTA DIENESTA ZINĀTNISKĀ PROJEKTA „AR JAUNĀM ĢENĒTISKO MODIFIKĀCIJU METODĒM IEGŪTU PĀRTIKAS, DZĪVNIĒKU BARĪBAS UN TO PIEDEVU NOTEIKŠANA UN ŠĀDU PRODUKTU ZINĀTNISKĀ RISKĀ NOVĒRTĒJUMS” NORISI 2021. GADĀ

Projekta otrajā realizācijas gadā tika veikta literatūras analīze par ģenētiski modificētu mikroorganismu (ĢMM) izmantošanu pārtikas un dzīvnieku barības, kā arī uztura bagātinātāju ieguvē. Uzmanība pievērsta arī tādiem ĢMM, kas tiek veidoti izmantojot jaunākās ģenētisko modifikāciju metodes. Tika analizētas metodes, kuras varētu izmantot ĢMM detekcijā.

Tika turpināta literatūras analīze par genomiski rediģētiem kultūraugiem un citiem organismiem, par pamatu ņemot Eiropas Savienības Komisijas veikto pētījumu un citus ar to saistītos pētījumus. Tika veikts ar jauniem genomikas paņēmieniem iegūtu augu riska novērtējums un risku vadības rekomendāciju izstrāde.

Projekta ietvaros tika veikts ekspozīcijas novērtējums pārtikas, dzīvnieku barības, to piedevu un uztura bagātinātāju paraugiem, kas iegādāti mazumtirdzniecībā klātienē vai tiešsaistē. Viens paraugs tika saņemts no PVD Robežkontroles departamenta. Kopējais paraugu skaits – 91. Četrdesmit trīs paraugi tika iegādāti lielākajās Latvijas lielveikalu tirdzniecības ķēdēs un to interneta veikalos, 24 paraugi tika iegādāti interneta tirdzniecības vietās, četri paraugi tika nopirkti Indijas un Vjetnamas preču veikalos Rīgā, bet pārējie paraugi tika iegādāti dažādās tirdzniecības vietās gan klātienē, gan pasūtot šo kompāniju interneta vietnēs. Tikai viena produkta marķējumā bija norādīts, ka tas satur ģenētiski modificētas pārtikas izejvielas. Tā izcelsmes valsts bija ASV. Pārtikas un dzīvnieku barības paraugu izvēles kritēriji bija izcelsmes valsts ārpus ES (primāri, bet ne izslēdzošs kritērijs), jo ĢM kultūraugi pārsvarā tiek audzēti ārpus ES, kā arī tas, vai produkta sastāvā ir soja, kukurūza, rapsis, rīsi, kvieši, tomāti, cukurbietes un Atlantijas lasis. Kopumā tika analizēti 67 pārtikas un 10 barības paraugi, kā arī 10 pārtikas piedevas un uztura bagātinātāji un 4 enzīmu maisījumi un barības piedevas dzīvniekiem. Darbā tika izmantota gan reālā laika PQR, gan digitālā PQR metode. Augstāks pozitīvo paraugu īpatsvars tika konstatēts paraugiem ar izcelsmi ārpus ES (13,73 %) salīdzinājumā ar paraugiem, kuru izcelsme bija ES (7,5 %), bet atšķirības nebija statistiski būtiskas. Salīdzinot pārtikas paraugus ar dzīvnieku barības paraugiem, redzams, ka pozitīvi bija 10,45 % pārtikas paraugu un 30,00 % dzīvnieku barības paraugu. Dzīvnieku barības gadījumā tas atbilst līdzšinējām tendencēm pēdējos gados, bet pārtikas gadījumā tik daudz pozitīvu paraugu pēdējos gados nav bijis. Nevienā no 18 paraugiem, kuru sastāvā bija norādīts lasis, netika konstatēts ĢM lasis. No 10 pozitīvajiem paraugiem četri pārtikas paraugi bija iegādāti mazumtirdzniecībā klātienē, bet seši pārtikas un barības paraugi bija iegādāti tiešsaistes tirdzniecības vietās, kas norāda uz to, ka ĢMO uzraudzības programmā būtu jāiekļauj tiešsaistes tirdzniecības uzņēmumi. No 14 pārtikas un barības piedevu un uztura bagātinātāju paraugiem divi paraugi ir uzskatāmi par aizdomīgiem, t.i., tādiem, kuros ir konstatēta ĢMM marķierģēnu klātbūtne, izolētas dzīvotspējīgas *Bacillus* kultūras, kā arī izolētajām kultūrām konstatēti marķierģēni. Viens no šiem paraugiem ir holīna hlorīds ar 60 % kukurūzas, bet otrs – L-arginīns kapsulās.

Lai praktiski izmēģinātu genoma modifikāciju noteikšanu ar NGS, šī projekta ietvaros tika veikts eksperiments ar modeļorganismiem, kura mērķis bija raksturot ar ātro neitronu apstarošanu iegūtas nezināmas delēcijas miežu *nec1* gēnā. Tika konstatēts, ka delēciju raksturošanu apgrūtina atkārtotumu sekvences (potenciāli transpozoni vai retrotranspozoni), kas traucē iegūt amplifikācijas produktus PCR reakcijās ar praimeriem, kas izveidoti atbilstoši pētāmajam genoma reģionam.

ZM LAD projektā 2021. gadā paveiktā darba apraksts

PROJEKTA MĒRĶIS UN UZDEVUMI

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

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

Projekta realizācijai izvirzītie darba uzdevumi:

Uzdevumi 2020. gadam:

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

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

Uzdevumi 2021. gadam:

3. Veikt ekspozīcijas novērtējumu atbilstoši aktuālajai situācijai - eksperimentālu situācijas novērtēšanu, pārtikas un dzīvnieku barības un to piedevu paraugiem, kas iegūti mazumtirdzniecībā un no dzīvnieku barības ražotājiem, nosakot kvalitatīvu un kvantitatīvu ĢMO klātbūtni. Genomiski rediģētie organismi tiks analizēti pēc literatūras datiem, bet ekspozīcija tiks noteikta tradicionālajiem ĢMO un no ģenētiski modificētiem mikroorganismiem (ĢMM) iegūtas barības un pārtikas piedevām. Tie varētu būt tādu augu pārstrādes produkti, kas teorētiski var saturēt kādus ģenētiskos elementus, kas sastopami gan ES autorizētos, gan neautorizētos organismos (piemēram, *vip3A* gēns vai rīsu pārstrādes produkti no trešajām valstīm), kā arī rekombinantas DNS atliekas no ĢMM iegūtas barības un pārtikas piedevās.

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

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

1.tabula

Plānotais projekta realizācijas grafiks

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

2.tabula

Projekta darba grupa un tās dalībnieku darba uzdevumi 2021. gadā

Vārds, uzvārds	Amats, zinātniskais grāds	Darba slodze (procentos) un konkrētie pienākumi
Lelde Grantiņa – Ieviņa	Projekta vadītāja, vadošā pētniece, Dr. biol.	40%; Zinātniskā projekta vispārējā vadība, darba mērķu un uzdevumu noteikšana un korekcija atbilstoši projekta realizācijas gaitai, sanāksmju un semināru organizēšana, zinātniskās literatūras analīze, eksperimentālā darba plānošana un realizācijas kontrole, zinātnisko pārskatu sagatavošana atbilstoši projekta mērķim un uzdevumiem, zinātnisko un populārzinātnisko publikāciju sagatavošana.
Nils Rostoks	Projekta eksperts, vadošais pētnieks, Dr. biol.	25%; dalība projekta sanāksmēs un semināros, darba mērķu un uzdevumu noteikšana un korekcija atbilstoši projekta realizācijas gaitai, zinātniskās literatūras analīze, eksperimentālā darba plānošana (sekvenču analīze), līdzdalība zinātnisko pārskatu sagatavošanā atbilstoši projekta mērķim un uzdevumiem, zinātnisko un populārzinātnisko publikāciju sagatavošana.
Juris Ķibilds	Projekta eksperts, pētnieks, LU un BIOR doktorantūras students	30%; dalība projekta sanāksmēs un semināros, darba mērķu un uzdevumu noteikšana un korekcija atbilstoši projekta realizācijas gaitai, zinātniskās literatūras analīze, eksperimentālā darba plānošana (paraugu sagatavošana sekvenēšanai, sekvenēšana, sekvenču analīze), līdzdalība zinātnisko pārskatu sagatavošanā atbilstoši projekta mērķim un uzdevumiem, zinātnisko publikāciju sagatavošana.

Vārds, uzvārds	Amats, zinātniskais grāds	Darba slodze (procentos) un konkrētie pienākumi
Aija Jēriņa	Projekta eksperte, vadošā pētniece	30%; dalība projekta sanāksmēs un semināros, darba mērķu un uzdevumu noteikšana un korekcija atbilstoši projekta realizācijas gaitai, zinātniskās literatūras analīze, eksperimentālā darba plānošana (paraugu sagatavošana sekvenčēšanai, sekvenēšana, sekvenču analīze), līdzdalība zinātnisko pārskatu sagatavošanā atbilstoši projekta mērķim un uzdevumiem, zinātnisko un populārzinātnisko publikāciju sagatavošana.
Elizabete Miltiņa	Maģistrantūras students, BIOR vecākā speciāliste	30%; dalība projekta sanāksmēs un semināros, zinātniskās literatūras analīze, eksperimentālā darba plānošana (paraugu sagatavošana digitālajai PCR vai sekvenčēšanai, reakciju veikšana), līdzdalība zinātnisko pārskatu sagatavošanā atbilstoši projekta mērķim un uzdevumiem, dalība zinātnisko un populārzinātnisko publikāciju sagatavošanā.
Guntis Boikmanis	LU un BIOR doktorantūras students	50%; dalība projekta sanāksmēs un semināros, zinātniskās literatūras analīze, eksperimentālā darba plānošana (paraugu sagatavošana PCR vai sekvenčēšanai, reakciju veikšana), līdzdalība zinātnisko pārskatu sagatavošanā atbilstoši projekta mērķim un uzdevumiem, dalība zinātnisko un populārzinātnisko publikāciju sagatavošanā.

Projekta aktivitātes 2021. gadā

1. Projekta darba gaitas izvērtēšanas un koordinēšanas sanāksmes attālināti 25. februārī (1. pielikums) un 18. jūnijā (2. pielikums) visai projekta komandai, atsevišķas sanāksmes klātienē projekta BIOR ekspertiem, kā arī projekta darba koordinēšana elektroniskajā vidē.
2. Literatūras analīze par ģenētiski modificētiem mikroorganismiem, kas tiek izmantoti pārtikas un dzīvnieku barības piedevu (enzīmu, vitamīnu u.c.) ieguvē, kā arī par genomiski rediģētiem kultūraugiem un sintētiskās bioloģijas organismiem.
3. Darbs ar modeļorganismiem (miežiem ar delēcijām).
4. Pārtikas, dzīvnieku barības un to piedevu paraugu ekspozīcijas novērtējums, izmantojot mūsdienīgu zinātniski analītisko metožu pielietojumu. Rezultātus plānots prezentēt Latvijas Universitātes 80. Starptautiskajā zinātniskajā konferencē 2022. gada sākumā.
5. E. Miltiņas maģistra darba "Uz čipu balstītās multiplex digitālās PĶR kvantifikācijas metodes novērtējums un verifikācija ĢMO testēšanas jomā" izstrāde.
6. Populārzinātniska raksta sagatavošana publicēšanai žurnāla "Saimnieks" decembra izdevumā (3. pielikums).
7. Seminārs LU Doktorantūras skolas "Augu un augsnes bioloģisko resursu izpēte ilgtspējīgai izmantošanai" studentiem (4. pielikums), kā arī lekcijas par ĢMO: 23.04.2021. Latvijas Lauksaimniecības universitātes Pārtikas tehnoloģiju fakultātes 1.kursa maģistrantūras

studentiem kursā "Pārtikas zinības", L. Grantiņa-leviņa "ĢMO riska vērtēšana un piemaisījumu noteikšana pārtikā, barībā un sēklās – no paraugu ieguves līdz testēšanas rezultātam"; 26.10.2021. Rīgas Tehniskās universitātes Biotehnoloģiju studiju programmas studentiem, L. Grantiņa-leviņa. "Molekulāro metožu izmantošana ĢMO piemaisījumu noteikšanā pārtikā, barībā un sēklās. Pieredze darbā ar digitālo PQR ĢMO jomā".

8. Genomiski rediģētu organismu risku vadības rekomendāciju izstrāde.
9. Projekta ekspertu dalība dažādos attālinātos pasākumos par ĢMO kvalifikācijas celšanai un pieredzes iegūšanai:
 - 1) A. Jēriņas, L. Grantiņas-leviņas, E. Miltiņas dalība Eiropas Parlamenta organizētā vebinārā "Genome editing and the Farm to Fork strategy", 26.01.2021., <https://together.europarl.europa.eu/lv/event/genome-editing-and-the-farm-to-fork-strategy-2021-01-26-59/register>;
 - 2) L. Grantiņas-leviņas dalība vebinārā "UKPlantSciPresents Webinar with Göetz Hensel", kas tika organizēts sadarbībā ar COST akciju PlantEd, tēma "CRISPR/Cas-mediated mutagenesis of plant traits", 23.02.2021.;
 - 3) L. Grantiņas-leviņas dalība COST akcijas PlantEd organizētā vebinārā "From research to innovation with new breeding techniques", 13.04.2021., https://www.youtube.com/watch?v=nT_yVN--jts;
 - 4) L. Grantiņas-leviņas dalība Joint Working Group of the Standing Committee on Plants, Animals, Food and Feed, Section Genetically Modified Food and Feed and Environmental Risk, Regulatory Committee under Directive 2001/18/EC and Regulatory Committee under Directive 2009/41/EC on new genomic techniques, Webex meeting, 07.05.2021;
 - 5) L. Grantiņas-leviņas dalība "Annual meeting of the European Enforcement Project on the Contained Use and Deliberate Release of Genetically Modified Organisms", 27.05.2021.
 - 6) L. Grantiņas-leviņas dalība FAS/USDA London organizētā vebinārā "Webex event: Genome Editing", tēmas "Gene Editing: What Could Commercial or Consumer Benefits Look Like?" un "Gene Editing: What Does Proportionate Regulation Look Like?", 08.-09.09.2021.;
 - 7) N. Rostoka, L. Grantiņas-leviņas dalība 2nd PlantEd conference - "Plant genome editing – the wide range of applications", 20.-22.09.2021., <https://www.cost.eu/cost-events/plant-genome-editing-the-wide-range-of-applications/>;
 - 8) E. Miltiņas un L. Grantiņas-leviņas dalība EPNI organizētā vasaras skolā "Parma Summer School 2021 – Food Safety Aspect of Integrated Food Systems", kur viena no tēmām bija par sintētisko bioloģiju, 20.-30.09.2021., <https://events.efsa.europa.eu/summerschool2021/sc-programme>;
 - 9) L. Grantiņas-leviņas dalība Konvencijas par bioloģisko daudzveidību sekretariāta organizētā vebinārā "Synthetic Biology Governance and Cooperation Opportunities", 02.11.2021., <https://bch.cbd.int/synbio/webinar.shtml>.

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

1.1. Ģenētiski modificētu mikroorganismu izmantošana pārtikas un dzīvnieku barības piedevu un uztura bagātinātāju ieguvē un to detekcijas metodes

1.1.1. Ievads

Eiropas Savienībā DNS klātbūtne pārtikā un dzīvnieku barībā, kas saistīta ar ģenētiski modificētu (ĢM) mikroorganismiem, piemēram, transgēnu fragmenti, ir pakļauta ES tiesību aktiem par ĢM pārtiku un barību. Nav nozīmes tam, vai produkts joprojām satur dzīvotspējīgas neskartas ĢM mikroorganisma šūnas vai tās ir mirušas vai fragmentētas. Tas nozīmē, ka produktu, kas satur ar ģenētiski modificētiem mikroorganismiem saistītu DNS, nevar pārdot ES bez tirdzniecības atļaujas saskaņā ar ĢM pārtikas un barības regulu (EK) Nr. 1829/2003. Lai saņemtu šādu atļauju, tam ir jāveic regulējoša apstiprināšanas procedūra, saskaņā ar kuru jāveic pirmspārdošanas drošības novērtējums un ĢM notikumam raksturīgas noteikšanas metodes validācija. Uz ĢM organismiem ES, attiecas vairāki tiesību akti, kas attiecas uz dažādām kategorijām un lietojumiem, piemēram, tiesību akti par ģenētiski modificētu organismu (ĢMO) ieviešanu vidē (Direktīva 2001/18/EK), kā arī Regula (EK) 1829/2003 par ģenētiski modificētu pārtiku un barību. Direktīva 2001/18/EK sniedz definīciju tam, ko saprot kā ĢMO, kas tiek skaidrots kā organisms, kurā ģenētiskais materiāls ir mainīts nedabiskā veidā, piemēram, nevis pārošanās vai dabiskas rekombinācijas ceļā. Ir aprakstīti ģenētiskās modifikācijas metožu piemēri, piemēram, rekombinantās DNS metodes jaunu ģenētiskā materiāla kombināciju ieviešanai, kas sagatavotas ārpus saimniekorganisma, kurā tās ir integrētas. Daži ĢMO ir izslēgti no šīs direktīvas darbības jomas, piemēram, tie, kas radīti ar mutāģenēzi (piemēram, izmantojot ķīmisku mutāģenēzi vai jonizējošo starojumu). Regula (EK) 1829/2003 attiecas ne tikai uz ĢMO, ko paredzēts izmantot kā pārtiku vai barību, bet arī uz pārtiku vai barību, kas sastāv no ĢMO vai satur to, kā arī uz tādiem produktiem, kas ražoti no ĢMO. Būtiska produktu kategorija, kas nav minēta šajā regulā, ir produkti, kas ražoti, izmantojot ĢMM. Jau 2004. gadā Pastāvīgās komitejas sanāksmes laikā tika noskaidrots, ka tas attiecas uz pārtikas un barības sastāvdaļām, piemēram, piedevām, aromatizētājiem un vitamīniem, kas iegūti, fermentējot, izmantojot ĢMM ierobežotos apstākļos, bet kas nav galaproduktā. Tos dēvē arī par "*processing aids*". Tomēr, ja ĢMM joprojām ir konstatējams galaproduktā, uz to attiecas Regula (EK) Nr. 1829/2003¹. Šo interpretāciju Eiropas Komisija apstiprināja Pastāvīgās komitejas sanāksmē 2019. gadā. Komisijas paziņojumā tika paskaidrots, ka Regulas (EK) Nr. 1829/2003 nosacījumi attiecas uz visiem scenārijiem, kuros ĢMM ir atrodams gala fermentācijas produktā, neatkarīgi no tā, vai tas joprojām ir dzīvs vai nedzīvs, vai pilnīgi vai daļēji. Šis paziņojums tika sniegts, atbildot uz jautājumu par noteikšanas metožu jutīgumu, lai pierādītu ĢMM ražošanas celmu klātbūtni barības piedevās. Līdz ar to,

¹ European Commission (2004) Standing Committee on the Food Chain and Animal Health, Section on Genetically Modified Food and Feed and Environmental Risk, Summary Record Of The 3rd Meeting – 24 September 2004. European Commission, Brussels, Belgium.
https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/sc_modif-genet_summary03_en.pdf

ja barības produktā tiek konstatēta ar ĢMM saistīta DNS, tas ir jāuzskata par ĢMM “klātbūtni”, un uz šo produktu attiecas Regula (EK) Nr. 1829/2003².

Eiropas Savienībā dažādu pārtikas un barības piedevu, aromatizētāju un fermentu izvērtēšanu, apstiprināšanu un izplatīšanu regulē vairākas regulas:

Regula (EK) Nr. 1331/2008, ar ko nosaka vienotu atļauju piešķiršanas procedūru attiecībā uz pārtikas piedevām, fermentiem un aromatizētājiem;

Regula (EK) 429/2008, ar ko paredz sīki izstrādātus noteikumus, lai piemērotu Eiropas Parlamenta un Padomes Regulu (EK) Nr. 1831/2003 attiecībā uz pieteikumu sagatavošanu un noformēšanu un barības piedevu novērtēšanu un apstiprināšanu;

Regula (EK) Nr. 1831/2003 par dzīvnieku ēdināšanā lietotām piedevām;

Regula (EK) Nr. 1332/2008 par pārtikas fermentiem un par grozījumiem Padomes Direktīvā 83/417/EEK, Padomes Regulā (EK) Nr. 1493/1999, Direktīvā 2000/13/EK, Padomes Direktīvā 2001/112/EK un Regulā (EK) Nr. 258/97;

Regula (EK) Nr. 1333/2008 par pārtikas piedevām;

Regula (EK) Nr. 1334/2008 par aromatizētājiem un dažām pārtikas sastāvdaļām ar aromatizētāju īpašībām izmantošanai pārtikā un uz tās un par grozījumiem Padomes Regulā (EEK) Nr. 1601/91, Regulās (EK) Nr. 2232/96 un (EK) Nr. 110/2008 un Direktīvā 2000/13/EK.

Saskaņā ar Eiropas Parlamenta un Padomes regulā par pārtikas piedevām (EK) Nr. 1332/2008 sniegto definīciju pārtikas ferments jeb enzīms ir produkts, kas spēj katalizēt kādu konkrētu bioķīmisku reakciju un ko tehnoloģisku apsvērumu dēļ pievieno pārtikai tās ražošanas, pārstrādes, sagatavošanas, apstrādes, iepakojšanas, pārvadāšanas vai glabāšanas posmā. Tirgū fermenti bieži sastopami pārtikas fermentu preparātos – produktos, kas sastāv no viena vai vairākiem pārtikas fermentiem, ar papildus iekļautām pārtikas piedevām vai vēl citām sastāvdaļām, lai atvieglotu šo produktu glabāšanu, pārdošanu, standartizāciju, atšķaidīšanu vai šķīdināšanu. Fermenti var tikt iegūti no augiem, dzīvniekiem, mikroorganismiem vai to produktiem. Pārtikas un barības industrijā fermentu un citu pārtikas piedevu ražošanā aizvien plašāk tiek izmantoti tieši mikroorganismi, no kuriem liela daļa ir ģenētiski modificēti.

ES prasības paredz, ka pārtikas un barības piedevu gadījumā produktā nedrīkst atrasties ne producējošie mikroorganismi (dzīvi, vairoties spējīgi), ne to ģenētiskais materiāls (DNS fragmenti), kas īpaši jāņem vērā, ja izmantoti ģenētiski modificēti mikroorganismi (ĢMM), kuros kā selekcijas marķieri bieži tiek izmantoti antimikrobiālās rezistences gēni (AMR), kas horizontālās pārneses ceļā var nonākt citu vidē esošo mikroorganismu genomos (Fraiture et al., 2020a).

Pārtikas piedevu ieguvē izmantoto ģenētiski modificēto mikroorganismu spektrs ir diezgan plašs un ietver baktērijas, sēnes un mikroaļģes (3. tabula). Producenti ar augstu saražotā produkta titru 100 g/L un vairāk ir pieskaitāmi pie III līmeņa izstrādes stadijas, kas nozīmē to, ka šādiem producentiem ir pieejamas ražošanas metodes, kas nodrošina ekonomisku izdevīgumu, kā arī ir pieejamas metodes saražotās produkcijas attīrīšanai. Kā piemērus šeit var minēt L-glutamātu, riboflavīnu, L-askorbīnskābi, dzintarskābi un pienskābi. Pie II līmeņa izstrādes stadijas pieder tādi mikroorganismi, kuru saražotā produkta titrs ir 10-100 g/L. Tie ir tuvu ekonomiskajam izdevīgumam un tie drīz varētu tikt izmantoti industrijā. Pie šīs grupas pieder adipīnskābe un viena gredzena aromātiskie savienojumi. Pie I līmeņa

² European Commission (2019) Standing Committee on Plants, Animals, Food and Feed Section Genetically Modified Food and Feed, 30 April 2019: Summary Report [sante.ddg2.g.5(2019)3732288]. European Commission, Brussels, Belgium. Retrieved from https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/sc_modif-genet_20190430_sum.pdf

izstrādes stadijas pieder tādi producenti, kuru veidotais produkts ir ar koncentrāciju, kas mērāma miligramos uz litru (Kallscheuer, 2018). Eiropas Komisijai izvērtēšanai ir iesniegti 303 pārtikas enzīmu pieteikumi, kur kā producenti ir norādīti ĢMM (87 % pieteikumi), bet arī dzīvnieki vai augi (13 %). Desmit biežāk pieteiktie enzīmi ir α -amilāze, triacilglicerola lipāze, ksilanāze, β -galaktozidāze (laktāze), glikoamilāze, proteāze, endo-1,3(4)- β -glikanāze, celulāze, ciklomaltodekstrīna glikanotransferāze un poligalakturonāze (Deckers et al., 2020a).

Pēdējos gados biotehnoloģijas pētnieki ir sākuši izmantot dažādas *Streptomyces* ģints sugas proteīnu heterologai ekspresijai. Tradicionāli *E. coli* bija primārā izvēle eikariotu ģēnu ekspresijai, jo tā bija labi pazīstama un ar to bija viegli strādāt. Tomēr eikariotu proteīnu ekspresija *E. coli* var būt problemātiska. Piemēram, dažreiz olbaltumvielas nav pareizi salocītas, kas var izraisīt šķīdības problēmu, proteīnu depoziāciju ieslēgumos un produkta bioaktivitātes zudumu. Grampozitīvas baktērijas, piemēram, *Streptomyces* sugas, sekrēcija var notikt tieši ārpusšūnu vidē. Šīs sekrēcijas sistēmas īpašības ir priekšrocība heterologi ekspresētu proteīnu rūpnieciskai ražošanai, jo tā vienkāršo turpmākās attīrīšanas darbības un var palielināt saražotā produkta daudzumu. Tas padara *Streptomyces* spp. par pievilcīgu alternatīvu citām baktērijām, piemēram, *E. coli* un *B. subtilis*. Visplašākās iestrādes ir antibiotisko savienojumu ieguvē (Nah et al., 2017; Kallscheuer, 2018; Ahmed et al., 2020), pigmentu (pārtikas krāsvielu) ieguvē (Aman Mohammadi et al., 2021), kā arī vanilīna un taumatīna ieguvē (Sun et al., 2021).

3.tabula

Eiropas Savienībā apstiprinātu pārtikas piedevu ieguve, izmantojot ģenētiski modificētus mikroorganismus (pēc Kallscheuer, 2018; Fatma et al., 2020)

E-viela	Savienojums	Producents	Oglekļa avots vai prekursors	Produkta titrs, g/L
KARBONSKĀBES UN ĪSĀS KĒDES SPIRTI				
E270	Pienskābe	<i>Bacillus</i> sp.	Glikoze	225
		<i>Issatchenkia orientalis</i> (<i>Pichia kudriavzevii</i>)	Rauga ekstrakta, peptona, glikozes barotne	135
		<i>Pichia pastoris</i>	Metanols	3,48
		<i>Pichia stipitis</i>	Ksiloze	58
E296	Ābolskābe	<i>Aspergillus oryzae</i>	Glikoze	154
E297	Fumārskābe	<i>Rhizopus oryzae</i>	Glikoze	85
		<i>Pichia stipitis</i>	Ksiloze	4,67
E330	Citronskābe	<i>Aspergillus niger</i>	Glikoze	157
E334	Vīnskābe	<i>Gluconobacter oxydans</i>	Sorbīts	2,1
E355	Adipīnskābe	<i>Escherichia coli</i>	Glicerīns	2,5
E363	Dzintarskābe	<i>Escherichia coli</i>	Glicerīns	96
		<i>Issatchenkia orientalis</i> (<i>Pichia kudriavzevii</i>)	Glikoze	11,63
		<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942*	BG-11 barotne	0,58-0,63
E422	Glicerīns	<i>Candida glycerinogenes</i>	Glikoze	130
E1520	1,2-propāndiols	<i>Clostridium thermosaccharolyticum</i>	Glikoze	1,9
AMINOSKĀBES				
E620	L-glutamīnskābe	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Glikoze	100

E-viela	Savienojums	Producents	Oglekļa avots vai prekursors	Produkta titrs, g/L
E920	L-cisteīns	<i>Escherichia coli</i>	Glikoze	1,7
TERPENOĪDI				
E160a	β-karotīns	<i>Escherichia coli</i>	Glicerīns	0,47
E160d	Likopēns	<i>Escherichia coli</i>	Glicerīns	1,4
W161b	Luteīns	<i>Muriellopsis sp.</i>	CO ₂	0,035
E161g	Kantaksantīns	<i>Dietzia natronolimnaea</i>	Glikoze	0,008
E307	α-tokoferols	<i>Euglena gracilis</i>	Tirozīns	0,14
VIENA GREDZENA AROMĀTISKIE SAVIENOJUMI UN POLIFENOLI				
E100	Kurkumīns	<i>Escherichia coli</i>	Ferulīnskābe	0,06
E162	Betanīns	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Dekstroze	0,017
E163	Kalistefīns (antocianīns)	<i>Escherichia coli</i>	Glikoze	0,01
E214	4-hidroksibenzoskābe	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Glikoze	36,6
E310	Gallskābe	<i>Escherichia coli</i>	Glikoze	20
E1519	Benzilspirts	<i>Escherichia coli</i>	Glikoze	0,14
NO CUKURIEM IEGŪTI SAVIENOJUMI				
E300	2-keto-L-gulonskābe (askorbīnskābes prekursors)	<i>Gluconobacter oxydans</i>	Sorbīts	130
E420	Sorbīts	<i>Zymomonas mobilis</i>	Glikoze, fruktoze	233
E421	Mannitols	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Fruktoze	87
E574	Glikonskābe	<i>Aspergillus niger</i>	Glikoze	311
E967	Ksilīts	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Ksiloze	312
E968	Eritrols	<i>Pseudozyma tsukubaensis</i>	Glikoze	243
NO NUKLEOTĪDIEM IEGŪTI SAVIENOJUMI				
E101	Riboflavīns (vitamīns B2)	<i>Bacillus subtilis</i>	Glikoze	4,9
E630	Inozīnskābe	<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>	Glikoze	7,5
OLIGOPEPTĪDI UN PROTEĪNI				
E234	Nizīns	<i>Lactococcus lactis</i>	Glikoze	11,1
E957	Taumatīns	<i>Aspergillus awamori</i>	Glikoze	0,013
E1105	Lizozīms	<i>Aspergillus niger</i>	Glikoze	0,21
ANTIBIOTIKAS				
E235	Natamicīns	<i>Streptomyces natalensis</i>	Dažādi	14,4

*-modificēts ar JGP.

Atbilstoši Ministru kabineta noteikumu Nr. 685 "Prasības uztura bagātinātājiem" 6. punktā noteiktajam "uztura bagātinātāji ir pārtikas produkti parastā uztura papildināšanai koncentrētu uzturvielu (vitamīnu un minerālvielu) veidā vai citas vielas, kurām ir uzturvērtība vai fizioloģiska ietekme, atsevišķi vai kombinācijās".

Sportistu lietotajos uztura bagātinātājos bieži tiek izmantotas tādas aminoskābes kā L-arginīns un L-lizīns. Zinātniskajā literatūrā ir daudz publikāciju par to, ka šo aminoskābju ieguvei ir izveidotas ģenētiski modificētas baktērijas kā producenti. L-arginīna producenti var

būt tādas baktērijas kā *Corynebacterium glutamicum* (Park et al., 2014), *Escherichia coli* (Ginésy et al., 2017), *Bacillus* spp., *Serratia* spp. (Utagawa, 2004) u.c. L-lizīna producenti var būt tādas baktērijas kā *C. glutamicum* (Vassilev et al., 2018), *E. coli* (Ma et al., 2015) u.c. Šīs pašas baktēriju sugas, pateicoties ģenētiskām modifikācijām, tiek izmantotas arī L-leicīna biosintēzē (Wang et al., 2019, Wang et al., 2020). *E. coli* un *Proteus* sp. tiek izmantotas L-karnitīna biosintēzei (Bernal et al., 2007).

Tālākajās apakšnodaļās ir dota informācija no zinātniskās literatūras par šādu producentu ģenētiskā materiāla klātbūtnes noteikšanu. Savukārt nodaļā 1.2.1. "Eiropas Savienības Komisijas pētījums un saistītie pētījumi" ir dota pašlaik pieejamā informācija par mikroorganismiem, kuri iegūti izmantojot jauno genomisko paņēmieni (JGP) metodes.

1.1.2. Pārtikas fermentus producējošo baktēriju ģenētiskā materiāla klātbūtnes noteikšana pārtikas fermentu produktos (pēc Deckers et al., 2020)

Komerčiāli pieejama pārtikas enzīmu preparāta kvalitātes kontrole, tajā skaitā tīrības prasību izpilde, jānodrošina produkta ražotājam. Tomēr ne vienmēr ražotāja kvalitātes kontrole ir pilnīga, un pārtikas enzīmu produktos reizēm var konstatēt nevēlamus piemaisījumus, piemēram, ĢM B2 vitamīnu producējošā mikroorganisma *Bacillus subtilis* klātbūtni (Barbau-Piednoir et al., 2015a; Paracchini et al., 2017). Tāpēc nepieciešams attīstīt atbilstošas metodes, kas spētu šādu piemaisījumu klātbūtni detektēt. Pašreiz nekur pasaulē neeksistē vienota pieeja šādu piemaisījumu noteikšanai pārtikas enzīmu preparātos. Viena no piedāvātajām stratēģijām pārtikas enzīmu producējošo baktēriju detektēšanai un identificēšanai, balstās uz baktēriju 16S rRNS gēna reģiona sekvenču noteikšanu (Deckers et al., 2020), kas ir plaši izmantots marķiera gēns baktēriju filoģenētiskajā klasifikācijā (Srinivasan et al., 2015).

Tuvāk apskatītās metodes (Deckers et al., 2020) izstrādes procesā kā modeļorganismi tika izmantotas savvaļas tipa mikroorganismu kultūras, kas metodes izstrādes laikā atbilda Eiropas Pārtikas nekaitīguma ietsādes (EPNI) reģistrēto pārtikas enzīmu producentiem. No 304 EPNI iesniegtajiem pārtikas enzīmu dokumentācijām, 53%, 2% un 32% tiek ražoti izmantojot, attiecīgi, sēnes, raugus vai baktērijas (pārējie 13% tiek iegūti no augiem vai dzīvniekiem). No baktērijām visbiežākais pārtikas enzīmu producers ir *B. subtilis* (23,8%) un *Bacillus licheniformis* (21,6%). Apmēram puse (50,5%) no visām pārtikas enzīmus producējošām baktērijām ir ģenētiski modificētas. Kopumā sarakstā pārstāvēta 71 mikroorganismu suga – 30 baktērijas, 37 sēnes un 4 raugi. Metodes izstrādei bija pieejamas 66 mikroorganismu kultūras – 28 baktērijas, 34 sēnes un 4 raugi.

Metodes pirmajā solī tika noteikta potenciālās pārtikas enzīmu producējošās baktērijas klātbūtne, ar PCR amplificējot 16S rRNS gēna V3-V4 reģionu, izmantojot praimerus 335-F: 5'-TAATACGACTCACTATAGGCADACTCCTACGGGAGGC-3' un 796-R: 5'-TATTTAGGTGACACTATAATCCTGTTTGMTMCCCVCRC-3', kam sekvenēšanas nolūkiem pievienotas T7 un SP6 praimeru sekvenču (pasvītrots) (Dorn-In et al., 2015). Iegūtie PCR produkti tika sekvenēti ar enzimatisko didezoksi terminācijas jeb "Sangera" sekvenēšanas metodi. Iegūtās 16S rRNS sekvenču līdž gints un/vai sugas līmenim tika identificētas, tās salīdzinot ar datubāzēs pieejamajām sekvenču, izmantojot atbilstošos bioinformātikas rīkus. Metodes izstrādes procesā tika izveidota lokāla 16S rRNS gēnu datubāze. Baktēriju sugu gadījumā sekvenču tika iegūtas no NCBI 16S RefSeq Nucleotide sekvenču datubāzes (O'Leary et al., 2016), kas kopumā pārstāvēja 29 no 30 mērķa sugām ar 107 references sekvenču. Tā kā vienai baktēriju sugai *Pseudomonas amyloclavata* NCBI datubāzē 16S rRNS sekvenču

nebija pārstāvēta, tā tika iegūta no pētījumā iekļautās kultūras un pievienota lokālajai datubāzei.

PCR produkti tika iegūti no visām 28 analizētajām baktēriju sugām. Metode uzrādīja augstu specifiskumu, jo PCR produkti netika iegūti ne no vienas no analizētajām 34 sēņu un 4 raugu sugām, kā arī papildus pētījumā iekļautajiem sojas (*Glycine max*), sējas rīsa (*Oryza sativa*), kā arī cilvēka DNS paraugiem. Salīdzinot iegūtās sekvences ar datubāzē iekļautajām, visu sugu piederība tika noteikta pareizi ar sekvenču identitāti 92% līdz 100%. Tomēr trīs sugu gadījumā (*Streptomyces rubiginosus*, *B. subtilis* un *B. licheniformis*) iegūtā sekvence uzrādīja procentuāli identisku līdzību gan ar sagaidāmo sugu, gan vēl citu sugu no tās pašas ģints. Tā kā ir ģintis, piemēram, *Bacillus*, kurā esošās sugas uzrāda augstu 16S rRNS sekvenču līdzību, šādos gadījumos būtu nepieciešams veikt papildus PCR reakcijas precīzai sugas identifikācijai. Tāpat jāņem vērā izmantotās references sekvenču datubāzes īpatnības, kas arī var ietekmēt sugu identifikācijas precizitāti.

Metodes izstrādes procesā papildus veiktā sekvenču filoģenētiskā analīze apstiprināja, ka visos gadījumos baktēriju piederību ir iespējams noteikt līdz ģints un vairumā (82,2%) gadījumu līdz sugas līmenim (1. attēls). Sugu precīzi nebija iespējams noteikt baktērijām *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *S. rubiginosus*, *Streptomyces violaceoruber* un *Streptomyces mobaraensis*. Kopumā iegūtie rezultāti atbilst vispārējām aplēsēm par baktēriju identifikāciju, balstoties uz 16S rRNS, kas sasniedz >90% līdz ģints un 65% - 83% līdz sugas līmenim (Janda & Abbott, 2007). Tomēr, jāņem vērā, ka tieši *B. subtilis* un *B. licheniformis*, kuru gadījumā sugu nebija iespējams viennozīmīgi precīzi identificēt, kopumā atbild par 45,4% no baktēriju producētajiem pārtikas enzīmiem. Visticamāk šo sugu gadījumā nepieciešams attīstīt metodi, kas balstīta uz reālā laika PCR (rIPQR), kas ir jutīgāka par konvencionālo PCR.



1. attēls. 16S rRNS gēna filoģenētiskā analīze. Visas pētījumā pārstāvētās baktēriju ģintis (centrā) un sugas (perifērijā) sagrupētas balstoties uz 16S rRNS sekvenčām (pēc Deckers et al., 2020).

Metodes jutība tika pārbaudīta, izmantojot komerciāli pieejamu *B. licheniformis* producētas α -amilāzes šķīdumu, kas tika mākslīgi kontaminēts ar savvaļas tipa *B. licheniformis* suspensiju dažādās koncentrācijās ($9,2 \times 10^5$ līdz $9,2 \times 10^{-3}$ CFU). Izmantojot iepriekš aprakstīto PCR metodi, sagaidāmā garuma amplikoni tika iegūti atšķaidījumos līdz $4,6 \times 10^2$ CFU, un sekvenēšanas rezultāti apstiprināja to piederību sugai *B. licheniformis*.

Metodes praktiskais pielietojums tika izvērtēts, izmantojot komerciāli pieejamus pārtikas enzīmu preparātus, kas iegūti no baktērijām (α -amilāze no *B. licheniformis* un proteāze no *B. subtilis*), sēnēm (laktāze no *Aspergillus oryzae* un renīns (*rennet*) no *Rhizomucor miehei*) vai augiem (papaīns no papaijas), kā arī viens preparāts, kura izcelsmes avots nav precīzi zināms (fermentus saturošs miltu apstrādes līdzeklis). Ar iepriekš aprakstītajiem uz 16S rRNS V3-V4 reģionu mērķētajiem praimeriem sagaidāmā garuma PCR produkts tika iegūts no diviem preparātiem, ko producējuši *B. licheniformis* un *B. subtilis*, kas norāda uz baktēriju DNS klātbūtni šajos produktos. Iegūto PCR produktu sekvenču analīze uzrādīja 100% sekvenču līdzību ar *B. licheniformis* α -amilāzes preparātā un *Bacillus amyloliquefaciens* (100% līdzība) vai *B. subtilis* (99,28% līdzība) proteāzes preparātā, kas norāda uz metodes neviennozīmīgajiem rezultātiem, identificējot *B. subtilis*. Līdztekus molekulārajām analīzēm, ar klasiskās mikrobioloģijas metodēm tika pārbaudīta identificēto baktēriju dzīvotspēja, un abos gadījumos tika iegūti baktēriju izolāti, kuru ģenētiskā analīze piederību jau iepriekš identificētajām baktēriju sugām.

Secinājumi

Metode apstiprina, ka pārtikas enzīmu preparātos var būt gan attiecīgos enzīmus producējošie mikroorganismi, gan nevar izslēgt nejaušu piesārņojumu ar vēl citiem mikroorganismiem, kas var būt radies tālākajā preparātu sagatavošanas procesā. Precīzai piesārņojuma izcelsmes noteikšanai, nepieciešams veikt papildus analīzes. Izstrādātā metode visos gadījumos ļauj identificēt metodes ietvaros aplūkotās baktērijas līdz ģints un vairumā gadījumu līdz sugas līmenim. Līdz ar to šī metode ir piemērota pirmā līmeņa skrīningam, lai noteiktu samērā augsta līmeņa (460 KVV/reakcijā) pārtikas enzīmus producējošo baktēriju piemaisījumu. Izstrādātā metode būtu piemērojama arī cita veida pārtikas piedevu testēšanai. Zemāka piesārņojuma līmeņa detektēšanai būtu nepieciešams izstrādāt ģints/sugas specifiskas rLPK balstītas metodes.

1.1.3. Ģenētiski modificēta *B. subtilis* celma noteikšana B2 vitamīnu saturošās barības piedevās (pēc Paracchini et al., 2017 un Fraiture et al., 2021)

B2 vitamīns jeb riboflavīns ir dzīvības funkcijām būtisks mikroelements, kas augstāko dzīvnieku organismā neveidojas, tāpēc tas ir jāuzņem ar uzturu vai barību. B2 vitamīnu dabiski producē daudzi mikroorganismi un augi. Mūsdienās komerciālā B2 vitamīna ražošana notiek fermentācijas procesā, izmantojot GMM, visbiežāk *B. subtilis* vai *Escherichia coli*, kā arī *Ashbya gossypii* un *Candida famata* (Abbas & Sibirny, 2011).

B. subtilis ir dabā bieži sastopama, nepatogēna, aeroba endosporas veidojoša baktērija. B2 vitamīna producēšanai bieži tiek izmantoti nesporeljoši *B. subtilis* celma 168 atvasinājumi, kuri var saturēt gan dabiskas mutācijas, kas veicina B2 vitamīna sintēzi, gan papildus ieviestas ģenētiskās modifikācijas. Mākslīgi ieviestās *B. subtilis* genoma modifikācijas ietver vairākas kopijas B2 vitamīna sintēzes rib jeb ribDEAHT operona ar gēniem *ribD*, *ribE*, *ribA*, *ribH* un *ribT*; kā arī selekcijas marķierus – AMR gēnus (piemēram, *cat*, *tet*, *ermAM*). Šādi

modificēta *B. subtilis* celma B2 vitamīna sintēzes gēnu ekspresija ir ievērojami paaugstināta (Perkins et al., 1999).

Saskaņā ar ES noteikumiem, pārtikas vai barības piedevās, kas ražotas, izmantojot ĢMM, nedrīkst atrasties ne producējošie mikroorganismi, ne to ģenētiskais materiāls. 2014. gadā ES tika konstatēts nevēlams ĢM baktērijas *B. subtilis* piemaisījums B2 vitamīnu saturošā barības piedevā, kas importēta no Ķīnas (Barbau-Piednoir et al., 2015a). Vācijas laboratorijas produktā konstatēja dzīvotspējīgas, ĢM *B. subtilis* sporas, par ko Eiropas Ātrā brīdināšanas sistēma pārtikai un barībai (RASFF) (angļu val. *Rapid alert system for food and feed*) izplatīja brīdinājumu RASFF2014.1249 pārējām Eiropas valstīm. Francijas Nacionālā references laboratorija ĢMO testēšanas jomā no trīs analoga Francijā importēta produkta paraugiem izolēja *B. subtilis* kultūru 2014-3557, kas tālāk tika raksturota, izmantojot pilna genoma sekvenēšanu. Iegūtās *B. subtilis* kultūras genomā tika identificēti 4233 gēni, no kuriem 97,9% (4144) funkcija bija zināma un tajā skaitā ietvēra B2 vitamīna sintēzē iesaistītus gēnus. Iegūtā genoma sekvence tika publicēta ar identifikācijas numuru JYFL000000000 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JYFL000000000> (Barbau-Piednoir et al., 2015a). Balstoties uz sekvenēšanas datiem, tika izveidota rIPKĒR metode VitB2-UGM neautorizētās *B. subtilis* kultūras detektēšanai, kas spēj detektēt mērķa DNS klātbūtni produktā arī bez mikroorganismu izolēšanas, un ir mērķēta uz sekvenču robežu starp B2 vitamīna gēnu un gēnu nesošā vektora sekveni (Barbau-Piednoir et al., 2015b).

Tālākajos pētījumos atrastā ĢM *B. subtilis* genoms tika raksturots precīzāk, nu kuriem divi apskatīti tuvāk. Pirmajā pētījumā atkārtoti veikta visa neautorizētā *B. subtilis* genoma sekvenēšana divos citos neatkarīgi iegūtos izolātos, kā arī noteiktas iespējamās plazmīdas (Paracchini et al., 2017). Otrajā pētījumā demonstrēta skrīninga metodes izstrāde ĢMM detektēšanai B2 vitamīna kā barības piedevas produktos, balstoties uz kontroles programmas ietvaros vairāku gadu garumā ievāktiem paraugiem Beļģijā (Fraiture et al., 2021).

Pirmā valsts, kas 2014. ziņoja par neautorizēto *B. subtilis*, bija Vācija. Divās Vācijas laboratorijās neatkarīgi tika iegūtas neautorizētā mikroorganisma kultūras, kas tika detalizēti raksturotas ar dažādām mikrobioloģijas un molekulārās bioloģijas metodēm. Iegūtās kultūras barotnēs sekretēja koši dzeltenu vielu, kas jau sākotnēji liecināja par iespējamo B2 vitamīna sintēzi. Gan MALDI-TOF masas spektrometrijas bioķīmiskā analīze, gan 16S rRNS sekvenču analīze apstiprināja iegūtās kultūras kā *B. subtilis*.

Pirmajā posmā, izmantojot PCR metodes, tika veikts skrīnings, lai apstiprinātu ģenētisko modifikāciju klātbūtni izolēto *B. subtilis* kultūru genomā. Izmantojot rIPKĒR praimerus un zondes, kas mērķēti uz lac operona un pUC vektorā esošās plazmīdas pBR322 robežu sekvencēm, iegūtajās kultūrās tika apstiprināta rekombinantā pUC vektora klātbūtne. Savukārt, izmantojot konvencionālo PCR, tika veikta potenciālo selekcijas marķieru – AMR gēnu (*ermAM*, *cat*) skrīnings, kas apstiprināja minēto gēnu klātbūtni.

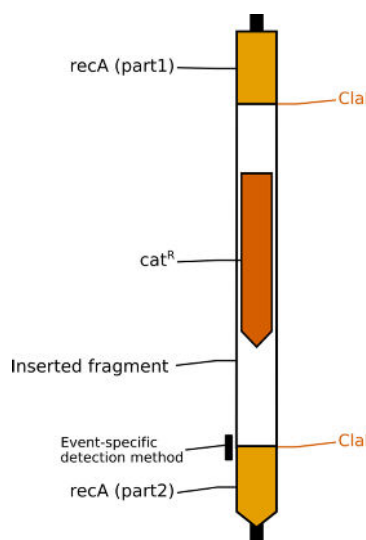
Nākamajā posmā tika veikta plaša un detalizēta iegūto izolātu visa genoma analīze. Kopumā tika veikti trīs neatkarīgi NGS eksperimenti, izmantojot divas neautorizētās *B. subtilis* kultūras no Vācijas laboratorijām, kā arī vienu kultūru no Eiropas Komisijas Kopīgā pētniecības centra (angļu val. *Joint Research Centre*), izmantojot trīs dažādas NGS platformas – Illumina MiSeq ar MiSeq Reagent Nano Kit v2, Illumina HiSeq 1500 ar HiSeq SBS kit v4 un Roche GS Junior System ar Rapid library preparation kit, tādējādi sniedzot iespēju salīdzināt iegūtos genoma sekvenču rezultātus starp dažādām sekvenēšanas platformām un laboratorijām.

Salīdzinot iegūto izolātu sekvences ar publiskajās datu bāzēs atrodamajām sekvencēm, visaugstāko līdzību uzrādīja *B. subtilis subsp. subtilis* celmi 168, 6051-HGW un AG1839, no kuriem celms 168 ir plaši izmantots modelis laboratorijas eksperimentos, sakarā ar tā

transformācijas īpašībām (Barbe et al., 2009). Iegūtās genoma sekvences tika salīdzinātas arī ar 2015. gadā publicēto pirmo no neautorizētā produkta iegūto *B. subtilis* genoma sekveni (Barbau-Piednoir et al., 2015a), un sekvences uzrādīja 99% identitāti.

Izolātos, kad bija iegūti no importētā produkta, bija atrodamas gan zināmajos radniecīgajos *B. subtilis* celmos 168, 6051-HGW un AG1839 jau iepriekš aprakstītas, gan jaunas un unikālas genoma variācijas. Lai detektētu mākslīgi ieviestos genoma elementus, tika veikta papildus sekvenču salīdzinājums ar atbilstošiem bioinformātikas rīkiem (runMapping 454), par references sekveni izmantojot celmu 168. Kopumā tika atrastas četras delēcijas un viena insercija:

- delēcija no 529421. līdz 549933. nukleotīdam, kas ietver integrācijas un konjugācijas elementu ICEBs1 gēnā *trnS-leu2*; ir iepriekš aprakstīta (Auchtung et al., 2005);
- delēcija no 2428481. līdz 2436938. nukleotīdam, kas ietver *ribD*, *ribE* un *ribAB* gēnus, kombinācijā ar *rib* operona regulatoru *fswa*; ir iepriekš aprakstīta (Winkler et al., 2002). Cits *ribDEAHT* operons hromosomā netika atrasts, kas norāda uz to, ka B2 vitamīna producēšanai nepieciešami plazmīdu kodēti *rib* operoni;
- delēcija no 3236246. līdz 3236442. nukleotīdam, kas ietver potenciālā transmembrānu proteīnu kodējošā *yufK* gēna 3' rajonu;
- delēcija no 3812644 līdz 3812747. nukleotīdam *rpoE* gēnā, kas kodē DNS vadītās RNS polimerāzes delta subvienību, kas saistīta ar paaugstinātu RNS transkripcijas specifiskumu un efektivitāti; ir iepriekš aprakstīta (Hiratsu et al., 1995);
- unikāla insercija 1764920. pozīcijā *recA* gēnā, kas kodē homologajā rekombinācijā un DNS labošanā iesaistītu proteīnu. Insercija ir 1290 bp gara un satur *cat* gēnu, kas kodē hloramfenikola rezistences gēnu, un ir klonēts *Clal* restrikcijas saitā (AT|CGAT), un visticamāk kalpo kā selekcijas marķieris (2. attēls).
-



2. attēls. *B. subtilis* genoma rajons ar transgēno *cat* gēnu, kas klonēts *Clal* restrikcijas saitā *recA* gēnā. Norādīta genoma pozīcija (angļu val. *event-specific detection method*), uz kuru mērķēta rLPKĒR skrīninga metode, ĢMO “notikuma” (angļu val. *event*) detektēšanai (pēc Deckers et al., 2020).

Izmantojot iegūto informāciju par *cat* gēna integrācijas vietu genomā (2. attēls), tika izveidoti rLPKĒR praimeru un zonde (3. attēls), neautorizētā *B. subtilis* ātrai detekcijai. Izstrādātā

testa sistēma (marķieris 558) uzrādīja pozitīvu rezultātu visos trīs analizētajos *B. subtilis* izolātos.

cgagcttttgcgcgtataccggatctaacgcagctccgcacgcgattataggatgtggtttgtattggaatggc

3. attēls. Praimeru un zondes pozīcija genomā, neautorizētā *B. subtilis* celma detektēšanai. Praimeru un zondes sekvenču pozīcijas pasvītrotas; zaļš – *recA* sekvenču; pelēks – savienojamā sekvenču, kas satur *Clal* restrikcijas saiti; zils – insercija.

Aprakstītā insercija bija vienīgā pozīcija hromosomā, kurā tika detektēta sveša DNS integrācija. Tomēr, analizējot ar visa genoma sekvenēšanu iegūtos izolātu sekvenču nolasījumus, daļu no tiem nebija iespējams "mapēt" jeb sakārtot pret references genomu (*B. subtilis* celms 168). Šie nolasījumi veidoja četras neatkarīgas pārklājošās sekvenču (angļu val. *contigs*), kas tika identificētas kā četras dažādas ārpus hromosomas esošas rekombinantas plazmīdas (4. attēls):

- **pGMBsub01** (LT622641), 11378 bp; satur *B. amyloliquefaciens* ribDEAHT operonu ar gēniem *ribD*, *ribE*, *ribA*, *ribH* un *ribT*; papildus *B. amyloliquefaciens* proteīnu gēnus; pUC19 vektora ampicilīna rezistences gēnu; pUB110 vektora kanamicīna un bleomicīna rezistences gēnus (4. attēls, A);
- **pGMBsub02** (LT622641), kas ir saīsināta (7581 bp) iepriekš aprakstītās pGMBsub01 versija un satur *B. amyloliquefaciens* ribDEAHT operona *ribD* un *ribE* gēnus; pUC19 vektora ampicilīna rezistences gēnus; pUB110 vektora kanamicīna un bleomicīna rezistences gēnus (4. attēls, B);
- **pGMBsub03** (LT622642), 8544 bp; satur pUC19 vektora ampicilīna rezistences gēnus; tetraciklīna rezistences gēnu kaseti; daļēju *B. subtilis* ribDEAHT operonu ar *ribA*, *ribH* un, *ribT* gēniem (4. attēls, C);
- **pGMBsub04** (LT622643), 29760 bp; satur pilnu *B. subtilis* ribDEAHT operonu; sekvenču no *Streptococcus pyogenes* raksturīgās plazmīdas pSM19035 ar eritromicīna rezistences gēniem (4. attēls, D).

PCR- 690	<u>gatgaattatatcaacatattaagcctttgggcattttgcacccaatacatcattaa</u> <u>aagatccggggaattgctgcaggcatgcaagcttggcgtaatcatggtcatagc</u>
PCR- 691	<u>cgattaagtgggtaacgccagggttttccagtcacgacgttgtaaaacg</u> <u>acggccagtgaattcgcaagacgaaataaacggtacgagcagttttcttagagaa</u>
PCR- 693	<u>tcgtgcacagcttgaaatctagaggaacgagaattaactttatggatcggggat</u> <u>cctctagagtcgacctgcaggcatgcaagcttggcgtaatcatggtcatagctgtttcc</u>
PCR- 694	<u>cattcgattgtgcgagcgcagactcaaaaaacaggcgaattccagttaaattccgtgtag</u> <u>gaatttttagagtagaagatcaaaaaaattatgtctgttacgctgaatacaaaaaatacc</u>
PCR- 804	<u>agaccgcgtttacagtcagcattgaccacaagctgaccgaatatgctggatacgtatatgc</u> <u>ttggaacgaaaaaagaattcgag</u>

5. attēls. Praimeru un zonžu sekvences (pasvītrotas), neautorizētā *B. subtilis* celma plazmīdu pGMBsub01, pGMBsub02, pGMBsub03 un pGMBsub04 detektēšanai.

Jaunais neautorizētais ĢM *B. subtilis* celms līdz šim nekur nav bijis aprakstīts, tomēr pētījuma autoriem, balstoties uz iegūto informāciju par izolātu sekvenēm, izdevās identificēt patentu B2 vitamīna ražošanai no Krievijas, kurā aprakstītajam celmam un tā iegūšanai veiktajām transformācijām ir daudz līdzību ar iegūto izolātu ģenētiskajiem elementiem (Mironov et al., 2004).

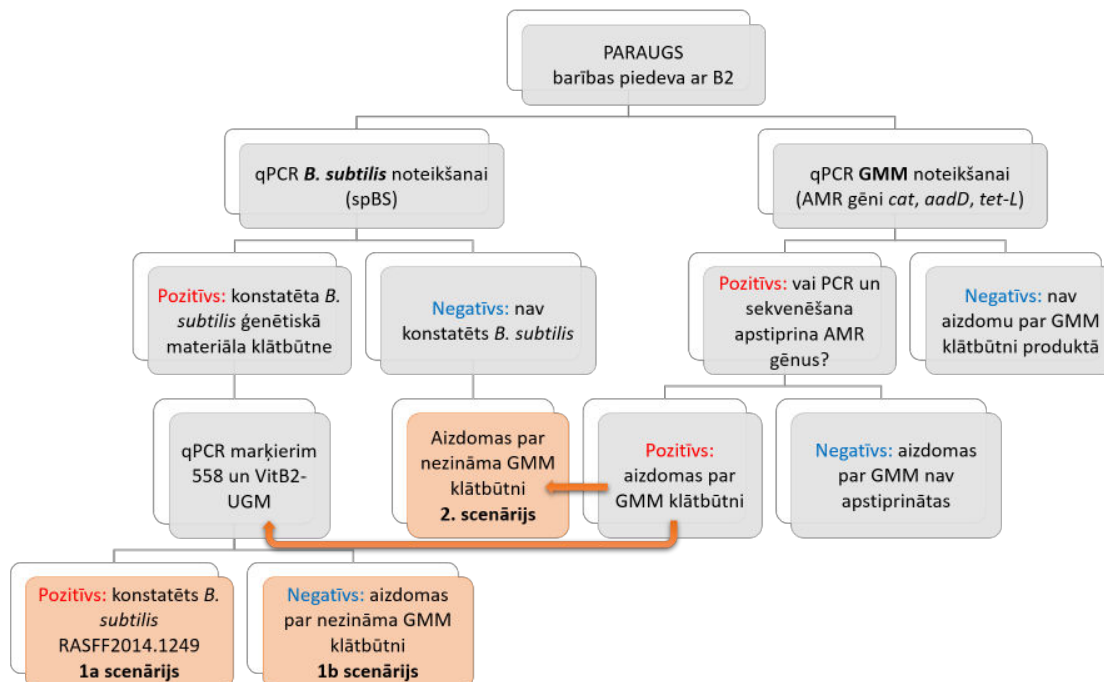
Lai gan ar NGS var iegūt visplašāko informāciju par analizējamā organisma genoma sekvenci, kā arī ir iespējams detektēt pavisam jaunas, līdz šim neaprakstītas sekvenču variācijas, tomēr šī pieeja prasa specifisku ekspertīzi, kā arī padziļinātu esošās informācijas pārzināšanu un izvērtēšanu. Tāpat bieži ir grūti izšķirt patiesas sekvenču izmaiņas no iespējamām kļūdām vai sekvenču kvalitātes problēmām, kas var būt radušās sekvenēšanas procesā. Šajā gadījumā ĢM *B. subtilis* genoms vēlāk ir ticis pārsekvenēts, izmantojot sekvenēšanas platformas, kas balstās uz garāku nolasījumu iegūšanu, un jauniegūtā sekvenču parādīja, ka vismaz daļa no identificētajām plazmīdām tomēr ir integrētas genomā (Berbers et al., 2020). Tomēr kopumā iegūtie rezultāti sniedz detalizētu molekulāri ģenētisko raksturojumu un tos var izmantot, lai ātri izveidotu specifiskas detekcijas metodes konkrētu mērķa sekvenču identificēšanai.

Abos augstāk aprakstītajos pētījumos pieminētās rIPK metodes ĢMM skrīningam – marķiera 558 metode (Paracchini et al., 2017) un VitB2-UGM metode (Barbau-Piednoir et al., 2015b) – jau tiek izmantotas praksē Beļģijas programmā B2 vitamīna kā barības piedevas kontrolei. Metodes jau 2018. un 2019. gadā deva pozitīvus rezultātus, konstatējot kontamināciju ar jau iepriekš aprakstīto ĢM *B. subtilis* celmu (RASFF2018.2755, RASFF2019.3216). Eiropas References laboratorija par ģenētiski modificētu pārtiku un barību (EURL GMFF) ir izveidojusi plazmīdu pENGL-00-EM-01/18-01, kuru nacionālās references laboratorijas var izmantot kā pozitīvo kontroli marķiera 558 amplificēšanai³. Neviena cita metode ĢMM testēšanai tajā brīdī pieejama nebija, līdz ar to nevar pilnībā izslēgt vēl kāda citu ĢMM vai to ģenētiskā materiāla klātbūtni analizētajos paraugos, ko nav iespējams identificēt ar esošajām metodēm.

2021. gadā publicētajā pētījumā (Fraiture et al., 2021) tika veikts pārskats par 67 B2 vitamīna kā barības piedevas paraugiem, kas no 2016. līdz 2019. gadam tika ievākti kontroles

³ Plasmid control sample for the detection of a genetically modified *Bacillus subtilis* production strain identified in a vitamin B2 feed additive (558-integration site of cat in *B. subtilis* isolate e871) by the European Union Reference Laboratory for Genetically Modified Food and Feed (EURL GMFF).

programmas ietvaros Beļģijā un testēti, izmantojot 2014. gadā identificētā ĢM *B. subtilis* celma marķiera 558 un vitB2-UGM rIPKĒR metodes (Barbau-Piednoir et al., 2015b; Paracchini et al., 2017). Izmantojot šīs, kā arī citas literatūrā jau atrodamas metodes, tika izstrādāta primārā skrīninga metode ĢMM detektēšanai B2 vitamīna kā barības piedevas produktos (6. attēls).



6. attēls. Darba plūsmas shematisks attēlojums neautorizētu ĢMM skrīningam B2 vitamīna kā barības piedevas produktos (pēc Fraiture et al., 2021).

Tā kā *B. subtilis* ir viena no visbiežāk izmantotajām ĢMM sugām B2 vitamīna ražošanā un vienīgā ES autorizētā B2 vitamīna kā barības piedevas producējošā baktēriju suga, metodika balstās uz *B. subtilis* sugas specifisku gēnu (Cangiano et al., 2014), kā arī trīs galveno ĢM baktērijās izmantoto AMR gēnu – *cat* (hloramfenikola rezistence), *aadD* (kanamicīna, neomicīna rezistence) un *tet-L* (tetraciklīna rezistence) – detektēšanu (šīs metodes detalizētāk apskatītas tālākās nodaļās) (Fraiture et al., 2020a, 2020b, 2020c) (4. tabula). Pozitīva AMR signāla gadījumā, iegūtie rezultāti jāapstiprina ar konvencionālo PCR un Sangera sekvenēšanu (6. attēls).

4. tabula
Praimeru un zonžu sekvences AMR un *B. subtilis* sugas specifisko gēnu detektēšanai ar rIPKĒR

Praimeris	Sekvence 5'-3'	Avots
cat-F	GTGACAAGGGTGATAAACTCAAATAC	Fraiture et al., 2020a
cat-P	FAM-ACCTAACTCTCCGTCGCTATTGTAACCAGT-TAMRA	
cat-R	TGTATAAAGTGGCTCTAACTTATCCC	
aadD-F	ATCAGATTGGCCGCTTACAC	Fraiture et al., 2020b
aadD-P	FAM-CGGTAGAAGCCCAAACGTTCCAC-TAMRA	
aadD-R	ATAAGGGCACAAATCGCATC	
tetL-F	ATAAACGAGCCATAATAAGTAAGGAAAAG	Fraiture et al., 2020c
tetL-P	FAM-CCAACAAACCAATTACCGACCCGAAACAA-TAMRA	

Praimeris	Sekvence 5'-3'	Avots
tetL-R	TCAATTAGGCATCAAAAGGTTACTCC	
spBS-F	CTGATAAGYCCAAGCGGAATCCC (SYBR Green metodei)	Cangiano et al., 2014
spBS-R	GAGCTTGTCGGCCTATTTAAGC (SYBR Green metodei)	

Balstoties uz izstrādāto pieeju, aizdomas par neautorizēta ĢMM klātbūtni var būt šādos gadījumos:

- ja tiek detektēts *B. subtilis* sugas specifiskais gēns un vismaz viens pilna garuma AMR gēns, tiek pārbaudīta zināmā ĢM *B. subtilis* celma 2014-3557 klātbūtne ar specifiskajām rIPKĀR metodēm. Pozitīva signāla gadījumā ir apstiprināta neautorizēta ĢM *B. subtilis* celma 2014-3557 klātbūtne paraugā (6. attēls, 1a scenārijs);
- ja tiek detektēts *B. subtilis* sugas specifiskais gēns un vismaz viens pilna garuma AMR gēns, bet ĢM *B. subtilis* celma 2014-3557 klātbūtne ar specifiskajām rIPKĀR metodēm netiek konstatēta, pastāv aizdomas par nezināma ĢMM klātbūtni paraugā (6. attēls, 1b scenārijs);
- ja netiek detektēts *B. subtilis* sugas specifiskais gēns, bet vismaz viens pilna garuma AMR gēns paraugā tiek konstatēts, ir iespējama vēl cita nezināma ĢMM klātbūtne paraugā (6. attēls, 2. scenārijs).

Pielietojot izstrādāto primārā skrīninga metodiku, visi 67 kontroles programmā ievāktie paraugi tika testēti, lai noteiktu neautorizētu ĢMM klātbūtni. Seši paraugi uzrādīja pozitīvu rezultātu uz *B. subtilis* specifisko gēnu (Cq no 18,2 līdz 36,4). Piecos no sešiem paraugiem tika atrasts arī vismaz viens pilna garuma AMR gēns – visos piecos paraugos tika atrasti *cat* un *aadD* gēni. Tie paši pieci paraugi uzrādīja pozitīvu signālu marķiera 558 un vitB2-UGM rIPKĀR reakcijās (visos gadījumos abas reakcijas bija pozitīvas, Cq vērtības no 16,5 līdz 39,9), kas liecina par potenciālu kontamināciju ar jau zināmo ĢM *B. subtilis* celmu 2014-3557. No neviena no 5 paraugiem netika iegūta dzīvotspējīga ĢMM kultūra. Par iegūtajiem rezultātiem tika sagatavoti ziņojumi RASFF2018.2755 un RASFF2019.3216.

Sestais paraugs, kurš uzrādīja vāji pozitīvu signālu *B. subtilis* sugas specifiskajā rIPKĀR reakcijā (Cq 36,4), kas rada aizdomas par zema līmeņa kontamināciju, tomēr visas tālākās reakcijas bija negatīvas – iespējams kontaminācija zem šo metožu detekcijas robežas. Kopumā iegūtie rezultāti nerada aizdomas, ka Beļģijas tirgū B₂ vitamīna kā barības piedevas produktos būtu atrodami vēl kādi citi neautorizēti ĢMM bez jau zināmā ĢM *B. subtilis* celma 2014-3557.

Bez PCR balstītās stratēģijas, tika izvēlēti arī citi indikatori ĢMM klātbūtnes noteikšanai. Pirmkārt, tika izvērtēta antibiotikas hloramfenikola klātbūtne paraugos, ņemot vērā, ka hloramfenikola rezistences gēns *cat*, bieži tiek izmantots kā selekcijas marķieris un hloramfenikols jau iepriekš ir konstatēts mikrobiālās fermentācijas produktos (Fraiture et al., 2020a), neskatoties uz to, ka tā klātbūtne pārtikā ir aizliegta. Divos paraugos (no pieciem jau iepriekš aprakstītajiem ĢMM pozitīvajiem paraugiem) tika konstatēta hloramfenikola klātbūtne, kas liecina, ka arī iepriekš ziņotajos gadījumos, kad produktā tikusi konstatēta šī antibiotika, nav izslēgta ĢMM klātbūtne tajos. Līdz ar to paraugi, kuros tiek konstatēts hloramfenikols, būtu jātestē, izmantojot šeit piedāvāto skrīninga stratēģiju, lai novērtētu potenciālo piesārņojumu ar ĢMM.

Otrs izvēlētais indikators bija no parauga izdalītā DNS daudzums. Lielākajā daļā gadījumu izdalītā DNS koncentrācija bija 1 līdz 30 ng/μl, taču četros gadījumos tā sasniedza vairākus tūkstošus ng/μl. Tomēr nevienā no paraugiem, no kuriem izolētā DNS uzrādīja ārkārtīgi augstu koncentrāciju, netika konstatēta ĢMM klātbūtne, un visticamāk DNS

koncentrācijas mērījumu šajos DNS paraugos maldīgi paaugstināja B2 vitamīna paraugiem raksturīgā dzeltenīgā pigmenta klātbūtne.

Vēl viena alternatīva ĢMM noteikšanai būtu izmantot jau pastāvošas uz 16S rDNS mērķētas konvencionālā PCR metodes, tomēr konvencionālā PCR jutība parasti ir zemāka, tāpēc metode būtu piemērota tikai paraugiem ar augstu kontamināciju, kā tas jau iepriekš tika demonstrēts (Deckers et al., 2020).

Secinājumi

Lai gan ES prasības paredz, ka pārtikas enzīmu gadījumā produktā nedrīkst atrasties ne producējošie ĢMM, ne to ģenētiskais materiāls, tomēr līdzšinējā pieredze rāda, ka šāds piesārņojums var tikt konstatēts. Līdzšinējie gadījumi saistīti ar konkrētu B2 vitamīnu producējošu ĢM *B. subtilis* celmu, kas pirmo reizi Eiropā vairākās valstīs tika konstatēts no Ķīnas importētā barības piedevā. Ir izstrādātas vairākas uz PCR balstītas metodes, kas vērstas gan uz specifiskā celma detektēšanu, gan arī ir izstrādāta primārā skrīninga stratēģija vēl citu potenciālo ĢMM detektēšanai produktos, tomēr pašreiz pieejamās metodes pagaidām aptver samērā ierobežotu potenciālo ĢMM klāstu.

1.1.4. Antimikrobiālās rezistences gēni ģenētiski modificētu mikroorganismu klātbūtnes noteikšanā pārtikas un barības produktos

- *Antimikrobiālās rezistences gēnu noteikšana ar PCR metodēm un Sangerā sekvenēšanu*

Viens no ģenētiski modificētu mikroorganismu (ĢMM) skrīninga mērķiem ir AMR gēni, kas tiek izmantoti ĢMM izstrādē kā selekcijas marķieri. AMR gēnu potenciālā pārvietošanās horizontālās pārneses ceļā apdraud vidi un sabiedrības veselību. ES ĢMM apriņķi komerciālos pārtikas un barības produktos ierobežo regula (EK) Nr. 1829/2003, kas nosaka, ka šādos produktos nedrīkst atrasties ne pārtikas piedevas, enzīmus un aromatizētājus producējošie ĢMM, ne to rekombinantais ģenētiskais materiāls. Risks, ka AMR gēnu varētu nonākt vidē un citos mikroorganismos, ir paaugstināts, ja ĢMM satur pilna garuma AMR gēnu, blakus sekvenču elementus (angļu val. *flanking regions*), gēns atrodas starp mobiliem ģenētiskajiem elementiem un/vai produktā sastopama dzīvotspējīga ĢMM kultūra. Ir izstrādātas nedaudzas rLPKR metodes, kas balstītas uz īsu (apmēram 100 bp) AMR gēnu fragmentu detekciju, tomēr tās nevar pierādīt pilna garuma AMR gēnu klātbūtni, kas apgrūtina gēnu pārvietošanās riska novērtēšanu un norāda uz vajadzību izstrādāt metodes šādu produktu testēšanai kompetentajās iestādēs (EFSA, 2019). Šajā sadaļā tuvāk apskatīta vairāku metodikas stratēģiju izstrāde AMR gēnu noteikšanai ar mērķi detektēt ĢMM.

Uz hloramfenikola rezistences gēnu *cat* mērķēta metode ģenētiski modificētu baktēriju detektēšanai pārtikas un barības produktos (pēc Fraiture et al., 2020a)

Vieni no potenciālajiem marķieriem ĢMM detekcijai ir hloramfenikola rezistences (CmR) gēni. Lai gan hloramfenikola izmantošana pārtikas ražošanā ES ir aizliegta, tā klātbūtne ir konstatēta produktos, kas iegūti mikrobiālās fermentācijas ceļā – laikā no 2008. līdz 2015. gadam bijuši vairāk nekā 30 RASFF ziņojumi, kas netieši norāda uz iespējamo CmR gēnu saturošu ĢMM izmantošanu, kā arī parāda nepieciešamību šādu produktu testēšanas metožu attīstīšanai. Tālāk aprakstīts pētījums, kurā parādīta uz CmR gēnu detekciju balstītas ĢMM skrīninga metodes izstrāde (Fraiture et al., 2020a).

Pētījuma pirmajā posmā tika izvērtēta vispārējā CmR gēnu sastopamība ĢM baktērijās, kas tiek izmantotas mikrobiālajā fermentācijā pārtikas un barības piedevu ražošanai. Tika identificētas visas ĢM baktēriju sugas, kas pētījuma veikšanas laikā bija uzskaitītas EPNI sarakstā ar mikroorganismiem, kas tiek izmantoti pārtikas un barības piedevu, enzīmu un aromatizētāju ražošanā (EFSA, 2017). (Kopš 2017. gada saraksts ir atjaunots un tajā iekļauta papildus informācija (EFSA, 2020)).

Kopumā tika identificēti 37 ĢM baktēriju celmi, no kurām lielākā daļa (75,6%) pieder divām sugām – *B. licheniformis* (45,9%), *B. subtilis* (29,7%), bet pārējās sastopamās baktērijas patentos bija *Escherichia coli* (8.1%), *Streptomyces violaceoruber* (8.1%), *Corynebacterium glutamicum* (2.7%), *B. amyloliquefaciens* (2.7%) and *Pseudomonas fluorescens* (2.7%). Tālāk tika apskatīti publiski pieejamie patenti, kuros aprakstītajās mikrobiālās fermentācijas metodēs izmantoti *B. subtilis* un *B. licheniformis* celmi, un kas ietver vairāk nekā 20 dažādus ES tirgum aktuālus fermentācijas produktus, piemēram, ksilanāzi, asparagināzi, β -galaktozidāzi, α -amilāzi, β -amilāzi, B2 vitamīnu jeb riboflavīnu, pienskābi, laktāzi, proteāzes, u.c. Balstoties uz šiem kritērijiem kopumā tika identificēti 241 patenti, no kuriem 72 (30%) kā selekcijas marķieris bija minēts CmR kodējošais gēns, turklāt bieži kombinācijā ar vēl citiem AMR gēniem. Patentos tika izmantotas vairākas CmR gēnu saturošas plazmīdas (pC194, pHT01, pJH101, pBGSC6, pBR325, pGJ148 un pL603), no kurām lielākā daļa saturēja CmR gēnu, kas atbilst hloramfenikola acetiltransferāzi kodējošā *cat* gēna sekvenai ar GenBank numuru NC_002013.1.

Balstoties uz sekveni NC_002013.1 tika izstrādāta *cat* gēna skrīninga pieeja divos posmos. Pirmajā posmā tiek izvērtēta *cat* gēna potenciālā klātbūtne, izmantojot uz TaqMan® zondi (cat-P) un praimeri (cat-F, cat-R) balstītu rLPKĀ metodi, ar kuru tiek amplificēts 96 bp garš *cat* gēna fragments (Turgeon et al., 2008). Pozitīva rLPKĀ rezultāta gadījumā pāriet uz otru metodes posmu, kurā ar konvencionālo PCR tiek novērtēta pilna *cat* gēna klātbūtne. Šim nolūkam, ņemot vērā ĢMO rutīnas analīzes kritērijus, tika izstrādāti praimeri, kas amplificē iespējami garāko *cat* gēna fragmentu. Lai panāktu labāku reakcijas iznākumu, tiek pielietota *nested*-PCR stratēģija, kuras pirmajā posmā tiek amplificēts 573 bp garš *cat* gēna fragments (praimeri cat-F1 un cat-R1), kas tālāk tiek izmantots otrā amplifikācijā, lai rezultātā iegūtu 529 bp garu *cat* gēna fragmentu (praimeri cat-F2 un cat-R2). Abos metodes posmos izmantoto praimeru un zondes sekvenances norādītas 5. tabulā.

5.tabula
Praimeru un zondes sekvenances *cat* gēna fragmentu amplifikācijai

Praimera nosaukums	Sekvence
cat-F	GTGACAAGGGTGATAAACTCAAATAC
cat-R	TGTATAAAGTGGCTCTAACTTATCCC
cat-P	FAM-ACCTAACTCTCCGTCGCTATTGTAACCAGT-TAMRA
cat-F1	TTTGAACCAACAAACGACTTT
cat-R1	GGCCTATCTGACAATTCCTGA
cat-F2	CCAACAAACGACTTTTAGTATAACC
cat-R2	TCCTGCATGATAACCATCAC

Metodes praktiskajā izstrādē tika izmantoti 85 savvaļas tipa mikroorganismu celmi (baktērijas un sēnes), kas pārstāv lielāko daļu EPNI sarakstā minēto pārtikas un barības piedevu, enzīmu un aromatizētāju ražošanā izmantoto mikroorganismu (EFSA, 2017). Analīzē tika iekļauta arī neautorizētais ĢM *B. subtilis* celms 2014-3557 (Barbau-Piednoir et al., 2015a), kā arī trīs Beļģijas un Francijas tirgos atklāti B2 vitamīna kā barības piedevas paraugi,

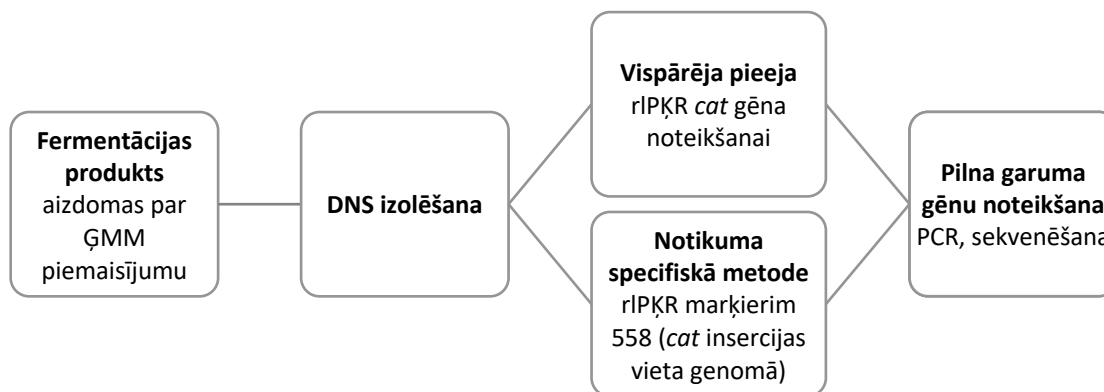
kas satur neautorizētus ĢMM vai ar tiem saistītu ģenētisko materiālu, un viens negatīvs komerciālais paraugs.

Nevienā no savvaļas tipa mikroorganismu celmiem ar rIPKĀR netika konstatēta *cat* gēna klātbūtne, izņemot vienu *B. subtilis* celmu, kas uzrādīja vēli pozitīvu rezultātu (Cq 40) vienā no četriem reakcijas replikātiem, taču tālākās konvencionālās PCR visiem celmiem bija negatīvas. Tomēr, *in silico* salīdzinot *cat* gēna sekveni ar NCBI references sekvenču datu bāzē pieejamajām savvaļas tipa mikroorganismu sekvencēm, nedaudzas sugas uzrādīja *cat* gēna klātbūtni ar 100% identitāti. No šīm sugām tikai viena (*Enterococcus faecium*) saskaņā ar EPNI rīcībā esošo informāciju tiek izmantota mikrobiālās fermentācijas produkcijas iegūšanai. Pētījumā iekļautais *E. faecium* celms neuzrādīja *cat* gēna klātbūtni. Līdz ar to var secināt, ka kopumā metode uzrāda augstu specifiskumu.

Metodes jutība tika pārbaudīta, izmantojot DNS paraugus no B₂ vitamīnu producējošā *B. subtilis* celma 2014-3557 ar genoma kopiju skaitu no 5 500 000 līdz 0. Gan rIPKĀR, gan konvencionālā PCR spēja detektēt vismaz 5 genoma kopijas, kas norāda uz labu metodes jutību.

Testējot metodes pielietojamību, tika izmantoti četri komerciāli B₂ vitamīna kā barības piedevas paraugi. Trīs paraugi, kas jau iepriekš bija uzrādījuši neautorizētu ĢMM klātbūtni, arī ar šajā pētījumā izstrādāto metodiku uzrādīja pozitīvus gan rIPKĀR, gan *nested*-PCR rezultātus, bet paraugs, kurā ĢMM atrasts iepriekš nebija, arī ar šo metodi bija negatīvs, kas demonstrē praktisko metodes pielietojamību.

Kopumā pētījuma autori ĢMM detektēšanai piedāvā shēmu, kurā papildus tiktu iekļauta arī ĢMM notikuma specifiskā marķiera 558 metode 2014. gadā identificētā neautorizētā ĢM *B. subtilis* (Parrachini et al., 2017) notikuma specifiskajai identifikācijai (7. attēls).



7. attēls. Pilna garuma ĢMM *cat* gēna noteikšanas shēma (adaptēts pēc Fraiture et al., 2020a).

Uz kanamicīna un neomicīna rezistences gēnu *aadD* mērķēta metode ģenētiski modificētu baktēriju detektēšanai pārtikas un barības produktos (pēc Fraiture et al., 2020b)

Līdztekus *cat* gēnam, viens no visbiežāk ĢMM patentos izmantotajiem AMR gēniem ir aminoglikozīdadeniltransferāzi kodējošais gēns *aadD*, kas nodrošina baktēriju rezistenci pret kanamicīnu un neomicīnu. No iepriekš CmR metodes aprakstā pieminētā 241 patenta, kanamicīna rezistences (KanR) īpašības izmantotas 59,9% un neomicīna rezistences (NeoR) 36,1% patentu. Gēns *aadD* kopumā pieminēts 108 (44,8%) patentos. Izmantotā gēna sekvenca atbilst GenBank numuram M19465.1.

Metodes praktiskajā izstrādē tika izmantoti iepriekš *cat* metodes aprakstā pieminētie 85 savvaļas tipa mikroorganismu celmi (baktērijas un sēnes) un neautorizētais ĢM *B. subtilis* celms 2014-3557 (Barbau-Piednoir et al., 2015a).

Vispirms tika izvērtēta *aadD* gēna sekvenču M19465.1 sastopamība savvaļas tipa baktērijās. Veicot *in silico* salīdzinājumu ar NCBI references sekvenču datubāzē atrodamajām sekvencēm, tikai *E. coli* uzrādīja *aadD* gēna klātbūtni, līdz ar to lielākā daļa baktēriju, kas tiek izmantotas fermentācijas produktu iegūšanā, *aadD* gēnu nesatur. Ņemot vērā kanamicīna un neomicīna izmantošanas ietekmi uz cilvēku un dzīvnieku veselību, būtiski ir spēt detektēt to rezistences gēnu klātbūtni neatkarīgi no izcelsmes.

Metode balstās uz diviem secīgiem PCR posmiem. Pirmajā ar rIPKĀR tiek veikts skrīnings potenciālās *aadD* gēna klātbūtnes novērtēšanai, amplificējot 138 bp garu *aadD* gēna fragmentu (praimeri un zonde aadD-F, aadD-R un aadD-P). Pozitīva rezultāta gadījumā tiek veikta konvencionālā PCR, pielietojot *nested*-PCR pieeju, kuras pirmajā posmā tiek amplificēts 664 bp garš *aadD* gēna fragments (praimeri aadD-F1 un aadD-R1), kas tālāk tiek izmantots otrā amplifikācijā, kā rezultātā tiek iegūts 597 bp garš *aadD* gēna fragments (praimeri aadD-F2 un aadD-R2). Iegūtais PCR produkts tiek raksturots ar sekvenēšanu. Abos metodes posmos izmantoto praimeru un zondes sekvenču norādītas 6. tabulā.

6.tabula
Praimeru un zondes sekvenču *aadD* gēna fragmentu amplifikācijai

Praimeru nosaukums	Sekvence
aadD-F	ATCAGATTGGCCGCTTACAC
aadD-R	ATAAGGGCACAAATCGCATC
aadD-P	FAM-CGGTAGAAGCCCAAACGTTCCAC-TAMRA
aadD-F1	GAATATTGGATAAATATGGGGATGA
aadD-R1	TATCCGTGTCGTTCTGTCCA
aadD-F2	ATGGCTCTCTGGTCGTCAG
aadD-R2	CCTGAATCCCATTCCAGAAA

Neviens no savvaļas tipa mikroorganismu celmiem, ieskaitot *E. coli*, neuzrādīja *aadD* gēna klātbūtni, norādot uz augstu metodes specifiskumu.

Metodes jutība tika pārbaudīta, izmantojot DNS paraugus no B2 vitamīnu producējošā ĢM *B. subtilis* celma 2014-3557 ar genoma kopiju skaitu no 5 500 000 līdz 0. Pirmajā metodes posmā rIPKĀR deva pozitīvu signālu līdz pat vienai genoma kopijai (Cq 36,9, taču tikai viens no trim rIPKĀR replikātiem bija pozitīvs), un konvencionālā PCR spēja detektēt vismaz 5 genoma kopijas (viens no diviem PCR duplikātiem bija pozitīvs), kas kopumā norāda uz labu metodes jutību. Iegūtā PCR produkta sekvenču apstiprināja 100% sakritību ar *aadD* references sekvenču Nr. M19465.1.

Metodes pielietojamība tika novērtēta, izmantojot sešus ES komerciāli pieejamus produktus – trīs B2 vitamīna kā barības piedevas paraugus un trīs pārtikas piedevas. No trim barības paraugiem divos iepriekš bija konstatēts neautorizētais *B. subtilis* celms 2014-3557 vai tā ģenētiskais materiāls (RASFF2018.2755, RASFF2014.1249). Trešais barības paraugs bija B2 vitamīna piedeva bez iepriekš konstatētas kontaminācijas, kas tika izmantota kā negatīvā kontrole. Pārtikas paraugi ietvēra *B. licheniformis* producētu α -amilāzi un *B. subtilis* producētu neitrālo proteāzi, kurā konstatēts nejaušs dzīvotspējīga *Bacillus* piemaisījums, taču nebija noteikts, vai tas ir ĢM (Deckers et al., 2020). Kā negatīvā kontrole tika izmantot *B. licheniformis* producēta α -amilāze bez iepriekš konstatēta nevēlama ĢMM piemaisījuma.

Ar rLPKĀR metodi abi barības paraugi, kuros iepriekš bija konstatēta kontaminācija ar ĢMM, bija pozitīvi (Cq 16,0 un 34,1) un negatīvā kontrole, kā sagaidāms, negatīva. Pārtikas paraugu gadījumā abi paraugi, kuros iepriekš tika konstatēts *Bacillus* piemaisījums, bija pozitīvi (Cq 11,6 un 16,0) un trešais pārtikas paraugs bija negatīvs. No visiem četriem paraugiem, kuri uzrādīja pozitīvu rLPKĀR, tika iegūts 597 bp garš *nested*-PCR produkts, kura sekvenca atbilda *aadD* references sekvencai M19465.1. Kopumā rezultāti rāda, ka metode ir pielietojama baktēriju fermentācijas produktu testēšanai, lai noteiktu ĢMM piemaisījuma klātbūtni.

Uz tetraciklīna rezistences gēnu *tetL* mērķēta metode ģenētiski modificētu baktēriju detektēšanai pārtikas un barības produktos (pēc Fraiture et al., 2020c)

Iepriekš aprakstītās metodes, kas balstītas uz *cat* (Fraiture et al., 2020a) un *aadD* (Fraiture et al., 2020b) gēnu noteikšanu, aptver 72,6% patentu no 241, kuros lietoti visbiežāk mikrobiālajā fermentācijā izmantotie mikroorganismi un pārstāvēti ES komerciāli aktuālie fermentācijas produkti. Vēl viens no potenciālajiem mērķiem ĢMM klātbūtnes noteikšanai ir tetraciklīna rezistences (TetR) gēns *tetL*, kas kopā ar *cat* un *aadD* aptvertu 88% analizēto patentu. Gēna izcelsme saistāma ar pLS1 plazmīdu un tā sekvenca atbilst GenBank numuram D00946.1.

Līdzīgi kā divu iepriekš aprakstīto metožu izstrādes procesā, vispirms tika izvērtēta *tetL* gēna sastopamība savvaļas tipa mikroorganismos. Veicot *in silico* salīdzinājumu ar NCBI references sekvenču datubāzē atrodamajām sekvencēm, tika identificētas nedaudzas sugas, kurās šis gēns ir atrodams, galvenokārt no *Enterococcus* un *Staphylococcus* ģintīm. No visām sugām, kas uzskaitītas EPNI sarakstā ar mikroorganismiem, kas tiek izmantoti pārtikas un barības piedevu, enzīmu un aromatizētāju ražošanā (EFSA, 2017), trīs (*Bacillus cereus*, *Enterococcus faecium*, *Klebsiella pneumonia*) tika identificētas kā potenciālas dabīgas *tetL* gēna nesējas. Ņemot vērā tetraciklīna rezistences aktualitāti, ir svarīgi spēt detektēt *tetL* klātbūtni, neskatoties uz tā dabīgo vai mākslīgo izcelsmi.

Metodes izstrādē tika izmantots 91 savvaļas tipa mikroorganismu celms (baktērijas un sēnes), kas pārstāv lielāko daļu EPNI sarakstā minēto pārtikas un barības piedevu, enzīmu un aromatizētāju ražošanā izmantoto mikroorganismu (EFSA, 2020). Analīzē papildus tika iekļauta arī suga *Bacillus velezensis*, ņemot vērā ziņojumu RASFF2019.3332. Kā pozitīvās kontroles, kas satur *tetL* gēnu, tika izmantotas RASFF2014.1249 ziņojumā minētais ĢM *B. subtilis* celms (Barbau-Piednoir et al., 2015a) un pLS1 plazmīda.

Tāpat kā uz *cat* un *aadD* gēniem balstītajās metodēs, arī *tetL* metodes pirmajā posmā tiek novērtēta gēna potenciālā klātbūtne ar rLPKĀR, amplificējot 114 bp garu gēna fragmentu (Turgeon et al., 2008). Pozitīva rezultāta gadījumā tiek novērtēta pilna garuma *tetL* klātbūtne, ar konvencionālo PCR amplificējot un sekvenējot 1053 bp garu gēna fragmentu, un novērtējot sekvences identitāti. Abos metodes posmos izmantoto praimeru un zondes sekvences norādītas 7. tabulā.

Praimeru un zondes sekvenču *tetL* gēna fragmentu amplifikācijai

Praimera nosaukums	Sekvence
tetL-F	ATAAACGAGCCATAATAAGTAAGGAAAAG
tetL-R	TCAATTAGGCATCAAAAGGTTACTCC
tetL-P	FAM-CCAACAAACCCAATTACCGACCCGAAACAA-TAMRA
tetL-F1	TTGCAATACCTGTTCCCTCTG
tetL-R1	ACTGGGTGAACACAGCCTTT

Metodes specifiskums tika novērtēts gan rIPK, gan konvencionālās PCR līmenī. Pirmajā metodes solī abas pozitīvās kontroles uzrādīja pozitīvu rIPK rezultātu, kamēr visu pārējo savvaļas tipa mikroorganismu kultūru reakcijas bija negatīvas, ieskaitot *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecium* un *Klebsiella pneumonia*, kas dabiski varētu saturēt *tetL* gēnu. Kopumā tas norāda uz augstu rIPK specifiskumu. Otrajā posmā ar konvencionālo PCR abas pozitīvās kontroles deva atbilstoša garuma fragmentu ar 100% sekvenču identitāti. Tāpat sagaidāmā garuma PCR fragments tika iegūts arī no vairākiem *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* un *B. velezensis* celmiem, kuru rIPK reakcijas bija negatīvas. Tomēr no šīm kultūrām iegūtās sekvenču līdzība ar sagaidāmo *tetL* sekvenču Nr. D00946.1 bija tikai 74,4% līdz 76,9%. Līdz ar to konvencionālā PCR ir pietiekami specifiska, taču jāņem vērā, ka ar iegūtos *tetL* fragmentus nepieciešams raksturot sekvenču līmenī. Jāņem arī vērā, ka metodes dizains paredz konvencionālo PCR veikt tikai pozitīva rIPK rezultāta gadījumā, kas šajā gadījumā dotu 100% specifisku rezultātu.

Novērtējot metodes jutību, tika izmantotas dažādi neautorizētā *B. subtilis* kultūras DNS atšķaidījumi ar genoma kopiju skaitu no 55 000 līdz 0. Metodes pirmā posma rIPK detekcijas limits (LOD) 95% tika novērtēts kā 16,7 genoma kopijas, kas atbilst $C_q \approx 35$, bet otrā posma konvencionālās PCR LOD95% sasniedz 30,8 genoma kopijas.

Metodes praktiskā pielietojuma novērtēšanai tika izmantoti trīs ES tirgū sastopami barības un trīs pārtikas mikrobiālās fermentācijas produkti. No trim barības paraugiem, divos jau iepriekš bija konstatēts neautorizētais *B. subtilis* celms 2014-3557 vai tā ģenētiskais materiāls (RASFF2014.1249, RASFF2019.3216), kurā iepriekš jau bija demonstrēta vairāku AMR gēnu klātbūtne. Pārtikas paraugi ietvēra α -amilāzi, fitāzi un neitrālo proteāzi, no kuriem pēdējā iepriekš tika atrasta dzīvotspējīga *B. velezensis* kultūra (RASFF2019.3332) ar kanamicīna rezistences (KanR) gēnu *aadD* (Fraiture et al., 2020a).

Analizējot visus sešus komerciālos paraugus, barības paraugu gadījumā rezultāti sakrita ar iepriekš iegūtajiem – pozitīvs rezultāts tika iegūts abiem paraugiem, kuri jau iepriekš bija uzrādījuši ĢMM klātbūtni, bet trešais paraugs bija negatīvs. Pārtikas paraugu gadījumā pozitīvs rezultāts tika iegūts no abiem paraugiem, kuros līdz tam ĢMM nebija konstatēts, savukārt trešais paraugs ar ĢMM piemaisījumu, kas satur KanR gēnu, bija negatīvs. Visi četri pozitīvie paraugi uzrādīja dažādus kontaminācijas līmeņus ar C_q vērtībām no 18,0 līdz 39,1, turklāt diviem paraugiem (viens pārtikas un viens barības paraugs) uzrādītās C_q vērtības bija zem LOD ≈ 35 . Paraugiem, kuri bija uzrādījuši C_q vērtības zem LOD, otrajā metodes posmā netika iegūti pilna garuma PCR fragmenti, kā tas bija sagaidāms. Abiem pārtikas un barības paraugiem, kuru C_q vērtības bija virs LOD, tika iegūts 1053 bp garš PCR fragments, kuru sekvenču atbilde sagaidāmajai *tetL* gēna sekvenču Nr. D00946.1. Tādējādi ar šo metodi tika demonstrēta pilna garuma *tetL* gēna klātbūtne, norādot uz potenciālo neautorizēta ĢMM vai tā ģenētiskā materiāla piesārņojumu.

Secinājumi

Trīs PCR metodes, kas balstītas uz AMR gēniem *cat*, *aadD* un *tetL*, kopumā aptver gandrīz 90% potenciālo ĢMM komerciālajos mikrobiālās fermentācijas produktos. Līdz ar to uz šīm metodēm balstīta testēšanas stratēģija varētu būt izmantojama skrīningam, lai noteiktu AMR gēnu kontamināciju, kas varētu liecināt par ĢMM klātbūtni.

- AMR gēnu noteikšana ar pilna genoma sekvenēšanu

Pieaugot ĢMM piesārņojuma aktualitātei pārtikas un barības produktos, aizvien lielāka kļūst nepieciešamība pēc visaptverošām testēšanas metodēm. Šobrīd iespējas aizvien ir ierobežotas, gan ņemot vērā ĢMM dokumentāciju konfidencialitāti, gan to, ka atšķirībā no ĢMO, ražotājiem, kuri izmanto ĢMM, pašreizējie noteikumi neprasa piedāvāt metodi attiecīgā ĢM notikuma detektēšanai. Iepriekšējās nodaļās aprakstītas vairākas uz PCR un Sangera sekvenēšanu balstītas metodes, kas izmantojamas konkrēta jau 2014. gadā identificēta ĢM *B. subtilis* celma 2014-3557 detektēšanai, kā arī uz 16S rRNS vai AMR gēniem balstītas primārā skrīninga stratēģijas, plašāka ĢMM klāsta noteikšanai. Tomēr šīs metodes nespēj aptvert un raksturot visus ĢMM, kas potenciāli produktos varētu būt sastopami. Lai raksturotu šādus nezināmus ĢMM, nepieciešams veikt lielapjoma paralēlo sekvenēšanu, kas spēj nolasīt visu vai gandrīz visu analizējamā mikroorganisma genomu.

1.1.5. Neautorizētu ģenētiski modificētu baktēriju identificēšana pārtikas enzīmos ar pilna genoma sekvenēšanu (pēc Fraiture et al., 2020d)

2019. gadā ES tirgū tika konstatēts ĢMM piemaisījums pārtikā izmantojamā neitrālajā proteāzē maltodekstrīna un kukurūzas cietes nesējā (Pureferm, sērijas numurs TAP25114738) (RASFF 2019.3332). Sākotnēji paraugā tika atrasta pilna garuma AMR gēni, kā arī no tā tika izolēta dzīvotspējīga baktēriju kultūra, kas radīja nopietnas aizdomas par ĢMM kontamināciju. Lai to pierādītu, tika veikta iegūtā izolāta pilna genoma sekvenēšana apvienojumā ar *de novo* sekvenču savākšanas (angļu val. *assembly*) analīzi.

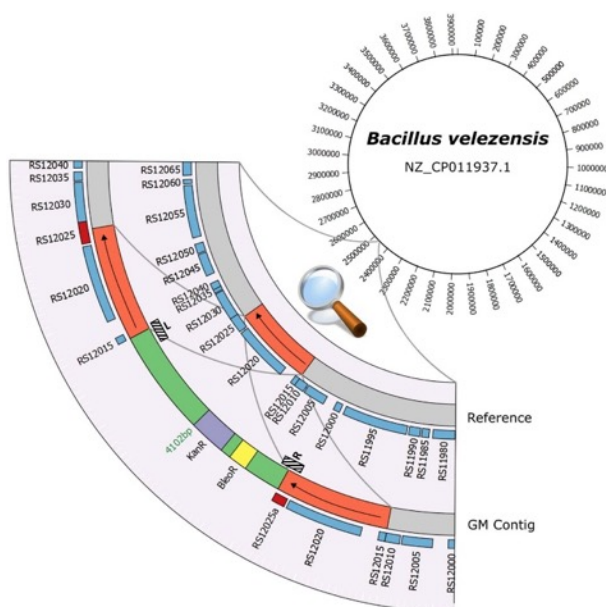
Vispirms no pārtikas enzīma matricas tika izolēta DNS, kas tika analizēta ar Decker et al. (2020) aprakstītajām metodēm, kas balstās uz PCR un 16S rRNS rajona sekvenēšanu. Iegūtie rezultāti uzrādīja *Bacillus* ģints ģenētiskā materiāla klātbūtni produktā. Papildus tika apstiprināta arī AMR gēna *aadD* klātbūtne (Fraiture et al., 2020b). Paralēli tika iegūta baktēriju kultūra, kas tika analizēta ar tām pašām metodēm, un tika iegūti identiski rezultāti.

Lai pierādītu, ka izolētā kultūra ir ĢMM, tika veikta iegūtās baktēriju kultūras pilna genoma sekvenēšana ar Illumina MiSeq sistēmu, izmantojot Nextera XT DNS bibliotēku sagatavošanas kitu. Nezināmā ĢMM analīzei tika izvēlēta *de novo* genoma konstruēšana, nevis biežāk izplatītā un relatīvi vienkāršākā sekvenču nolasījumu kartēšanas (angļu val. *read-mapping*) analīze. Šajā gadījumā *de novo* metodei ir vairākas priekšrocības. Pirmkārt, nav nepieciešama references sekvenču, kas neeksistē, nav pieejama, vai var būt grūti identificējama. Otrkārt, šāda pieeja ļauj labāk genomā identificēt mākslīgi ieviestus sekvenču elementus un to robežas, kā tas ir sagaidāms ĢMM gadījumā.

Rezultātā tika ģenerēti 714 637 250 bp gari sekvenču nolasījumu pāri (angļu val. *paired-end*), no kuriem pēc kvalitātes sliekšņa piemērošanas genoma *de novo* konstruēšanai tika izmantoti 589 817 nolasījumi. No tiem tika ģenerētas 430 pārklājošās sekvenču (angļu val. *contigs*), kas atbilda *Bacillus velezensis* sekvenču ar GenBank numuru NZ_CP011937.1.

Interesanti, ka iegūtais rezultāts neatbilda sagaidāmajam, jo kā produktā esošās proteāzes producents bija norādīta cita *Bacillus* suga – *B. subtilis*.

Lai noteikto transgēno sekvenču rajonu, konstruētajā genomā tika identificēta AMR gēna *aadD* pozīcija un padziļināti analizētas tai blakus esošās (angļu val. *flanking*) sekvenču, salīdzinot ar *B. velezensis* references sekveni NZ_CP011937.1. Iegūtā izolāta genomā tika identificēta 9141 bp gara insertēta sekvenču, kas saturēja duplicētu references genoma fragmentu ar proteāzes gēnu un fragmentu no acetiltransferāzes gēna, kā mērķis ir bijis paaugstināt proteāzes produkciju. Starp duplicētajām gēnu sekvencēm tika atrasta AMR gēnus *aadD* un bleomicīna rezistenci (BleoR) kodējošā *ble* gēnu saturoša vektora pUB110 (GenBank Nr. M19465.1) sekvenču (8. attēls). Inserta un vektora sekvenču robežas tika apstiprinātas ar Sangera sekvenēšanu. Kopumā iegūtie rezultāti ļāva demonstrēt ĢMM klātbūtni komerciālajā proteāzes produktā un šo informāciju nodot Beļģijas federālajai pārtikas aprīes drošības aģentūrai (*Belgian Federal Agency for the Safety of the Food Chain*), kas rezultējās ziņojumā RASFF 2019.3332.



8. attēls. Transgēnās insercijas shematiskais attēlojums. Zaļš – vektors pUB110 ar *aadD* (violet – KanR) un *ble* (dzeltens – BleoR) gēni; zils – references genoma gēni; oranžs – proteāzes gēns un acetiltransferāzes gēna fragments (sarkans); melnbalts svītrojums – reģioni, uz kuriem mērķētas notikuma specifiskās rĻPĶR metodes (pēc Fraiture et al., 2020d).

Balstoties uz iegūto ĢM *B. velezensis* sekveni, tika izveidotas divas uz rĻPĶR balstītas notikuma specifiskas metodes. Praimeri un zondes tika mērķēti uz abos pUB110 vektora galos (labo un kreiso) esošajām sekvenču robežām (8. attēls), sekvenču norādītas 8. tabulā. Uz kreiso sekvenču robežu mērķētā metode amplificē 94 bp garu fragmentu, uz labo – 115 bp garu fragmentu.

Praimeru un zondes sekvenču ĢM *B. velezensis* RASFF 2019.3332 notikuma specifiskajām metodēm

Praimera nosaukums	Sekvence
Left_junction-F	CGAGAATGCAGCTGAAACAG
Left_junction-R	CATATGCTCGGGGAATTTATCT
Left_junction-P	FAM-GGACGGACAGATCAAGAACTGTTATGG-TAMRA
Right_junction-F	GAAAAACGAGGAAAGATGCTG
Right_junction-R	ACGGTTTTCCGTTTGAAGG
Right_junction-P	FAM-GAGCAACTTCAGTTTTCATTTGGAATGG-TAMRA

Lai novērtētu abu rLPKR metožu specifiskumu, tika izmantoti 85 savvaļas tipa mikroorganismu celmi (baktērijas un sēnes) no dažādām kolekcijām, kas pārstāv lielāko daļu EPNI sarakstā minēto pārtikas un barības piedevu, enzīmu un aromatizētāju ražošanā izmantoto mikroorganismu (EFSA, 2017). Analīzē kā negatīvās kontroles tika iekļauti arī seši savvaļas tipa *B. velezensis* celmi un vitamīnu B2 kā barības piedevu producējošā ĢM *B. subtilis* kultūra 2014-3557, kukurūzas (*Zea mays*) DNS un cilvēka DNS. Kā pozitīvā kontrole tika izmantota DNS no ĢM *B. velezensis* celma (RASFF 2019.3332). Ar abām rLPKR metodēm pozitīvs rezultāts tika iegūts tikai no pozitīvās kontroles, kas norāda uz augstu metodes specifiskumu.

Lai novērtētu metodes jutību, tika izmantoti dažādi ĢM *B. velezensis* celma DNS atšķaidījumi ar pilna genoma kopiju skaitu no 6×10^6 līdz 0. Abu metožu gadījumā pozitīvs signāls tika iegūts līdz pat vienai genoma kopijai (Cq 37,9 un 37,1), demonstrējot augstu metodes jutību.

Metodes pielietojamība tika pārbaudīta, izmantojot DNS no oriģinālā komerciālā parauga, kas saturēja ar ĢM *B. velezensis* celmu. Kā negatīvā kontrole tika izmantots komerciālais vitamīna B2 kā barības piedevas produkts, kas saturēja ĢM *B. subtilis* celmu 2014-3557. Kā sagaidāms, abas metodes uzrādīja pozitīvu rezultātu pirmajam paraugam un negatīvu otrajam paraugam.

Secinājumi

Kopumā abas notikuma specifiskās metodes ir uzrādījušas labus veiktspējas parametrus. Lai metožu lietošana būtu ērtāka, pēc atbilstošas optimizācijas un validācijas abas metodes varētu apvienot vienā dubleksa reakcijā. Iegūtie genoma sekvenēšanas rezultāti tika izmantoti, informējot oficiālās ĢMO uzraugošās iestādes.

1.1.6. Ģenētiski modificētas *Bacillus* ģints baktēriju plazmīdu antimikrobiālās rezistences gēnu raksturošana, kombinējot īsus un garus sekvenču nolasījumus (pēc Berbers et al., 2020)

Lielapjoma paralēlā sekvenēšana var sniegt visizsmēļošāko informāciju par potenciālā ĢM organisma genoma sekvenci, tajā skaitā tajā atrodamajiem AMR gēniem. Pašlaik izplatītākā lielapjoma paralēlās sekvenēšanas pieeja balstās uz īsu – apmēram 150 bp garu sekvenču nolasījumu iegūšanu, kas pēc tam ar bioinformātikas rīkiem tiek apvienoti garākās genoma sekvencēs. Pieredze rāda, ka šī pieeja var nebūt tādu sekvenču analīzei, kurā ir daudz sekvenču atkārtojumu, kā tas var būt ĢMM AMR gēnu gadījumā, kuri turklāt bieži ir lokalizēti plazmīdās. Eksistē sekvenēšanas metodes (piemēram, MinION (Oxford Nanopore

Technology) un PacBio), ar kurām iespējams iegūt ievērojami garākus nolasījumus, tādējādi ļaujot precīzās nolasīt sekvences ar identiskiem vai ļoti līdzīgiem fragmentu atkārtojumiem. Tomēr šī tehnoloģija aizvien ir diezgan neprecīza, tāpēc, lai iegūtu viskvalitatīvāko sekvenču informāciju, šo metodi varētu apvienot ar daudz precīzāko īso nolasījumu sekvenēšanas metodi, tādējādi no abām metodēm kopā iegūstot viskvalitatīvāko analizējamā organisma genoma sekveni, ieskaitot precīzu informāciju par AMR gēnu lokalizāciju.

Lai noskaidrotu kombinētās īso un garo sekvenču nolasījumu metodes priekšrocības, tika izmantots 2014. gadā identificētais (RASFF2014.1249) B2 vitamīnu producējošais *GM B. subtilis* celms 2014-3557, kuram jau eksistē genoma references sekvenču. Sākotnēji tā tika iegūta ar Illymina HiSeq2500 tehnoloģiju, veidojot 125 bp garus sekvenču nolasījumus (Barbau-Piednoir et al., 2015a, 2015b). Vēlāk sekvenču tika iegūta atkārtoti vairākās laboratorijās ar ar Illumina MiSeq tehnoloģiju no 150 bp gariem nolasījumiem, Illumina HiSeq no 50 bp nolasījumiem un Roche GS junior System no 400 līdz 600 bp gariem nolasījumiem, kas ļāva detalizēti raksturot četras plazmīdas ar AMR gēniem (Paracchini et al., 2017). Tomēr ne visās laboratorijās izdevās apstiprināt visu četru plazmīdu klātbūtni, kā arī kopumā neizdevās apstiprināt GMM izstrādātāja apgalvojumu, ka pUC19 plazmīdas ir integrētas hromosomā. Iespējams šīs nesakritības skaidrojamas ar īso nolasījumu sekvenēšanas metodes trūkumiem, precīzas sekvenču konstruēšanā atkārtoto fragmentu gadījumā. Lai aizpildītu trūkstošos sekvenču rajonus starp atkārtojumiem, pētījuma autori izmantoja hibrīdu sekvenču savākšanas metodi, kombinējot garos sekvenču nolasījumus, kas iegūti ar MinION un PacBio tehnoloģijām, ar īsajiem nolasījumiem, kas iegūti ar MiSeq tehnoloģiju.

Izmantojot MiSeq un MinION nolasījumu pārus, tika *de novo* konstruēta *GM B. subtilis* celma 2014-3557 sekvenču, kas sastāvēja no divām aplveida sekvenču – nr. 1 hromosomas (4 279 307 bp) un nr. 2 plazmīdas pGMrib (38 647 bp). Salīdzinot ar NCBI nukleotīdu datubāzē esošajām sekvenču, 1. sekvenču visaugstāko līdzību uzrādīja ar *B. subtilis* 168 genoma sekveni (NZ_CP010052.1) un 2. sekvenču ar iepriekš identificēto pGMBsub04 (LT622643.1) (Paracchini et al., 2017).

Salīdzinot *B. subtilis* 168 un jauno celma 2014-3557 sekveni, pēdējā tika atrastas 2 insercijas, 5 delēcijas, kā arī 520 viena nukleotīda polimorfismus:

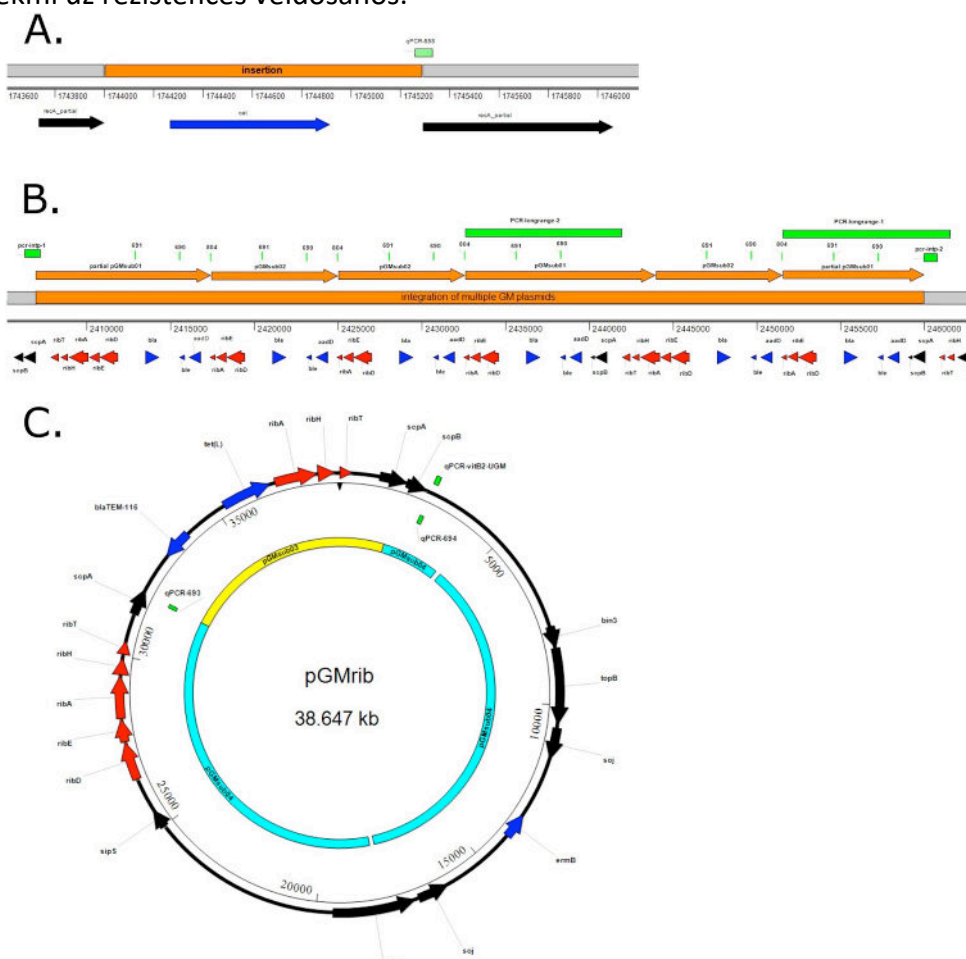
- 1744001. pozīcijā *recA* gēnā atrodas 1288 bp gara insercija – pilna garuma *cat* gēns no plazmīdas pC194 (9. attēls, A);
- 2406920. pozīcijā *scpA* gēnā atrodas 53 kb gara insercija, kas satur vairākas kopijas pilna garuma ribDEAHT operona, daļēja ribDEA operona (abi operoni nav raksturīgi *B. subtilis* un uzrāda augstāko līdzību *B. amyloliquefaciens* operonu sekvenču), kā arī vairākas kopijas beta-laktamāžu un kanamicīna rezistences gēnu un bleomicīna rezistences gēnu (9. attēls, B). Pozīcijās 2406920 – 2459995 tika atrasti vairāki atkārtojumi sekvenču, kas iepriekš bija raksturotas kā plazmīdas (Paracchini et al., 2017): trīs kopijas pGMBsub02 (7581 bp), viena kopija pGMBsub01 (11 378 bp) un divas daļējas sekvenču pGMBsub01 (10 492 bp un 8 467 bp). Tādējādi saskaņā ar jauno sekveni, pGMBsub01 un pGMBsub02 sekvenču ir nevis atsevišķas plazmīdas, bet gan hromosomā integrētas sekvenču, kas satur pilnus vai daļējus rib operonus no *B. amyloliquefaciens* (CP041693.1), pUC19 (M77789.2) un pUB110 (M19465.1);
- 529 007. pozīcijā ir 20 525 bp delēcija, kas ietver vairākus gēnus (*ICEBs1*, *immA*, *immR*, *xis*, *nick*, *rapI*, u.c.);
- 2 461 930. pozīcijā ir 8460 bp delēcija, kas ietver B2 vitamīna sintēzē iesaistītus gēnus, inaktivējot *B. subtilis* dabisko B2 vitamīna produkciju;
- 3 261 217. pozīcijā ir 200 bp delēcija;

- 3 837 414. pozīcijā ir 106 bp delēcija, kas ietver *rpoE* gēnu;
- 3 921 625. pozīcijā ir 46 bp delēcija, kas ietver *ywdH* gēnu.

Plazmīda pGMrib satur pilnu ribDEAHT operonu un daļēju ribAHT operonu, kā arī tādus pašus tiem blakus esošos gēnus kā *B. subtilis* 168 hromosomā. Tāpat plazmīdā atrodas *bla* gēns no pUC19, *tetL* no pLS1 un *ermB* no pSM19035 plazmīdas (9. attēls, C).

Lai precīzāk noteiktu AMR gēnu klātbūtni, tika izmantots bioinformātikas rīks ResFinder (Zankari et al., 2012). Hromosomā tika atrasti vairāki AMR gēni ar dažādu kopiju skaitu (6 – *aadD*, 1 – *aadK*, 6 – *bla-TEM-116*, 1 – *mphK*, 1 – *cat*, 1 – *tetL*). Plazmīdā tika atrasta 1 kopija *ermB* un 1 kopija *tetL* gēna. *B. subtilis* 168 genomā dabiski sastopami *mphK*, *aadK* un *tetL* gēni, tāpēc visi pārējie AMR gēni ir mākslīgi ievietoti.

Analizējot ĢM celma fenotipu, tika novērots, ka visi AMR gēni, izņemot *blaTEM-116* arī praktiski nodrošināja rezistences īpašības pret attiecīgajām antibiotikām, tajā skaitā kritiski nozīmīgo eritromicīnu, kanamicīnu un streptomicīnu, kā arī hloramfenikolu, klindamicīnu un tetraciklīnu, kam ir būtiska loma medicīnā. Būtiski, ka tetraciklīna un eritromicīna gēni ir lokalizēti ārpus hromosomas plazmīdā, kas paaugstina to izplatības risku. Jaunā, precīzākā ĢM *B. subtilis* genoma sekvence ļauj izskaidrot arī vēl citas ar AMR saistītas īpašības, piemēram, mutāciju ietekmi uz rezistences veidošanos.



9. attēls. ĢM *B. subtilis* celma 2014-3557 genoma raksturojums. A – *cat* gēna insercijas pozīcija *recA* gēnā; B - pGMsub01 un pGMsub02 sekvenču integrācija hromosomā, un apstiprinošā konvencionālā PCR amplikonu pozīcijas; C – plazmīda pGMrib (sarkans – gēni, kas saistīti ar B2 vitamīna sintēzi, zils – AMR gēni, melns – pārējie gēni; zaļš – rIPQR amplikoni, oranžs – plazmīdu sekvences) (pēc Berbers et al., 2020).

Tā kā ar jauniegūtā ĢM *B. subtilis* 2014-3557 sekvenču bija atšķirīga no iepriekš publicētās, tika veikta papildus analīzes soļi, lai apstiprinātu iegūtos rezultātus. Pirmkārt, kultūra tika papildus sekvenēta ar vēl vienu – garo nolasījumu metodi PacBio. Interesanti, ka ar MinION iegūtā sekvenču bija precīzāka un ar mazāk pārtraukumiem, kas visticamāk skaidrojams ar to, ka ar MinION tika iegūti garāki nolasījumi nekā ar PacBio (attiecīgi 7731 bp un 4347 bp). Ar visām trim sekvenēšanas tehnoloģijām iegūtie nolasījumi apstiprināja 53 kb inserciju, MinION uzrādot visaugstāko nolasīšanas dziļumu (74x).

Otrkārt, tika pārbaudīta plazmīdu sekvenču integrācija genomā, izmantojot iepriekš izstrādātos rLPK praimerus un zondes, kas mērķēti uz plazmīdas pGMBsub02 (PCR-804) un *cat* gēna (marķieris 558) sekvenču (Paracchini et al., 2017). Rezultātu Cq vērtības PCR-804 un marķierim 558 atšķīrās par 1,89, kas teorētiski atbilst apmēram 4x kopiju skaita atšķirībai. Tas atbilda teorētiski aprēķinātajai vērtībai gadījumā, ja plazmīda būtu integrēta genomā.

Treškārt, plazmīdu sekvenču integrācija un atkārtotās sekvenču hromosomā tika apstiprināta kopumā ar četrām konvencionālās PCR reakcijām (9. attēls, B), kurām tika izstrādāti jauni praimeri. Visas četras reakcijas deva sagaidāmā garuma produktus ĢM *B. subtilis* 2014-3557 paraugā un bija negatīvas *B. subtilis* references celmam 168. Visbeidzot tika izveidoti praimeri PCR produktam, kas atbilstu abiem 53 kb insercijas 5' un 3' galiem, un būtu konstatējams tikai gadījumā, kad insercijas nebūtu, jo pretējā gadījumā produkts teorētiski pārsniegtu 53 kb. Kā sagaidāms, šī PCR bija pozitīva tikai *B. subtilis* references celmam 168.

Secinājumi

Kombinētā īso un garo nolasījumu lielapjoma paralēlās sekvenēšanas metodika ir piemērota ĢMM pilna genoma precīzai raksturošanai gadījumā, ja no produkta ir izdevies iegūt dzīvotspējīgu organisma kultūru. Pēc eksperimentālas validācijas tā potenciāli būtu pielietojama arī gadījumos, kad no produkta nav izdevies iegūt izolātu. Metodika ir piemērota, analizējot sekvenču ar atkārtojumiem, kas ir īpaši aktuāli AMR gēnu gadījumā, un iegūtā precīzā informācija par AMR gēnu sastāvu un lokalizāciju ĢMM genomā ļauj kompetentajām iestādēm labāk izvērtēt potenciālos riskus. Efektīvākā un lētāka pieeja šādas metodikas realizācijā būtu vispirms sekvenēšanu veikt ar īso nolasījumu metodi MiSeq, un iegūto sekvenču salīdzinot ar esošajām ĢMM references sekvenču. Konstatējot daudz nesakrītību, jāveic garo nolasījumu sekvenēšana.

1.2. Genomiski rediģēti kultūraugi un citi organismi

1.2.1. Eiropas Savienības Komisijas pētījums un saistītie pētījumi

2021. gada 29. aprīlī Eiropas Savienības Padome publicēja Komisijas pētījumu "Pētījums par jaunu genomikas paņēmieni statusu Savienības tiesībās un saistībā ar Tiesas spriedumu lietā C-528/16"⁴. Šajā pētījumā "jauni genomikas paņēmieni" (JGP) definēti kā paņēmieni, kas spēj mainīt organisma ģenētisko materiālu un kas radušies vai izstrādāti pēc 2001. gada, kad tika pieņemti spēkā esošie tiesību akti par ģenētiski modificētiem organismiem (ĢMO). Pētījums apliecināja, ka uz organismiem, kas iegūti ar JGP, attiecas ĢMO tiesību akti, bet ir nepieciešams nepieciešamība izstrādāt JGP specifiskas riska novērtēšanas procedūras.

⁴ https://ec.europa.eu/food/plants/genetically-modified-organisms/new-techniques-biotechnology/ec-study-new-genomic-techniques_en

Pētījumā tiek diskutēts arī par šādu organismu detekcijas problēmām. Ir pieejams arī pētījuma kopsavilkuma oficiālais tulkojums latviešu valodā.

2021. gada 19. aprīlī Eiropas Komisijas Apvienotais zinātnes centrs (Joint Research Centre) publicēja pētījumu “Current and future market applications of New Genomic Techniques”⁵. Šajā pētījumā JGP tika iedalīti četrās grupās:

1) paņēmieni, kas rada DNS divpavedienu pārrāvumu, ieskaitot sait-specifiskās nukleāzes (SDN) paņēmienus, kas balstīti uz CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*), TALEN (*transcription activator-like effector nucleases*), ZFN (*zinc-finger nucleases*) un *homing* nukleāzēm. Šie paņēmieni var novest pie mutaģenēzes, bet dažos gadījumos arī pie cisģenēzes, intraģenēzes vai transģenēzes. Šīs grupas paņēmieni tiek izmantoti visbiežāk. Šie JGP paņēmieni sīkāk ir aprakstīti projekta 1. gada atskaitē.

2) paņēmieni, ar kuru palīdzību notiek vienpavediena pārrāvumi genomā, vai arī pārrāvums nenotiek vispār. Pie šīs grupas pieder tādi paņēmieni kā ODM (*oligonucleotide-directed mutagenesis*), bāzu rediģēšana (*base editing*) un prime rediģēšana (*prime editing*);

3) epiģenētikas paņēmieni, tādi kā RNS vadīta DNS metilēšana un CRISPR interference (CRISPRi);

4) paņēmieni, kas tiešā veidā iedarbojas uz RNS (RNS rediģēšana).

Šī pētījuma ietvaros ir izveidota datu bāze, kurā ir apkopota informācija par vairāk nekā 400 JGP, tai skaitā CRISPR, pielietojuma gadījumiem augiem. 9. tabulā ir dots apkopojums datu bāzē iekļautajiem **augiem**, bet 10. tabulā ir apkopotas īpašības, kas ir izveidotas augiem, izmantojot JGP. No 426 augiem, kas apkopoti šajā datu bāzē, tikai viens augs un no tā iegūtais produkts ir komercializēts – ASV kompānijas Calyxt eļļa ‘Calyno oil’, kas iegūta modificējot soju ar TALEN. Sešpadsmit datu bāzē esošie augi atbilst pirms komerciālai stadijai. Kā jaunas kultūraugu un īpašību kombinācijas, jāmin GABA tomāti, kas bagātināti ar uztura bagātinātāju gamma-aminosviestskābi, pret herbicīdiem toleranti baložu zirņi un lini, kā arī tīruma naudulī un idra ar modificētu eļļas saturu.

Pie R & D produktiem pieskaitāmi 117 uzlabotas pakāpes (*advanced-stage*) produkti un 292 agrīnās stadijas produkti, kas ietver plašu augu un īpašību spektru. Ir parādījušās jaunas iezīmes, kuras iepriekš nebija iegūtas, izmantojot noteiktas genomikas metodes. Piemēram, slimību rezistences pazīmes ir vērstas uz vairāku veidu patogēniem un kaitēkļiem. Abiotiskā stresa tolerance ir plaši izmantota, tostarp attiecībā uz izturību pret sausumu, sāļumu un karstumu. Pārveidotais sastāvs attiecas ne tikai uz cietes un eļļas saturu, bet ir radītas daudzas kultūras ar labākām uzturvērtības īpašībām (paaugstinātu šķiedrvielu vai vitamīnu saturu) vai samazinātu potenciāli kaitīgu savienojumu (toksīnu, alergēnu, akrilamīda utt.) vai lipekļa saturu. Vairākos gadījumos tiek strādāts pie tā, lai iegūtu lielāku un / vai stabilāku ražu (attiecībā uz augu ražošanu un / vai augļu vai graudu lielumu).

⁵ Current and future market applications of New Genomic Techniques <https://doi.org/10.2760/02472>

9.tabula

Kopsavilkums par augiem, kas identificēti ar JGP iegūto produktu datu bāzē

Augu grupas	Augi
Graudaugi	Kukurūza, kvieši, rīsi, mieži, sorgo, prosa
Lopbarība un zālāji	Lucerna, airene, klūdziņprosa, zaļā sarene (<i>Setaria viridis</i>)
Augļi	Āboli, banāni, apelsīni, zemenes, greipfrūti, vīnogas, kivi, melones, arbūzi, kauleņu augļi, avokado
Pākšaugi	Pupas, aunazirņi, zemesrieksti, zirņi, baložu zirņi
Elļas un šķiedru kultūras	Soja, rapsis, kokvilna, idra, lini, tīruma naudulis, saulespuķes, sinepes, zemenes
Dekoratīvie augi	Krizantēmas, pienenes, orhidejas, petūnijas, puansetijas, magones, ipomejas, torēnijas, puķu tabaka
Kultūraugi, no kuriem iegūst cukuru	Cukurbietes, cukurniedres
Koki	Papeles, skujkoki
Bumbuļi un sakņu dārzeņi	Kartupeļi, saldie kartupeļi, manioka, bietes
Dārzeņu kultūras	Tomāti, brokoļi, kāposti, gurķi, baklažāni, salāti, pipari, cigoriņi
Citi augi	Kakao, kafija, tabaka, salvija

10.tabula

Īpašību kategorijas, kas ir identificētas augiem, izmantojot JGP

Īpašību kategorija	Apraksts
Biotiskā stresa tolerance	Rezistence pret tādiem biotiskajiem stresoriem kā nematodes, sēnes, baktērijas, vīrusi un citi kaitēkļi, patogēni vai parazīti
Abiotiskā stresa tolerance	Rezistence pret tādiem abiotiskajiem stresoriem kā sausums, karstums, sāls, lietuss vai UV starojums
Herbicīdu tolerance	Tolerance pret dažāda veida herbicīdiem
Modificēta krāsa, smarža, garša	Modificēta krāsa, smarža vai garša
Modificēts sastāvs	Modificēts tādu vielu saturs kā ciete, elļa, olbaltumvielas, vitamīni, šķiedrvielas, toksiskas vielas, alergēni utt. pārtikas / barības kvalitātes uzlabošanai vai labākai rūpnieciskai izmantošanai (augļi bez sēklām)
Augu raža un struktūra	Ražas pieaugums (vai ražas stabilitāte) saistībā ar lielāku ziedu / sēklu / augļu skaitu, augļu lielumu / svaru vai fotosintēzes efektivitāti. Ietver citas izmaiņas augu struktūrā, piemēram, auga augstumu un formu, augļu formu un augšanas veidu
Uzglabāšanas īpašības	Glabāšanas laiks un uzglabāšanas apstākļu izturība (piemēram, uzglabāšana aukstumā), ieskaitot nenobrūnēšanu un samazinātu melno plankumu veidošanos
Citas īpašības	Pazīmes, kas nav klasificētas iepriekš minētajās kategorijās, ieskaitot rūpnieciski nozīmīgu vielu ražošanu, ziedēšanas laika izmaiņas agrotehniskiem mērķiem un slāpekļa izmantošanu
Selekcijas metodes	Reproduktīvās / ziedēšanas īpašības, tostarp sterilitātes izraisīšana, agra ziedēšanas un haploīdu paņēmieni

No **sēnēm** datu bāzē ir identificēts tikai viens JGP pielietojuma gadījums. Tā ir divsopru atmatene (*Agaricus bisporus*), kas ir izveidota Pensilvānijas Universitātē, izmantojot CRISPR/Cas9, lai deletētu gēnu, kas kodē polifenola oksidāzi, tādējādi iegūstot nebrūnēšanas īpašību. Ir ziņas par to, ka šīs sēnes ir apstiprinātas komercializēšanai ASV jau 2016. gadā.

Dzīvnieku sektorā ir konstatēti daudz mazāk JGP pielietojumu nekā augiem. JGP galvenokārt izmanto medicīniskiem pētījumiem dzīvnieku modeļos, piemēram, pelēs, pērtiķos, cūkās un žurkās, un pārtikas ieguvei, jo īpaši lauksaimniecības dzīvniekiem, piemēram, liellopiem, cūkām un vistām, kā arī dažādām zivīm (lasis, tilapija, tuncis un jūras plaudis). Kukaiņi (īpaši odi) un dažas invazīvas sugas ir uz JGP balstītu gēnu dziņu tehnoloģiju mērķis. Kopsavilkums par dzīvniekiem, kuriem tiek piemēroti JGP un kuri ir iekļauti datu bāzē, ir dots 11. tabulā, savukārt apraksts par īpašībām, kuras tiek piešķirtas dzīvniekiem izmantojot JGP, ir dots 9. tabulā. Pirms-komerciālā stadijā pašlaik ir četri dzīvnieki: Intrexon-AquaBounty ātri augošas tilapijas, pret cūku reproduktīvo un respiratoro sindromu rezistentas Genus cūkas (Lielbritānijā), Acceligen-Recombinetics bezragu liellopi un pret karstumu izturīgi liellopi (ASV). Attīstītā R & D kategorijā iekļauti 28 JGP pielietojumi dzīvniekiem, bet agrīnās R & D stadijās ir ziņas par 31 pielietojumu dzīvniekiem.

11.tabula

Kopsavilkums par dzīvniekiem, kuriem tiek piemēroti JGP un kuri ir iekļauti JRC izveidotajā datu bāzē

Organismu grupa	Sugas
Ūdens dzīvnieki	Lasis, tilapija, tuncis, karpas, sarkanie jūras plauži, fugu, koraļļi
Lauksaimniecības dzīvnieki	Liellopi, cūkas, vistas, aitas, zirgi, suņi
Grauzēji un primāti	Peles, žurkas, pērtiķi
Kukaiņi	Odi, mušas, kodes
Citi dzīvnieki	Niedru krupis, savvaļas kaķis

12.tabula

Kopsavilkums par īpašībām, kuras tiek piešķirtas dzīvniekiem izmantojot JGP

Īpašību kategorija	Apraksts
Biotiskā stresa tolerance	Rezistence pret tādiem biotiskajiem stresoriem kā baktērijas, vīrusi un citi patogēni
Uzlabots gaļas iznākums/kvalitāte	Ātrāka gaļas ieguve, augstāks gaļas iznākums, gaļas kvalitātes modifikācijas
Abiotiskā stresa tolerance	Rezistence pret tādiem abiotiskajiem stresoriem kā augsta vai zema temperatūra
Hipoalerģiskas īpašības	Hipoalerģiskas īpašības pārtikai, kas iegūta no dzīvniekiem
Reproduktīvās īpašības	Tostarp izmaiņas seksuālajās īpašībās, piemēram, sterilitāte vai vīriešu un sieviešu pēcnācēju attiecība
Citas īpašības	Pazīmes, kas nav klasificētas iepriekš minētajās kategorijās, tostarp ganāmpulku pārvaldība, samazināts toksīnu līmenis un uzvedības īpašību modificēšana
Gēnu dziņi	Gēnu dziņu tehnoloģija ģenētiskās modifikācijas nodošanai pēcnācējiem, parasti patogēnu pārnēsājošo kukaiņu likvidēšanai vai invazīvu sugu kontrolei

Īpašību kategorija	Apraksts
Cilvēku gēnu terapijas pielietojumiem	Dzīvnieki, kurus izmanto kā modeļus cilvēku slimību (īpaši vēža un ģenētisko slimību) gēnu terapijas izpētei vai izmanto orgānu ražošanai, kurus var izmantot transplantācijai cilvēka organismā

Saskaņā ar ekspertu sniegto informāciju, JGP **mikroorganismiem** jau tiek izmantoti komerciāli, lai biotehnoloģiski iegūtu industrijā nepieciešamas vielas. Šajā procesā JGP mikroorganismi tiek izmantoti kā bio-fabrikas, bet ne kā gala produkts. Šādos gadījumos tehnoloģiju attīstītāji izmanto gan klasiskos, gan jaunus genomikas paņēmienus, lai uzlabotu konkrēto mikroorganisma celmu, kuram parasti ir ilga un droša izmantošanas vēsture kā producentam. Šādā mikroorganismu celmu uzlabošanas kontekstā visbiežāk tiek izmantotas 1. grupas JGP metodes, galvenokārt tās, kas balstītas uz CRISPR. Mērķis ir izslēgt nevēlamus gēnus, piemēram, tādus gēnus, kas kodē toksīnus, antibiotiku rezistenci vai nevēlamus blakusproduktus.

Pirms komerciālās stadijas piemēri:

- 1) Ar CRISPR rediģēti mikroorganismi, kas producē enzīmus ūdeņraža peroksidāzes ieguvei no augu cukuriem (izstrādātājs – ASV kompānija Solugen);
- 2) Genomiski rediģēts maizes raugs *Saccharomyces cerevisiae* bioetanola ieguvei (apstiprināts Brazīlijas Nacionālajā biodrošības tehniskajā komisijā kā ne-ĢMO);
- 3) Genomiski rediģēta *Escherichia coli* salmonellozes infekcijas ierobežošanai, kas tiek pievienota notekūdeņiem (produkta nosaukums BiomElix Guided Biotic; apstiprināts Brazīlijas Nacionālajā biodrošības tehniskajā komisijā kā ne-ĢMO).

Attīstītās R & D kategorijas piemēri:

- 1) Ar CRISPR rediģētas mikroaļģes (*Nannochloropsis*) biodīzeļa ražošanai (izstrādātāji – ASV kompānijas Synthetic Genomics un ExxonMobil);
- 2) Ar CRISPR rediģēti raugi etanola ražošanai (izstrādātājs GlobalYeast JV Co Brasil);
- 3) Ar CRISPR rediģētas *E. coli* biodīzeļa ražošanai (izstrādātājs – Vašingtonas Universitāte).

JRC pētījumā tika identificēts tikai viens komercializēts mikroorganismu produkts, kura gala produkts ir paredzēts izplatīšanai vidē. Tas ir JGP pielietojums augsnes baktērijās, kuras sintezē slāpekli lauksaimniecības augšņu mēslošanai graudaugu ieguvei. Šī produkta nosaukums ir Pivot Bio PROVEN, un tās izstrādātājs ir ASV kompānija Pivot Bio. Produkts ir komercializēts ASV.

R & D kategorijā ir vēl citi pielietojuma piemēri augsnes baktērijās un probiotikās, kā arī ar CRISPR rediģētas endofītiskās sēnes *Epichloë coenophiala* izmantošana ganību zālei, lai ierobežotu melno graudu alkaloīdu veidošanos (*ergot alkaloids*), kas ir toksiski lauksaimniecības dzīvniekiem. Šī produkta izstrādātājs ir Kentuki Universitāte.

Zinātniskajās publikācijā ir aprakstīti vairāki veiksmīgi CRISPR tehnoloģijas pielietojumi raugu un sēņu genomiskai rediģēšanai ar mērķi iegūt labus noteiktu vielu producentus – *Pichia pastoris*, *Rhodospiridium toruloides*, *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Aspergillus niger*, *Fusarium fujikuroi* (Fatma et al., 2020). Kopumā CRISPR tehnoloģija jau ir pielietota vairāk nekā 40 sēņu un oomicēšu sugām (Schuster and Kahmann, 2019). Pašlaik ir pieejami CRISPR metodes uzlabojumi - bāzes redaktori (*base-editors*), CRISPR endonukleāzes varianti, kuriem trūkst endonukleāzes aktivitātes, bet kas satur gēnu inženierijas ceļā iegūtu enzīmātisku aktivitāti, kas modificē nukleotīdu bāzes DNS molekulā. Tā ir alternatīva stratēģija, ar kuras palīdzību var radīt mutācijas DNS molekulā.

Tāpat kā parastajā CRISPR tehnoloģijā, DNS modificējošo enzīmu aktivitāte ir mērķēta attiecībā uz specifisku sekvenci, izmantojot gRNS. Pirmās paaudzes bāzes redaktori neļauj ieviest mutāciju noteiktā bāzē, bet dezamināze, kas sapludināta ar Cas9 (inaktivēta DNS šķelšanai), ļauj mutāģenēt visas citidīna un adenīna bāzes diapazonā, kurā ferments sasniedz mērķa vietu, ko nosaka gRNS. Šāda veida bāzes redaktors jau ir izmantots, lai modificētu, piemēram, raugu *Y. lipolytica* (Schwartz et al., 2019; Bae et al., 2020;). Modernāka bāzes redaktoru metode ir Prime rediģēšana (Anzalone et al., 2019).

Konstatēt neautorizētu genomiski rediģētu mikroorganismu klātbūtni importētajos produktos ES tirgū varētu būt neiespējami. Jo īpaši tādus genomiski rediģētus mikroorganismus, kuru genomā ir veiktas tikai viena vai vairāku nukleotīdu izmaiņas, kuras nav atšķiramas no dabiski sastopamām mutācijām, un tās ir izveidotas ar paņēmienu, kuros netiek izmantoti selekcijas marķieri vai CRISPR komponenti. Šīs nelielās ģenētiskās izmaiņas var būt arī SDN-1 vai SDN-2 genoma rediģēšanas rezultāts. Bez iepriekšējām zināšanām par precīzām veiktajām izmaiņām mikroorganisma genomā būs grūti vai neiespējami izveidot un/vai izmantot uz PCR balstītas metodes vai DNS sekvencēšanu, lai apstiprinātu, ka šie mikroorganismi ir izveidoti ar genoma rediģēšanas metodēm.

2. Ekspozīcijas novērtējuma rezultāti

2.1. Pārtikas, dzīvnieku barības un to piedevu paraugu analīžu rezultāti

2.1.1. Ievads

Spānijas zinātnieku veiktā pētījumā ir apkopota informācija par to, ar kādu varbūtību oficiālajā kontrolē ir iespējams detektēt pārtikas un dzīvnieku barības paraugus, kuri ir neatbilstoši no ĢMO regulējuma viedokļa. Tie ir paraugi, kuri satur autorizētus ĢMO notikumus (angl. - *events*) virs 0,9% robežas pārtikai, barībai, bet tas nav norādīts to marķējumā, vai arī tie satur ES neautorizētus ĢMO notikumus virs 0,1% robežas. Pētījums aptvēra atsevišķu ES dalībvalstu oficiālos ziņojumus par laika periodu no 2000. līdz 2013. gadam. Tika konstatēts, ka varbūtība detektēt neatbilstošus paraugus variē atkarībā no valsts un gada. Daudzās valstīs šīs varbūtības attiecībā uz pārtikas paraugiem pēdējos pētījumā iekļautajos gados samazinājās, bet citās (Nīderlandē, Polijā, Portugālē, Rumānijā, Slovēnijā un Zviedrijā) tika novērota pretēja tendence. Varbūtība pārtvert neatbilstošus importētus pārtikas produktus virs 5% un 10% robežas Zviedrijā 2010. gadā bija 88,20% un 54,70 %, attiecīgi, bet daudzās valstīs lielākoties šis rādītājs pētījumā iekļautajā laika periodā bija 0%, izņemot atsevišķus gadus. Augstāka detekcijas varbūtība visās pētījumā iekļautajās valstīs tika konstatēta dzīvnieku barības paraugiem salīdzinājumā ar pārtikas paraugiem. Pētījuma autori secina, ka attiecībā uz pārtiku regulatorais ietvars nenodrošina patērētāju tiesības uz brīvu pārtikas izvēli un patērētāji visticamāk ir tikuši maldināti par to, vai pārtika un barība satur ĢMO (Areal and Riesgo, 2021).

Latvijā kopš 2017. gada tiek īstenots Nacionālās bioloģiskā drošuma sistēmas attīstības plāns (apstiprināts ar MK 2016. gada 27. aprīļa rīkojumu Nr. 271 2017.-2019. gadam un ar MK 2019. gada 22. oktobra rīkojumu Nr. 525 2020.-2026. gadam). Atbilstoši plānam BIOR katru gadu būtu jāveic laboratoriskie izmeklējumi 120 pārtikas produktiem iekšzemē un uz robežas un 20-22 dzīvnieku barības paraugiem iekšzemē un uz robežas, kā arī 40 sēklu un augu pavairojamā materiāla paraugiem. Tomēr saistībā ar laboratorisko izmeklējumu cenu pieaugumu, PVD nosūtīja uz izmeklējumiem mazāku skaitu pārtikas un barības paraugu. Piemēram, 2018. gadā ir noņemti astoņi dzīvnieku barības paraugi iekšzemē un četri paraugi uz robežas, kā arī 81 pārtikas paraugs iekšzemē un 10 paraugi uz robežas.

Situācija iepriekšējos gados ir aprakstīta Nacionālās bioloģiskā drošuma sistēmas attīstības plānā 2017.-2019. gadam: "No 2007. līdz 2009. gadam, īstenojot ĢMO uzraudzības programmu, Latvijā vidēji gadā tika noņemti 100 paraugu pārtikai un 15 paraugu dzīvnieku barībai. Katru gadu tika konstatēti 2-4 pārkāpumi saistībā ar neatbilstošu marķējumu. 2010. gadā paraugu izmeklējumu lielo izmaksu un nepietiekamā budžeta finansējuma dēļ ĢMO uzraudzības programma netika īstenota, tāpēc pārtikas un dzīvnieku barības paraugi saistībā ar šo programmu netika ņemti. 2011. gadā ir noņemti četri barības paraugi un konstatēta viena neatbilstība marķēšanas prasībām. 2012.-2014. gadā paraugu izmeklējumu lielo izmaksu un nepietiekamā budžeta finansējuma dēļ ĢMO uzraudzības programma netika īstenota, tāpēc pārtikas un dzīvnieku barības paraugi saistībā ar šo programmu netika ņemti. 2015. gadā PVD, īstenojot ĢMO uzraudzības programmu, bija ieplānojis noņemt 50 pārtikas un divus barības paraugu. Līdz 2015.gada decembrim ir noņemti 27 pārtikas paraugi (septiņi desu, pieci šokolādes, 10 graudaugu produktu, viens miltu un četri cīsiņu paraugi), un tajos ĢMO nav ticis konstatēts".

Paralēli paraugiem, kas tiek izmeklēti par valsts budžeta finansējumu, BIOR veic ĢMO kvalitatīvu un kvantitatīvu noteikšanu arī komerciāliem klientiem (maksas pakalpojums). Komerciālie klienti var būt arī no citām valstīm, ne tikai no Latvijas. 13. tabulā ir dots apkopojums par visiem analizētajiem paraugiem pēdējo 15 gadu laikā. Laboratorijā par pozitīvu uzskata ikvienu paraugu, kurā tiek konstatēts ĢMO piejaukums, bet tas ne vienmēr nozīmē, ka ir pārkāpums saistībā ar neatbilstošu marķējumu. To pēc laboratorijas rezultātu saņemšanas izvērtē parauga īpašnieks (PVD, komercclients). Tabulā redzams, ka divus gadus nav ticis konstatēts neviens ĢMO saturošs dzīvnieku barības paraugs (2010., 2016.), bet pārējos gados pozitīvo paraugu īpatsvars ir variējis robežās no 5,66 % līdz 83,33 %. Pārtikas paraugiem ĢMO saturoši paraugi nav konstatēti 7 gados apskatītajā laika periodā, bet pārējos gados šis rādītājs ir variējis no 1,79 % līdz 25,00 %.

13. tabula

Apkopojums par analizētajiem paraugiem pēdējo 15 gadu laikā Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskā institūta "BIOR" laboratorijā

Gads	Barības paraugu skaits (no tiem maksas)	Pozitīvo paraugu skaits (no tiem maksas)	%	Pārtikas paraugu skaits (no tiem maksas)	Pozitīvo paraugu skaits (no tiem maksas)	%	Sēklas, augu pavairojama is materiāls	Pozitīvo paraugu skaits	%
2006	11	6	54,55	103 (9)	11 (1)	10,68	-	-	-
2007	17	5	29,41	89 (0)	8 (0)	8,99	-	-	-
2008	18	7	38,89	0 (0)	-	-	-	-	-
2009	29	15	51,72	103 (0)	0 (0)	0,00	-	-	-
2010	8 (8)	0	0,00	4 (2)	1 (1)	25,00	-	-	-
2011	6	5	83,33	7(6)	0 (0)	0,00	-	-	-
2012	53	3	5,66	8 (7)	0 (0)	0,00	-	-	-
2013	8	3	37,50	4 (4)	1 (0)	25,00	-	-	-
2014	6	1	16,67	56 (10)	1 (1)	1,79	-	-	-
2015	3	1	33,33	60 (17)	3 (2)	5,00	-	-	-
2016	14	0	0,00	58 (12)	0 (0)	0,00	-	-	-
2017	13 (5) 99 projektā*	3 3	23,08 3,03	51 (16)	0 (2)	0,00	93*	2	2,15
2018	13 (1)	5	38,46	106 (12)	0 (2)	0,00	68* (t. sk. 40 petūniju sēklas un stādi)	0 6	0 15,00
2019	20 (5)	10 (3)	50,00	112 (15)	0 (0)	0,00	40	0	0,00
2020	22 (4)	9 (2)	40,91	103 (3)	6 (0)	5,83	40	0	0,00

*- projekts "Ģenētiski modificētu augu sēklu un pavairojamā materiāla iespējamo risku zinātniskā riska novērtēšana Latvijas teritorijā un risku vadības rekomendāciju izstrāde atbilstoši Latvijas agroekonomiskajiem apstākļiem" (2016-2018).

2.1.2. Analizētie paraugi un metodes

Ekspozīcijas novērtējumā iekļautie paraugi

Šī projekta ietvaros dažādās mazumtirdzniecības vietās ekspozīcijas novērtējumam tika iegādāti kopumā 90 paraugi. Viens paraugs tika saņemts no PVD Robežkontroles departamenta. Kopējais paraugu skaits – 91. Četrdesmit trīs paraugi tika iegādāti lielākajās

Latvijas lielveikalu tirdzniecības ķēdēs (Rimi, Maxima, Mego) un to interneta veikalos, 24 paraugi tika iegādāti tādās interneta tirdzniecības vietās kā Nuko.lv un 220.lv, četri paraugi tika nopirkti Indijas un Vjetnamas preču veikalos Rīgā, bet pārējie paraugi tika iegādāti dažādās tirdzniecības vietās gan klātienē, gan pasūtot šo kompāniju interneta vietnēs (Cesars, Dabas Stacija, bariba.lv, Gemoss, SIA Barfus, veikals Majai). Tikai viena produkta marķējumā bija norādīts, ka tas satur ģenētiski modificētas pārtikas izejvielas (oriģināli - *contains bioengineered food ingredients*). Šī parauga izcelsmes valsts bija ASV.

Pārtikas un dzīvnieku barības paraugu izvēles kritēriji:

- Izcelsmes valsts ārpus Eiropas Savienības (primāri, bet ne izslēdzošs kritērijs), jo ĢM kultūraugi pārsvarā tiek audzēti ārpus Eiropas Savienības (Kleter et al., 2018);
- Sastāvā ir soja, kukurūza, rapsis, rīsi, kvieši, tomāti, cukurbietes (cukurs), Atlantijas lasis.

ES ģenētiski modificētais AquAdvantage™ lasis nav autorizēts. Tas ir apstiprināts izmantošanai pārtikā ASV un Kanādā⁶. Lasi saturoši produkti projekta ietvaros tika iegādāti ar mērķi pārbaudīt, vai tie nesatur ĢM lasi, piemēram, nejaušas kontaminācijas rezultātā. Atlantijas lasi (*Salmo salar*) saturoši produkti kopumā bija 18. Daļai produktu, kuru sastāvā bija Atlantijas lasis, marķējumā bija norādīta laša izcelsme: Atlantijas okeāna ziemeļaustrumu daļa, FAO 27, Norvēģijas jūra (n = 1); akvakultūras produkts, Atlantijas okeāna ziemeļaustrumu daļa, FAO 27 (n = 1); audzēts Norvēģijā (n = 5). Pārējiem paraugiem laša izcelsme nebija norādīta (n = 11).

Projekta gaitā tika konstatēts, ka mazumtirdzniecībā tādi enzīmi kā α -amilāze, β -galaktozidāze, proteāze, neitrālā proteāze, laktāze un fitāze, kā arī pienskābe (E270) un vitamīni, piemēram, β -karotīns (A vitamīna prekursors, E160a), α -tokoferols (E vitamīns, E307), riboflavīns (vitamīns B2, E101), kuru producenti teorētiski varētu būt ĢMM, kā pārtikas un barības piedevas nav iegādājami vai ir atrodami samērā reti, kā piemēram, sorbīts (E420) un citronskābe (E330). Tādēļ pārsvarā tika iegādāti enzīmi, vitamīni un aminoskābes kā uztura bagātinātāji.

Paraugu homogenizēšana un DNS ekstrakcija

Paraugu homogenizēšanai tika izmantotas dažādas dzirnavas un blenderi atkarībā no parauga specifikas (Grindomix GM 200 (Retsch), Laboratory blender (Waring), Profi I Cook), kā arī piesta un piestala. Paraugi, kuru konsistence bija šķidra vai pulverveida, netika homogenizēti. Sojas mērces pirms DNS ekstrakcijas tika centrifugētas nogulšņu iegūšanai (30 min 13000g 2 reizes), no kurām pēc tam tika izdalīta DNS. DNS primāri tika izdalīta no 200 mg homogenizētā vai oriģinālā parauga, izmantojot komerciālu reaģentu komplektu NucleoSpin Food, Mini kit (Macherey-Nagel). DNS no katra parauga tika izdalīta divos atkārtojumos. DNS koncentrācija un absorbcija tika noteikta ar NanoDrop ND-1000 pie 230, 260 un 280 nm. Nākamais DNS kvalitātes kontroles solis ietvēra augu hloroplastu gēna amplifikāciju, kas parāda, vai paraugā ir amplificējama augu DNS, un/vai auga taksonam specifiskā gēna amplifikāciju:

- **Augu hloroplastu introna gēns *trnL*** - atbilstoši ISO 21569:2005 pielikumam A.2. „Augu hloroplastu daudzskopu gēna (*trnL* introna) sekvenču noteikšana”,
- **Auga taksonam specifiskie gēni** - *hmg* (*high mobility group* gēns kukurūzai), *cruA* (kruciferīna A gēns rapsim), *Lec* (lektīna gēns sojai), *pld* (fosfolipāzes D gēns rīsiem),

⁶ <http://bch.cbd.int/database/record.shtml?documentid=104725>

gs (glutamīna sintetāzes gēns cukurbietēm) atbilstoši GMOMETHODS: EU Database of Reference methods <https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods/>

- 1) *hmg* - CRL-GMFF: Protocol MON 88017 maize;
- 2) *cruA* - CRL-GMFF: Protocol RT73;
- 3) *Lec* - CRL-GMFF: Protocol 40-3-2 soybean;
- 4) *pId* - CRL-GMFF: Protocol QT-TAX-OS-017;
- 5) *gs* - CRL-GMFF: Protocol QT-TAX-BV-013.

ĢMO skrīnings

Paraugu DNS ekstraktiem tika veikts ĢMO skrīnings uz sešiem skrīninga elementiem:

- CaMV 35S promoters, P35S - puķkāpostu mozaīkas vīrusa promoters, kas izmantots daudzu ģenētiski modificētu augu līniju izveidē, atbilstoši ISO 21569:2005 pielikumam B.9. „Atsevišķu bieži ĢM organismos lietotu DNS sekvenču noteikšana, kuru izcelsme ir puķkāpostu mozaīkas vīrusa CaMV 35S promoters (P35S), kā arī *Agrobacterium tumefaciens* (T-nos), pārtikas produktos – skrīninga metode”;
- T-nos - nopalīna sintāzes terminators, kas arī ir izmantots daudzu ģenētiski modificētu augu līniju izveidē, atbilstoši ISO 21569:2005 pielikumam B.9. „Atsevišķu bieži ĢM organismos lietotu DNS sekvenču noteikšana, kuru izcelsme ir puķkāpostu mozaīkas vīrusa CaMV 35S promoters (P35S), kā arī *Agrobacterium tumefaciens* (T-nos), pārtikas produktos – skrīninga metode”;
- *pat* gēns – fosfinotricīna N-acetiltransferāzes gēns no baktērijas *Streptomyces viridochromogenes*; izmantots vairākām ģenētiski modificētu augu līnijām (rapsim, sojai, kokvilnai, kukurūzai); atbilstoši metodei „Quantitative PCR method for detection of phosphinothricin N-acetyltransferase gene”, JRC Compendium of Reference Methods for GMO Analysis;
- pFMV – cūknātru mozaīkas vīrusa 34S promoters; izmantots vairākām ģenētiski modificētu augu līnijām (rapsim, kartupeļiem, sojai, kokvilnai, tomātiem un bietēm), atbilstoši ISO/TS 21569-5:2016 „Uz reālā laika PĶR balstīta skrīninga metode FMV promotera (P-FMV) DNS sekvenču noteikšanai.
- tE9 - zirņu ribulozes-1,5-bifosfāta karboksilāzes mazās subvienības (*rbcS*) gēna E9 terminators, kas ir izmantots vairākām ģenētiski modificētu augu līnijām, atbilstoši GMO Methods: EU database of reference methods. Qualitative PCR method for detection of tE9 terminator (2016);
- *cry1Ab/Ac* - baktērijas *Bacillus thuringiensis* modificēts gēns, kas kodē insektu rezistences proteīnu, atbilstoši GMO Methods: EU database of reference methods. Qualitative PCR method for detection of *cry1Ab/Ac* gene (2017).

PĶR reakcijās kā pozitīvā kontrole tika izmantota DNS, kas iegūta no sertificēta references materiāla, kas ir izsekojams līdz SI sistēmas mērvienībām. References materiāli iegādāti no European Reference Materials (ERM) un American Oil Chemists' Society (AOCS).

Paraugi, kuriem konstatēta amplifikācija uz tE9, bet visi citi skrīninga elementi bija negatīvi, tika pārbaudīti uz *LecPea1* gēna klātbūtni, kas ir zirņu lektīna gēns un var būt dabiski sastopams ģenētiski nemodificētos materiālos, kas satur zirņus (Debode et al., 2017).

GMO piemaisījumu kvalitatīva un kvantitatīva noteikšana

Paraugi, kuriem skrīningā tika konstatēta kāda no skrīninga elementiem klātbūtne, tālāk tika izmeklēti izmantojot JRC piegādātas gatavas 96-bedrīšu reakciju plates *Event-specific Pre-Spotted Plates (Eve-PSP)*, ar kurām var noteikt 21 ģenētiski modificētas kukurūzas līniju (PSP-MAI-1-A) un 15 sojas līnijas (PSP-SOY-1-A) (10., 11. attēls).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	HMG	3272	5307	98140	BT11	Bt176	DAS 40278	DAS 59122	GA21	LY038	MIR 162	MIR 604
B	MON 810	MON 863	MON 87427	MON 87460	MON 88017	MON 89034	NK603	T25	TC 1507	VCO 01981-5		
C	HMG	3272	5307	98140	BT11	Bt176	DAS 40278	DAS 59122	GA21	LY038	MIR 162	MIR 604
D	MON 810	MON 863	MON 87427	MON 87460	MON 88017	MON 89034	NK603	T25	TC 1507	VCO 01981-5		
E	HMG	3272	5307	98140	BT11	Bt176	DAS 40278	DAS 59122	GA21	LY038	MIR 162	MIR 604
F	MON 810	MON 863	MON 87427	MON 87460	MON 88017	MON 89034	NK603	T25	TC 1507	VCO 01981-5		
G	HMG	3272	5307	98140	BT11	Bt176	DAS 40278	DAS 59122	GA21	LY038	MIR 162	MIR 604
H	MON 810	MON 863	MON 87427	MON 87460	MON 88017	MON 89034	NK603	T25	TC 1507	VCO 01981-5		

10.attēls. Kukurūzas *Pre-Spotted Plates* PSP-MAI-1-A izkārtojums.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Lec	DP 356043	Lec	DP 356043	Lec	DP 356043	Lec	DP 356043	Lec	DP 356043	Lec	DP 356043
B	A2704	FG72	A2704	FG72	A2704	FG72	A2704	FG72	A2704	FG72	A2704	FG72
C	A5547	GTS 40-3-2	A5547	GTS 40-3-2	A5547	GTS 40-3-2	A5547	GTS 40-3-2	A5547	GTS 40-3-2	A5547	GTS 40-3-2
D	CV127	MON 87701	CV127	MON 87701	CV127	MON 87701	CV127	MON 87701	CV127	MON 87701	CV127	MON 87701
E	DAS 44406	MON 87705	DAS 44406	MON 87705	DAS 44406	MON 87705	DAS 44406	MON 87705	DAS 44406	MON 87705	DAS 44406	MON 87705
F	DAS 68416	MON 87708	DAS 68416	MON 87708	DAS 68416	MON 87708	DAS 68416	MON 87708	DAS 68416	MON 87708	DAS 68416	MON 87708
G	DAS 81419	MON 87769	DAS 81419	MON 87769	DAS 81419	MON 87769	DAS 81419	MON 87769	DAS 81419	MON 87769	DAS 81419	MON 87769
H	DP 305423	MON 89788	DP 305423	MON 89788	DP 305423	MON 89788	DP 305423	MON 89788	DP 305423	MON 89788	DP 305423	MON 89788

11.attēls. Sojas *Pre-Spotted Plates* PSP-SOY-1-A izkārtojums.

Pozitīvas reakcijas gadījumā paraugam tālāk tika veikta kvantitatīva reālā laika PĶR ar gadījumspecifisku metodi:

- Event-specific Method for the Quantification of Soybean Line 40-3-2-Using Real-time PCR. CRL-GMFF: Protocol 40-3-2 soybean (20 January 2009);

- CRL assessment on the validation of an event-specific method for the relative quantitation of maize line MON 810 DNA using real-time PCR as carried out by Federal Institute for Risk Assessment (BfR). CRL-VL-25/04VR (10 March 2006);
- Event-specific Method for the Quantification of Oilseed Rape Line RT73 Using Real-time PCR. CRLVL26/04VP (7 February 2007);
- Event-specific Method for the Quantification of Soybean Line A2704-12 Using Real-time PCR. CRLVL13/05VP (14 May 2007);
- Event-specific Method for the Quantification of Soybean Line MON 89788 Using Real-time PCR. CRLVL05/06VP (18 February 2008) u.c.

GTS40-3-2 sojas un MON810 kukurūzas kvantifikācija tika veikta arī ar dPQR, izmantojot metodi, kas tika adaptēta un verificēta E. Miltiņas maģistra darba ietvaros.

Lasi saturoši paraugi tika pārbaudīti, vai tajos esošais lasis nav ģenētiski modificēts, izmantojot komerciālu reaģentu komplektu GMOIdent RT IPC Accelerated Growth Salmon (Eurofins). Ar šo reaģentu komplektu var identificēt AquAdvantage™ lasi.

Pārtikas un dzīvnieku barības piedevu un uztura bagātinātāju paraugu analīzes

No pārtikas un dzīvnieku barības piedevu un uztura bagātinātāju paraugiem DNS tika izdalīta divos atkārtojumos, izmantojot komerciālu reaģentu komplektu NucleoSpin Food, Mini kit (Macherey-Nagel). Tā kā vairākos gadījumos ražotājs bija norādījis, ka attiecīgais produkts ir augu izcelsmes, tad šiem paraugiem arī tika veikta amplifikācija uz *trnL* un taksonam specifiskiem gēniem. Ja tika konstatēta augu izcelsmes materiāla klātbūtne, tika veikts ĢMO skrīnings ar iepriekš minētajiem sešiem skrīninga gēniem, kā arī papildus tika veikta amplifikācija uz *nptII* gēnu. *nptII* gēns ir neomicīna fosfotransferāzes gēns, kas nodrošina rezistenci pret neomicīnu un kanamicīnu. Tas ir izmantots vairākām ģenētiski modificētu augu līnijām, kā arī ĢMM izveidē, lai varētu nodrošināt transformantu selekciju. *nptII* gēna klātbūtnes noteikšana tika veikta atbilstoši ISO 21569:2005 pielikumam B4. „Skrīninga metode ĢM augu DNS noteikšanai (*nptII* gēns)”.

Baktēriju DNS klātbūtne pārtikas un dzīvnieku barības piedevu un uztura bagātinātāju paraugos tika pārbaudīta, amplificējot 16S rRNS gēna V4-V5 reģionu, bet sēņu DNS klātbūtne tika pārbaudīta, amplificējot genoma ITS1 reģionu. Lai noskaidrotu baktēriju un sēņu taksonomisko sastāvu no pārtikas un barības piedevām un uztura bagātinātājiem iegūtajā DNS, 16S rRNS un ITS1 PQR produkti tika sekvenēti ar 600 ciklu v3 reaģentu komplektu, izmantojot Illumina MiSeq sekvenatoru. Sekvenēšanas bibliotēkas tika sagatavotas, vadoties pēc Illumina protokoliem. No katra parauga tika iegūti nolasījumi, kuriem tika veikta kvalitātes kontrole, filtrēšana un taksonomiskā klasifikācija QIIME2 datu analīzes vidē (Bolyen et al., 2019). 16S klasifikācijai tika izmantota SILVA 138 datu bāze (Quast et al., 2012). Sēņu sekvenču taksonomiskajai klasifikācijai tika izmantota datu bāze UNITE version 8.3. ar dinamisko sliekšni (*dynamic species hypothesis threshold*) (Nilsson et al., 2018). Kā pozitīvo kontroli izmantojot mākslīgo mikroorganismu kopien (Zymo Research kataloga nr. D6300), kas satur *Bacillus subtilis*, bija iespējams pārliecināties, ka 16S V4-V5 reģiona sekvenēšanas metode patiešām ļauj konstatēt šīs baktēriju sugas klātbūtni.

No pārtikas un dzīvnieku barības piedevu un uztura bagātinātāju paraugiem tika mēģināts izolēt dzīvotspējīgas *Bacillus subtilis* un *Bacillus licheniformis* kultūras, jo šīs baktērijas ir dominējošās sugas starp rekombinantiem producentiem. No viena parauga (2-18) tika mēģināts izolēt *Corynebacterium glutamicum*. Šīs analīzes veica BIOR Mikrobioloģijas

un Patoloģijas laboratorijas Bakterioloģijas grupa. Baktēriju izolēšana tika veikta pielietojot klasiskās mikrobioloģiskas metodes, pēc sekojošas procedūras:

1. atšķaidot katru paraugu 1:10 ar *Maximum recovery dilution* šķīdumu un inokulējot attiecīgo daudzumu suspensijas mikrobioloģiskās diagnostikas barotnēs - Asins agars (*Blood agar*), Triptona sojas agars un Barojošais buljons (*Nutrient broth*) un inkubējot pie 37°C. No sagatavota atšķaidījuma tika veikta:

1) tiešā uzsēšana no 1:10 atšķaidījuma ar sterilu 10 mkl cilpu uzsējot uz katra agara virsmas Petri platēs, inkubācijas temperatūra 37°C, inkubācijas laiks no 24 līdz 72 st.

2) baktēriju uzkrāšana Barojošā buljonā (1 ml suspensijas no 1:10 atšķaidījuma tika inokulēta 9 ml Barojošā buljona), to 24 st. inkubējot pie 37°C un veicot tālāko pārsēšanu uz Asins agara un Triptona sojas agara (inkubācija pie 37°C, 24 st.)

Izaugušas un morfoloģiski līdzīgas *Bacillus* spp. kolonijas tika identificētas izmantot MALDI-TOF (Bruker, Vācija). Koloniju morfoloģija aprakstīta rokasgramatā (Markey et al., 2013). Iegūtās baktēriju kultūras tika saglabātas BIOR Mikroorganismu kultūru kolekcijā.

GMM marķieru 558, cat, tetL, aadD amplifikācija

GMM marķieru 558, *cat*, *tetL* un *aadD* amplifikācija tika veikta DNS ekstraktiem, kas iegūti no pārtikas un dzīvnieku barības piedevu un uztura bagātinātāju paraugiem, kā arī DNS ekstraktiem no izolētajām *Bacillus* sp. kultūrām. Izmantotās praimeru sekvences ir dotas 14. tabulā. Marķiera 558 amplifikācijai kā pozitīvā kontrole tika izmantota plazmīda pENGL-00-EM-01/18-01, kas saņemta no EURL GMFF. Pārējo marķieru gadījumā reakcijas apstākļi tika optimizēti līdz tika iegūta amplifikācija kādam no paraugiem. Vispirms tika veikta antibiotiku rezistences gēnu amplifikācija ar rl PĶR, bet pēc tam ar konvencionālo PĶR. Amplifikācijas produkti, kas tika iegūti ar konvencionālo PĶR, tika sagatavoti sekvenēšanai ar Sangera sekvenēšanas metodi.

14. tabula

Izmantotie oligonukleotīdi un fluorescentās zondes

Apzīmējums	Sekvence	Reference
tetL-F	ATA AAA CGA GCC ATA ATA AGT AAG GAA AAG	Fraiture et al., 2020c
tetL-R	TCA ATT AGG CAT CAA AAG GTT ACT CC	
tetL-F1	TTG CAA TAC CTG TTC CCT CTG	
tetL-R1	ACT GGG TGA ACA CAG CCT TT	
aadD-F1	GAA TAT TGG ATA AAT ATG GGG ATG A	Fraiture et al., 2020b
aadD-R1	TAT CCG TGT CGT TCT GTC CA	
aadD-F2	ATG GCT CTC TTG GTC GTC AG	
aadD-R2	CCT GAA TCC CAT TCC AGA AA	
aadD-F	ATC AGA TTG GCC GCT TAC AC	
aadD-R	ATA AGG GCA CAA ATC GCA TC	
cat-F1	TTT GAA CCA ACA AAC GAC TTT	Fraiture et al., 2020a
cat-R1	GGC CTA TCT GAC AAT TCC TGA	
cat-F2	CCA ACA AAC GAC TTT TAG TAT AAC C	
cat-R2	TCC TGC ATG ATA ACC ATC AC	
cat-F	GTG ACA AGG GTG ATA AAC TCA AAT AC	
cat-R	TGT ATA AAG TGG CTC TAA CTT ATC CC	
558-F	CgA gCT TTT gCg CgT ATA	Paracchini et al., 2017
558-R	gCC ATT CCA ATA CAA AAC CAC ATA	
tetL-P	FAM-CCAACAAACCCAATTACCGACCCGAAACAA-TAMRA	Fraiture et al., 2020c

Apzīmējums	Sekvence	Reference
aadD-P	FAM-CGGTAGAAGCCCAACGTTCCAC-TAMRA	Fraiture et al., 2020b
cat-P	FAM-ACC TAA CTC TCC GTC GCT ATT GTA ACC AGT-TAMRA	Fraiture et al., 2020a
558-Tm	FAM-Cgg ATC TAA CgC ATg CTC CgC A-BBQ	Paracchini et al., 2017

2.1.2. Rezultāti

Rezultātu kopsavilkums ir dots nodaļas beigās 13. attēlā, bet detalizēta informācija ir redzama 17. tabulā “Pārtikas paraugu ĢMO skrīninga rezultāti”, 18. tabulā “Dzīvnieku barības skrīninga rezultāti”, 19. tabulā “ĢMO piemaisījumu kvalitatīva un kvantitatīva noteikšana pozitīvajos pārtikas un barības paraugos” un 21. tabulā “Pārtikas un dzīvnieku barības piedevu (enzīmu) paraugi, uztura bagātinātāji un to izmeklējumu rezultāti”.

Divos tiešsaistē iegādātos zivju barības paraugos, kuru izcelsmes valsts ir Lietuva, tika konstatēts kukurūzas notikums MON863, kas ES vairs nav autorizēts (autorizācija nav tikusi atjaunota). GMO Register datu bāzē kā pamatojums tam ir teikts, ka trešās pasaules valstis šo kukurūzu vairs nekultivē kopš 2011. gada. Tomēr ISAAA datu bāzē redzams, ka tādās valstīs kā Singapūra un Taizeme šīs kukurūzas izmantošana pārtikā ir autorizēta 2013. un 2014. gadā, savukārt izmantošana barībā tā ir autorizēta Turcijā un Nigērijā 2015. un 2018. gadā, lai gan audzēšana nav autorizēta nevienā valstī. Tā ir uzskatāma par LLP (*low level presence*) ĢMO līniju, kuras daudzums nedrīkst pārsniegt 0,1 %.

Pieciem paraugiem divu ĢMO notikumu kvantifikācija tika veikta gan ar rLPKĀ, gan ar dPKĀ (20. tabula).

Pārtikas un barības piedevu un uztura bagātinātāju rezultātu analīze

Paraugs 1-29 bija holīna hlorīds ([Ch][Cl], 2-hidroksietiltrimetil amonija hlorīds jeb B₄ vitamīns) ar 60 % kukurūzas. Holīna hlorīds ir lēts organiskais sāls, kuru izmanto, piemēram, kā vistu barības (Nockemann et al., 2007) vai liellopu barības piedevu (Radzikowski et al., 2021). Atbilstoši 16S V4-V5 sekvenēšanas rezultātiem tika konstatēts, ka paraugā 1-29 ir *Bacillus* sp. sekvences (0,45%). No šī parauga tika iegūtas sekojošas kultūras: *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilis*, *Brevibacillus laterosporus*. Ir maz literatūras datu par to, ka holīnu iegūst, izmantojot mikroorganismus kā producentus. Bioķīmiskajās reakcijās varētu būt iesaistītas tādas baktērijas kā *Corynebacterium ammoniagenes* un *Escherichia coli* (Fujio et al., 1997; Fujio un Maruyama, 1997). *Corynebacterium* sekvences šajā paraugā bija 0,01 %, bet *E. coli* netika konstatētas. Starp ITS1 sekvencēm šajā paraugā dominēja *Nectriaceae* dzimtas sēnes (44,34 % no visām sēņu sekvencēm), kuras nebija iespējams identificēt līdz ģints un sugas līmenim. Pārējo sēņu sekvenču īpatsvars bija mazāks par 10 %, piemēram, *Talaromyces*, *Sarocladium*, *Alternaria*, *Cladosporiaceae*, *Fusarium*, *Aspergillus niger* u.c.

Paraugs 2-1, kas bija augu izcelsmes enzīmu maisījums suņiem, atbilstoši marķējumā norādītajai informācijai saturēja vairākus enzīmus – proteāzi (peptidāzi), amilāzi, diastāzi (arī cieti šķeļošs enzīms), lipāzi, bromelīnu, un β-glikanāzi. Pēc 16S V4-V5 sekvenēšanas rezultātiem tika konstatēts, ka šajā paraugā dominēja *Pseudomonas* sp. (19,54 % sekvenču) un *Lactobacillus plantarum* (16,87 %) sekvences. Savukārt pēc literatūras datiem galvenie GMM, kas varētu būt proteāzes un amilāzes producenti, ir *B. subtilis* un *B. licheniformis* (Deckers et al., 2020; Fraiture et al., 2020a), tomēr arī *Pseudomonas* un *Lactobacillus* ģints baktērijas var būt ĢM dažādu enzīmu producenti (Deckers et al., 2020a). *Bacillus* sp. sekvences paraugā

veidoja tikai 0,71 % no visām sekvencēm. Par bromelīnu jeb bromelaīnu dēvē augu izcelsmes proteāzi (Arshad et al., 2014). Kultūrā *Bacillus* spp. nav izdevies iegūt.

Paraugā 2-17, kas bija L-Arginīns kapsulās, atbilstoši 16S V4-V5 sekvenēšanas rezultātiem tika konstatēts, ka šajā paraugā dominē nekultivējama baktērija (*Tepidiphilus*) (19,94 % sekvenču), *Anoxybacillus* (10,48 %), *Bacillus* sp. (9,81 %). Atbilstoši literatūras datiem *Bacillus* sp. var būt L-arginīna producenti (Utagawa, 2004). Ir izdevies iegūt *Bacillus subtilis* kultūru.

Paraugā 2-18, kas bija L-Lizīns tabletēs atbilstoši 16S V4-V5 sekvenēšanas rezultātiem tika konstatēts, ka šajā paraugā dominē *Pseudomonas* sp. (39,32 % sekvenču), *Lactobacillus* sp. (9,12 % sekvenču) un *Anaerobacillus* sp. (4,00 % sekvenču). Atbilstoši literatūras datiem L-lizīna producenti var būt tādas baktērijas kā *C. glutamicum* (Vassilev et al., 2018), *E. coli* (Ma et al., 2015) u.c. baktērijas. *Corynebacterium* sp. sekvenču šajā paraugā bija tikai 0,02 -1,38 %, bet *E. coli* netika konstatētas. Kultūrā *Bacillus* spp. nav izdevies iegūt. Arī *Corynebacterium* sp. kultūras neizdevās izolēt ne no tiešā uzsējuma, ne veicot uzsējumu no uzkrāšanas barotnes, inkubējot plates no 24 līdz 72 stundām.

Paraugā 2-19, kas bija vitamīns B2 tabletēs, atbilstoši 16S V4-V5 sekvenēšanas rezultātiem tika konstatēts, ka šajā paraugā dominē *Pseudomonas* sp. (45,67 % sekvenču) un *Anaerobacillus* sp. (5,68 % sekvenču). Atbilstoši literatūras datiem vitamīna B2 producers ir *Bacillus subtilis* (Paracchini et al., 2017 un Fraiture et al., 2021). *Bacillus* sp. sekvenču šajā paraugā bija tikai 0,14 % no visām sekvencēm. Kultūrā *Bacillus* spp. nav izdevies iegūt.

Paraugi 2-23 bija papildu minerālbarība govīm, kura sastāvā bija norādītas sekojošas sastāvdaļas: beta karotīns, vitamīns A, vitamīns D₃, vitamīns E, vitamīns B₆, vitamīns B₁₂, biotīns, tokoferols, mikro un makro elementi, *Saccharomyces cerevisiae* MUCL 39885 – 1,5 x10¹⁰ KVV/kg). *S. cerevisiae* MUCL 39885 ir ES atļauta dzīvnieku barības piedeva (EFSA FEEDAP, 2020). Atbilstoši 16S V4-V5 sekvenēšanas rezultātiem tika konstatēts, ka šajā paraugā dominē *Pseudomonas* sp. (4,94 % sekvenču), *Bacillus* spp. (4,15 %), no kuriem *B. licheniformis* bija 3,64 % sekvenču. Atbilstoši ražotāja norādītajam, ka šis enzīmu maisījums satur raugu *S. cerevisiae*, ITS1 sekvenēšanā tika konstatēts, ka *Saccharomyces* sp. sekvenču sastāda 99,14 % no visām sēņu sekvencēm šajā paraugā. Ir iegūta kultūra, kuras morfoloģija atbilst *Bacillus licheniformis*, bet pēc MALDI-TOF atbilst *Bacillus sonorensis*.

Paraugi 2-24 bija papildbarība slaucamām govīm, kura sastāvā bija norādītas sekojošas sastāvdaļas: kalcijs, fosfors, nātrijs, magnijs, sērs, A vitamīns, D₃ vitamīns, E vitamīns, biotīns, niacīns, cinks, mangāns, varš, kobalts, jods, selēns, žāvēts raugs. Atbilstoši 16S V4-V5 sekvenēšanas rezultātiem tika konstatēts, ka šajā paraugā ir *Staphylococcus* sp. (5,02 %), *Bacillus* sp. (0,21%) sekvenču. Kultūrā *Bacillus* spp. nav izdevies iegūt.

Paraugi 2-56 un 2-57 bija L-lizīna pulveris no dažādiem ražotājiem. Atbilstoši 16S V4-V5 sekvenēšanas rezultātiem tika konstatēts, ka paraugā 2-56 ir 2,79 % *Bacillus* sp. sekvenču, bet paraugā 2-57 ir 1,65 % *Bacillus* sp. sekvenču. Kultūrā *Bacillus* spp. nav izdevies iegūt. Atbilstoši literatūras datiem L-lizīna producenti var būt tādas baktērijas kā *C. glutamicum* (Vassilev et al., 2018), *E. coli* (Ma et al., 2015) u.c. baktērijas. *Corynebacterium* sp. sekvenču paraugos 2-56 un 2-57 bija tikai 0,10 % un 0,65 %, attiecīgi, bet *E. coli* netika konstatētas.

Paraugi 2-58 bija L-arginīns ar apelsīnu garšu, un tam netika iegūti 16S un ITS1 amplifikācijas produkti. Kultūrā *Bacillus* spp. nav izdevies iegūt.

Paraugi 2-59 bija L-Karnitīns ar hromu kapsulās. Atbilstoši 16S V4-V5 sekvenēšanas rezultātiem tika konstatēts, ka tajā ir 2,62 % *Bacillus* sp. sekvenču. Kultūrā *Bacillus* spp. nav izdevies iegūt. Atbilstoši literatūrai L-karnitīna biosintēzei tiek izmantotas tādas baktērijas kā *E. coli* un *Proteus* sp. (Bernal et al., 2007), bet šo ģinšu baktēriju sekvenču netika konstatētas.

Paraugs 2-60 bija L-Leicīns, L-Izoleicīns, L-Valīns un Vitamīns B₆ kapsulās. Atbilstoši 16S V4-V5 sekvenēšanas rezultātiem tika konstatēts, ka paraugā 2-60 ir 3,96 % *Bacillus* sp. sekvenču. No šī parauga izdevās izolēt *B. pumilis* kultūru. L-leicīna biosintēzē tiek izmantotas tādas baktērijas kā *C. glutamicum* un *E. coli* (Wang et al., 2019, Wang et al., 2020). *Corynebacterium* sp. sekvences šajā paraugā bija 0,4 %, bet *E. coli* netika konstatētas.

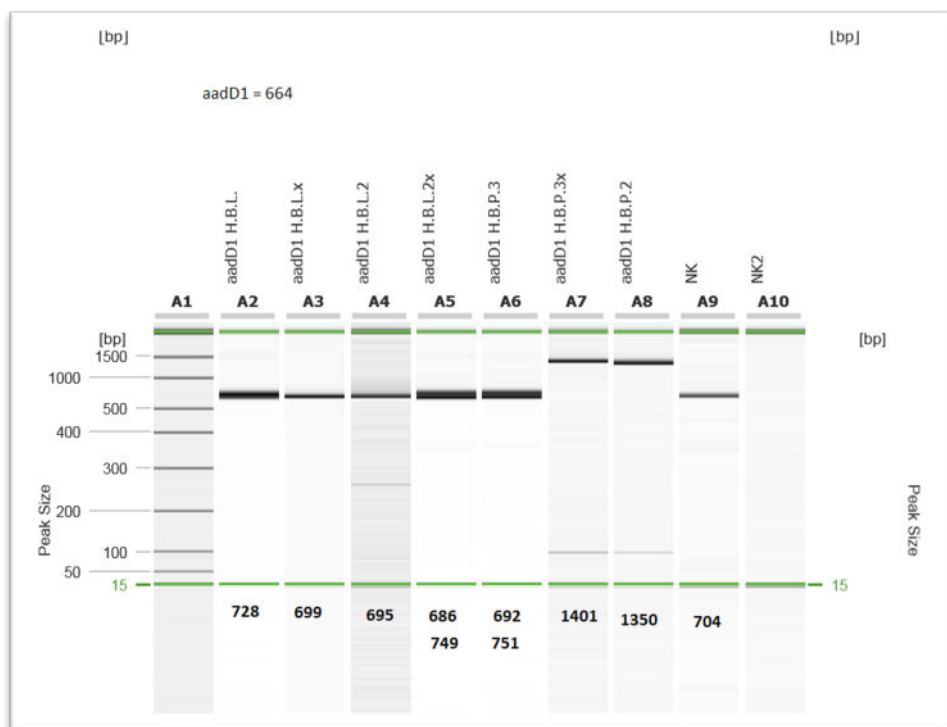
Paraugs 2-61 bija sorbīts, un tam netika iegūti 16S un ITS1 amplifikācijas produkti. Kultūrā *Bacillus* spp. nav izdevies iegūt.

Paraugs 2-62 bija citronskābe. Atbilstoši 16S V4-V5 sekvenēšanas rezultātiem tika konstatēts, ka paraugā 2-62 ir 1,02 % *Bacillus* sp. sekvenču. Kultūrā *Bacillus* spp. nav izdevies iegūt. Atbilstoši literatūras datiem citronskābes producents ir *Aspergillus niger* (Kallscheuer, 2018), bet sēņu amplifikācijas produkti (ITS1) šim paraugam netika iegūti.

Kopumā var secināt, ka divi no 14 pārtikas un barības piedevu un uztura bagātinātāju paraugiem ir uzskatāmi par absolūti negatīviem, t.i., tādiem, kas nesatur ne dzīvotspējīgus producentus, ne to DNS, kā arī tajos netika konstatēts neviens no ĢMM marķierģēniem. Tie ir L-arginīns ar apelsīnu garšu un sorbīts.

No četriem paraugiem (28,57 %) izdevās izolēt *Bacillus* ģints baktērijas. No tiem divos paraugos tika konstatēta antibiotiku rezistences ģēnu amplifikācija ar rl PĶR (1-17 paraugam tikai vienam DNS ekstraktam) (15. tabula), bet Ct vērtības bija salīdzinoši vēlākas nekā metodes autoriem – 38,31 - 38,94 vs. 11,6 - 34,1 *aadD1* ģenam un 38,23 - >40,00 vs. 18,0 – 39,1 *tetL* ģenam (Fraiture et al., 2020b; Fraiture et al., 2020c). Ar konvencionālo PĶR amplifikācijas produktus izdevās iegūt tikai holīna hlorīda parauga (1-29) DNS ekstraktā – *tetL* un *aadD1*.

No diviem paraugiem izolēto baktēriju DNS ekstraktiem tika konstatēta amplifikācija uz antibiotiku rezistences ģēniem *tetL* un *aadD1* ar rl PĶR (16. tabula). Ar konvencionālo PĶR tika iegūta amplifikācija *tetL* un *aadD1* trīs paraugu izolātiem. Tomēr *aadD1* amplifikācija ar *nested*PĶR tika iegūta tikai holīna hlorīda parauga (1-29) izolātiem (12. attēls). Konvencionālo PĶR produktus ir nepieciešams sekvenēt, lai pārliecinātos, ka tie tiešām ir antibiotiku rezistences ģēni. Tomēr jāpiebilst, ka metodes autori uzskata, ka *aadD* ģēns nav dabiski sastopams savvaļas (*wild-type*) baktērijās, kuras ir zināmas kā ĢM producenti, izņemot *E. coli* (Fraiture et al., 2020b). Konvencionālā PĶR *tetL* ģenam uzrādīja amplifikāciju vairākām kultūrām, kurām nebija amplifikācijas ar rl PĶR. Šādu situāciju apraksta arī metodes izstrādātāji vairākiem *wild-type* izolātiem no tādām sugām kā *Bacillus subtilis*, *B. velezensis* un *B. amyloliquefaciens*. Viņu ieteikums ir sekvenēt tikai to paraugu konvencionālos PĶR produktus, kuriem ir bijusi amplifikācija arī ar rl PĶR (Fraiture et al., 2020c). No projekta paraugiem tāda situācija ir tikai diviem paraugiem 1-29 un 2-17. Jāpiebilst, ka šajos paraugos tika konstatēta amplifikācija arī uz ĢMO skrīninga ģēniem – *p35S* un *pFMV*+/- 1-29 paraugam un *p35S* un *tNOS* 2-17 paraugam. Līdz ar to, šie divi paraugi ir uzskatāmi par aizdomīgiem, t.i., tādiem, kuros ir konstatēta ĢMM marķierģēnu klātbūtne, izolētas dzīvotspējīgas *Bacillus* kultūras, kā arī izolētajām kultūrām konstatēti marķierģēni. Savukārt pārējie 10 paraugi ir uzskatāmi par negatīviem.



12.attēls. aadD1 gēna *nested*PCR rezultāti parauga 1-29 baktēriju izolātu DNS ekstraktiem.

15.tabula

Pārtikas un barības piedevu un uztura bagātinātāju paraugu analīžu kopsavilkums

Nr.	Produkts, izcelsmes valsts	DNS, ng/μl	GMM marķieri (rt PCR)					NGS	Bacillus spp. kultūra
			nptII	558	cat	tetL	aadD		
1-29	Holina hlorīds, 60 % kukurūza, Ķīna	34,12±15,78	neg	neg	poz	Poz*	Poz*	Bacillus spp. (0,45%)	B. cereus, B. pumilis, Brevibacillus laterosporus
2-1	Augu izcelsmes enzīmu maisījums supļem, ASV	2,10±1,00	neg	neg	neg	neg	neg	Lactobacillus plantarum (16,87 %), Bacillus (0,71 %)	Nav
2-17	L-Arginīns kapsulās, UK	2,57±1,09	neg	neg	neg	neg	Poz ^{+/}	Tepidiphilus (19,94 %), Anoxybacillus (10,48 %), Bacillus sp. (9,81 %)	B. subtilis
2-18	L-Lizīns tabletēs, UK	4,93±4,83	neg	neg	neg	neg	Poz ^{+/}	Lactobacillus sp. (9,12 %), Anaerobacillus sp. (4,00 %), Corynebacterium sp. (0,02 %)	Nav
2-19	Vitamīns B ₂ tabletēs, UK	14,78±0,88	neg	neg	neg	neg	neg	Anaerobacillus sp. (5,68 %), Bacillus sp. (0,14 %)	Nav
2-23	Papildu minerālbarība govīm, Polija	3,80±2,12	neg	neg	neg	neg	neg	Bacillus spp. (4,15 %), no kuriem B. licheniformis 3,64 %, Saccharomyces sp. (99,14 %)	Bacillus licheniformis
2-24	Papildbarība slaucamām govīm, Polija	3,78±0,59	neg	neg	neg	neg	neg	Staphylococcus sp. (5,02 %), Bacillus sp. (0,21%)	Nav
2-56	L-Lizīna pulveris, UK	35,90±22,13	neg	neg	neg	neg	neg	Bacillus sp. (2,79 %)	Nav
2-57	L-Lizīna pulveris, Polija	80,1±104,16	neg	neg	neg	neg	neg	Bacillus sp. (1,65 %)	Nav
2-58	L-Arginīns ar apelsīnu garšu, Polija	1,95±1,63	neg	neg	neg	neg	Poz ^{+/}	16S, ITS1 amplifikācijas nav	Nav
2-59	L-Karnitīns ar hromu kapsulās, Ungārija	0,65±0,07	neg	neg	neg	neg	neg	Bacillus sp. (2,62 %)	Nav
2-60	L-Leicīns, L-Izoleicīns, L-Valīns, Vitamīns B ₆ kapsulās, Ungārija	1,55±0,07	neg	neg	neg	neg	neg	Bacillus sp. (3,96 %)	B. pumilis
2-61	Sorbits, Spānija	6,25±1,20	neg	neg	neg	neg	neg	16S, ITS1 amplifikācijas nav	Nav
2-62	Citronskābe, Ķīna	4,25±0,64	neg	neg	neg	neg	neg	Bacillus sp. 1,02 %	nav

*-Paraugam ir iegūti amplifikācijas produkti arī ar konvencionālo PCR; +/- - paraugam tika konstatēta amplifikācija tikai vienam no diviem atkārtojumiem.

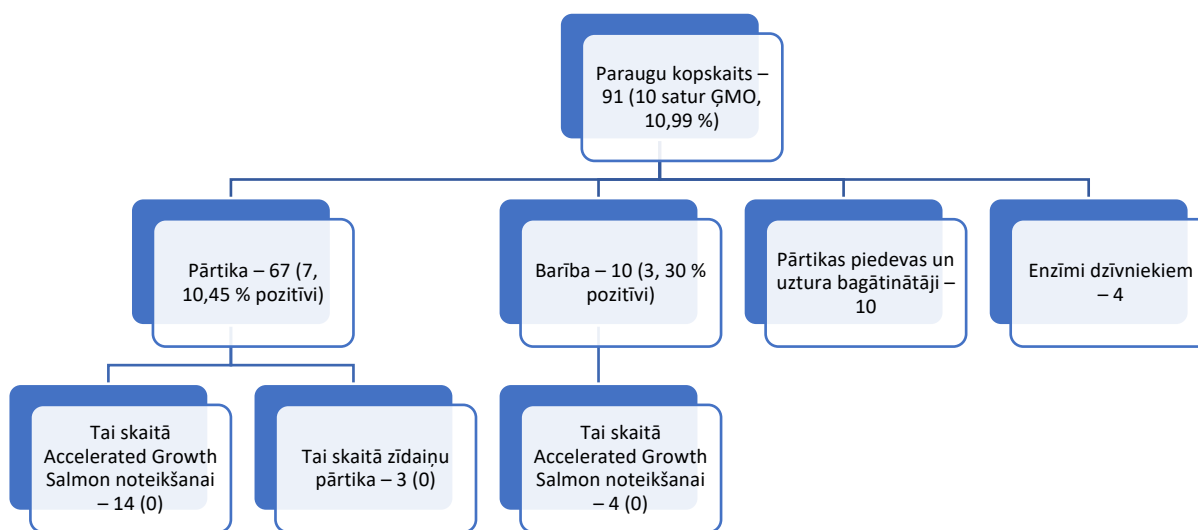
16.tabula

No paraugiem izolēto kultūru analīžu rezultāti

Nr.	Paraugs	Kultūra	Reālā laika PCR (Ct)				Konvencionālā PCR (bp)		
			tetL	aadD1	558	cat1	tetL	aadD1	cat1
1	2-17	<i>Bacillus subtilis</i>	40,22	neg	neg	neg	899	neg	neg
2	2-17	<i>Bacillus subtilis</i>	neg	neg	neg	neg	916	neg	neg
3	2-23	<i>Bacillus licheniformis</i>	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
4	2-23	<i>Bacillus licheniformis</i>	neg	neg	neg	neg	1072*	neg	neg
5	1-29	<i>Bacillus cereus</i>	neg	neg	neg	neg	959	neg	neg
6	1-29	<i>Bacillus cereus</i>	neg	neg	neg	neg	986	neg	neg
7	1-29	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	neg	38,81	neg	neg	neg	750	neg
8	1-29	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
9	1-29	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	neg	neg	neg	neg	1087*	neg	neg
10	1-29	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	38,79	38,31	neg	neg	neg	757	neg
11	1-29	<i>Bacillus pumilus</i>	neg	neg	neg	neg	1067, 1843*	758	neg
12	1-29	<i>Bacillus pumilus</i>	40,04	neg	neg	neg	1314*	1358*	neg
13	1-29	<i>Bacillus pumilus</i>	neg	neg	neg	neg	909, 1451*	1370*	neg
14	1-29	<i>Bacillus pumilus</i>	neg	38,94	neg	neg	1460*	neg	neg
15	1-29	<i>Bacillus pumilus</i>	neg	38,76	neg	neg	neg	neg	neg
16	1-29	<i>Bacillus pumilus</i>	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
17	2-60	<i>Bacillus pumilus</i>	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
18	2-60	<i>Bacillus pumilus</i>	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg

*-vāja amplifikācija.

Ekspozīcijas novērtējuma kopsavilkums



13.attēls. Analizēto paraugu kopsavilkums. Iekavās dots pozitīvo paraugu skaits.

Analizēto paraugu kopsavilkums atkarībā no izcelsmes valsts:

- Ārpus ES (51/7 **pozitīvi (13,73 %)**) – Baltkrievija (3), Dienvidkoreja (4/2 **pozitīvi**), Filipīnas (1), Japāna (2), ASV (7/5 **pozitīvi**), Indija (3), Kanāda (1), Kambodža (1), Krievija (2), Ķīna (6), Lielbritānija (6), Moldova (1), Norvēģija (1), Taizeme (4), Turcija (2),

Ukraina (6), dažādi – fasēts Nīderlandē, bet sojas pupiņu izcelsme - ASV, Kanāda, Brazīlija (1);

- No ES (40/3 **pozitīvi (7,5 %)**) – Beļģija (2), Čehija (7), Francija (2), Latvija (3), Lietuva (5/2 **pozitīvi**), Polija (8), Rumānija (1), Spānija (5/1 **pozitīvs**), Ungārija (5), Vācija (1), Zviedrija (1).

Atšķirības starp pozitīvo paraugu īpatsvaru paraugiem, kuru izcelsme ir ES vai ārpus ES, nav statistiski būtiska (χ^2 tests ar Yates korekciju - $\chi^2 = 0,3658$, $p = 0,55$).

Secinājumi

1. Augstāks pozitīvo paraugu īpatsvars tika konstatēts paraugiem ar izcelsmi ārpus ES (13,73 %) salīdzinājumā ar paraugiem, kuru izcelsme bija ES (7,5 %), bet atšķirības nebija statistiski būtiskas.
2. Tikai viena produkta marķējumā, kurš saturēja ĢMO piemaisījumus, bija norādīts, ka tas satur ģenētiski modificētas pārtikas izejvielas.
3. Visvairāk pozitīvu paraugu bija no ASV - 71,43 % no visiem paraugiem, kas bija ar izcelsmi no šīs valsts, no Dienvidkorejas 50,00 %, Lietuvas 40,00 % un Spānijas 20,00 %.
4. Salīdzinot pārtikas paraugus ar dzīvnieku barības paraugiem, redzams, ka pozitīvi bija 10,45 % pārtikas paraugu un 30,00 % dzīvnieku barības paraugu. Dzīvnieku barības gadījumā tas atbilst līdzšinējām tendencēm pēdējos gados, bet pārtikas gadījumā tik daudz pozitīvu paraugu pēdējos gados nav bijis.
5. Nevienā no 18 paraugiem, kuru sastāvā bija norādīts lasis, netika konstatēts AquAdvantage™ lasis.
6. No 10 pozitīvajiem paraugiem četri pārtikas paraugi bija iegādāti mazumtirdzniecībā klātienē, bet seši pārtikas un barības paraugi bija iegādāti tiešsaistes tirdzniecības vietās, kas norāda uz to, ka ĢMO uzraudzības programmā būtu jāiekļauj tiešsaistes tirdzniecības uzņēmumi.
7. No 14 pārtikas un barības piedevu un uztura bagātinātāju paraugiem divi paraugi ir uzskatāmi par aizdomīgiem, t.i., tādiem, kuros ir konstatēta ĢMM marķierģēnu klātbūtne, izolētas dzīvotspējīgas *Bacillus* kultūras, kā arī izolētajām kultūrām konstatēti marķierģēni. Viens no šiem paraugiem ir holīna hlorīds ar 60 % kukurūzas, bet otrs – L-arginīns kapsulās.

17.tabula

Pārtikas paraugu ĢMO skrīninga rezultāti

Nr.	Produkts	Izcelsmes valsts	ĢMO mērķa organisms	trnL/ taksonam specifisks gēns	p35S, tNOS, <i>pat</i> , tE9, pFMV, Cry1Ab/Ac, AGS (paraugiem, kas satur lasi)
1-1	Tofu pastēte ar austersēnēm	Čehija	soja, rapsis	trnL-, lec +	negatīvs*
1-2	Tofu pastēte	Čehija	soja, rapsis	trnL-, lec+	negatīvs
1-3	Cepts tofu	Čehija	soja	trnL+	negatīvs
1-4	Rīsu papīrs, bezglutēna	Kambodža	rīsi	trnL+	negatīvs
1-5	Tofu filejas japāņu stilā	Vācija	soja	trnL+	negatīvs
1-6	Sautēts tofu, konservēts	Lielbritānija	soja	trnL+	negatīvs
1-7	Nūdeles, tvaicētas, vakuumā	Dienvietkoreja	soja	trnL+	negatīvs
1-8	Zīda tofu	ASV	soja	trnL+, lec+	p35S+, tNOS+, tE9+
1-9	Rīvmaize	Ķīna	kvieši	trnL+	negatīvs
1-10	Kviešu nūdeles	Ķīna	kvieši	trnL+	negatīvs
1-11	Bezglutēna milti	Čehija	kukurūza, rīsi	trnL+, hmg+	tE9+, (arī LecPea1+), kopumā vērtējums - negatīvs
1-12	Rīsu papīrs	Taizeme	rīsi	trnL+	negatīvs
1-13	Sojas pupiņas, veselas	Indija	soja	trnL+	negatīvs
1-14	Kviešu nūdeles	Ķīna	kvieši	trnL+	negatīvs
1-15	Mīklas maisījums	Dienvietkoreja	kvieši, kukurūza, soja, rīsi	trnL+, hmg+, lec+	tE9+, pFMV+
1-16	Gaišā sojas pupiņu pasta	Japāna	soja, rīsi	trnL+	negatīvs
1-17	Sojas deserts	Beļģija	soja	trnL+	negatīvs
1-18	Konservēta kukurūza	Ungārija	kukurūza	trnL+	negatīvs
1-19	Kukurūzas pārslas	Polija	kukurūza	trnL-, hmg-	negatīvs
1-20	Kabaču ikri	Ukraina	cukīni, tomāti	trnL+	negatīvs
1-21	Tomātu pasta	Ukraina	tomāti	trnL-	negatīvs
1-23	Sarkanie ikri	ASV	lasis	NA	AGS** negatīvs
1-25	Kečups	Ukraina	tomāti, kukurūza	trnL-, hmg-	negatīvs
1-26	Karameles	Ukraina	cukurbietes, soja	trnL-, lec-	negatīvs
1-27	Konservēts lasis	Norvēģija	lasis	NA	AGS negatīvs

Nr.	Produkts	Izcelsmes valsts	GMO mērķa organisms	trnL/ taksonam specifisks gēns	p35S, tNOS, <i>pat</i> , tE9, pFMV, Cry1Ab/Ac, AGS (paraugiem, kas satur lasi)
2-2	Sojas piens, sausais	Čehija	soja, kukurūza	trnL+, lec+	negatīvs
2-3	Kukurūzas putraini	Polija	kukurūza	trnL+	negatīvs
2-4	Sojas nūdeles	Čehija	soja	trnL-, lec+	negatīvs
2-5	Sojas pupiņas	Lielbritānija	soja	trnL-, lec+	negatīvs
2-6	Sojas un kviešu gabaliņi uz iesma	Indija	soja	trnL+, lec+	negatīvs
2-7	Ātri pagatavojama zupa	Japāna	soja	trnL+, lec+	negatīvs
2-8	Siers sojas zīda tofu	ASV	soja	trnL+, lec+	p35S+, tNOS+, pat+, tE9+, pFMV+
2-9	Sojas mērce	Ķīna	soja	trnL+, lec+/-	negatīvs
2-10	Sojas pupiņas	Kanāda	soja	trnL+, lec+	negatīvs
2-11	Sojas mērce ar samazinātu sāls daudzumu	Taizeme	soja	trnL-, lec+/-	negatīvs
2-12	Citronu-sojas mērce	Filipīnas	soja	trnL-, lec-	negatīvs
2-13	Sojas mērce ar sēņu garšu	Taizeme	soja	trnL-, lec+/-	negatīvs
2-20	Dabiski raudzēta sojas mērce	Nīderlande (sojas pupiņām - ASV, Kanāda, Brazīlija)	soja	trnL-, lec-	negatīvs
2-21	Sojas pupiņu pasta ar garšvielām	Dienvidkoreja	soja	trnL+, lec+	negatīvs
2-25	Zivju pasta ar lasi un foreli	Baltkrievija	lasis, soja, kukurūza	trnL+	AGS negatīvs
2-26	Balto zivju pasta ar lasi	Baltkrievija	lasis	NA	AGS negatīvs
2-27	Moivas ikru krēms ar kūpinātu lasi	Baltkrievija	lasis	trnL+	AGS negatīvs
2-28	Sālīta Atlantijas laša fileja, ar ādu	Lietuva (lasis audzēts Norvēģijā)	lasis	NA	AGS negatīvs
2-29	Lašu pastēte	Zviedrija (lasis audzēts Norvēģijā)	lasis	trnL+	AGS negatīvs
2-30	Atlantijas laša fileja, auksti kūpināta	Lietuva (lasis audzēts Norvēģijā)	lasis	NA	AGS negatīvs
2-31	Lašu filejas pikantā krēmā	Latvija (lasis audzēts Norvēģijā)	lasis, rapsis, kukurūza	trnL-, hmg-	Negatīvs, AGS negatīvs

Nr.	Produkts	Izcelsmes valsts	GMO mērķa organisms	trnL/ taksonam specifisks gēns	p35S, tNOS, <i>pat</i> , tE9, pFMV, Cry1Ab/Ac, AGS (paraugiem, kas satur lasi)
2-32	Laša fileja savā sulā	Latvija (lasis audzēts Norvēģijā/ Skotijā)	lasis	NA	AGS negatīvs
2-33	Sakņaugu un laša biezenis bērniem no 6 mēn.	Francija	lasis, rapsis, kukurūza	trnL-, hmg+/-	tE9+ (arī LecPea1+), kopumā vērtējums - negatīvs, AGS negatīvs
2-34	Lasis ar zaļumiem bērniem no 12 mēn.	Spānija	lasis, rapsis, kukurūza	trnL-	tE9+(arī LecPea1+), kopumā vērtējums - negatīvs, AGS negatīvs
2-35	Dārzeņu biezenis ar lasi	Latvija	lasis	trnL-	AGS negatīvs
2-38	Zaļas olīvas ar laša pastu	Spānija	lasis	trnL+	AGS negatīvs
2-39	Čipsi ar grilētas kukurūzas garšu	Dienvidkoreja	kukurūza	trnL+, hmg+	p35S+, tNOS+/-, pat+, tE9+, pFMV+, Cry1Ab/Ac+
2-40	Aromatizēti siera čipsi	ASV	kukurūza	trnL+, hmg+	p35S+, tNOS+, pat+, tE9+/-, pFMV+/-, Cry1Ab/Ac+/-
2-41	Sausās brokastis, pufi ar zemesriekstu sviestu un kraukšķīgi kukurūzas pufi	ASV	kukurūza	trnL-, hmg+	p35S+, tNOS+, pat+, tE9+/-, pFMV+, Cry1Ab/Ac+
2-42	Čipsi ar zilā siera garšu	ASV	kukurūza	trnL+, hmg+	p35S+, tNOS+, pat+, tE9+/-, pFMV+, Cry1Ab/Ac+
2-43	Kukurūza vārīta 2. šķira	Indija	kukurūza	trnL+, hmg+	negatīvs
2-44	Žāvēta papaija	Taizeme	papaija	trnL-	negatīvs
2-45	Popkorns ar siera garšu	Lietuva, kukurūzas graudu izcelsmes valsts: ES un ārpus ES.	Kukurūza, rapsis	trnL+, hmg+	negatīvs
2-46	Kukurūzas čipsi ar siera garšu	Turcija	kukurūza	trnL+, hmg+	negatīvs
2-47	Uzkodas ar hamburgera garšu	Polija	kukurūza, rapsis	trnL+, hmg+	negatīvs
2-48	Vafeļu konfektes tumšajā šokolādē ar stēviju	Krievija	soja	trnL-, lec+	p35S+, atkārtota reakcija negatīva, vērtējums - negatīvs
2-49	Bezglutēna sausmaizītes	Spānija	kukurūza	trnL+, hmg+	negatīvs
2-51	Kukurūzas nūjiņas ar picas garšu	Rumānija	kukurūza	trnL+, hmg+	negatīvs

Nr.	Produkts	Izcelsmes valsts	ĢMO mērķa organisms	trnL/ taksonam specifisks gēns	p35S, tNOS, <i>pat</i> , tE9, pFMV, Cry1Ab/Ac, AGS (paraugiem, kas satur lasi)
2-52	Biskvīts ar piena šokolādes garšu	Krievija	soja, kukurūza	trnL-, hmg+	negatīvs
2-53	Kūka ar pildījumu ar krējuma garšu	Turcija	soja, kukurūza	trnL+, hmg-	negatīvs
2-54	Cepumi	Moldova	soja, kukurūza	trnL+, hmg+	negatīvs
2-55	Vafeles ar plombīra garšu	Ukraina	soja, kukurūza	trnL+, hmg-	negatīvs

* - negatīvs nozīmē, ka neviens no skrīninga elementiem netika konstatēts, pārējos gadījumos ir norādīts, kuri skrīninga elementi ir konstatēti.

**AGS - Accelerated Growth Salmon

18.tabula
Dzīvnieku barības skrīninga rezultāti

Nr.	Produkts	Izcelsmes valsts	ĢMO mērķa organisms	trnL/ taksonam specifisks gēns	p35S, tNOS, pat, tE9, pFMV, Cry1Ab/Ac, AGS (paraugiem, kas satur lasi)
1-22	Konservēta kaķu barība	Ungārija	lasis	trnL+, hmg+	Negatīvs*
1-24	Konservēta kaķu barība	Spānija	lasis, dārzeņi	trnL+, hmg+, lec+	tE9+
1-28	Suņu cepumi	Ungārija	dārzeņi	trnL+	negatīvs
1-29	Holīna hlorīds, 60 % kukurūza**	Ķīna	kukurūza	hmg+	p35S+, pFMV+/-
2-14	Gardums ar uzpūstiem rīsiem un kviešiem, kukurūzu, auzām un medu grauzējiem	Beļģija	kukurūza, rīsi	trnL+	tE9+ (arī LecPea1+)
2-15	Granulēta kukurūzas ēsma	Lietuva	kukurūza	trnL+	p35S+, tNOS+, pat+, tE9+, pFMV+, Cry1Ab/Ac+
2-16	Kukurūzas sojas maisījums (granulēts) - zivju barība	Lietuva	Kukurūza, soja, rapsis	trnL+	p35S+, tNOS+, pat+, tE9+, pFMV+, Cry1Ab/Ac+
2-22	Tauku bumbas, barība savvaļas putniem ziemā	Polija	saulespuķes, eļļas augi	trnL+	negatīvs
2-36	Konservi kaķiem, laša, vistas gabaliņi mērcē	Francija	lasis	NA	AGS*** negatīvs
2-37	Konservi sterilizētiem kaķiem ar lasi	Čehija	lasis	trnL+	AGS negatīvs
2-50	Suņu barība ar vistu	Ukraina	kukurūza	trnL+, hmg+, lec+, pld+, gs+	p35S+, tNOS+/-, tE9+ (arī LecPea1+), Cry1Ab/Ac+/-

* - negatīvs nozīmē, ka neviens no skrīninga elementiem netika konstatēts, pārējos gadījumos ir norādīts, kuri skrīninga elementi ir konstatēti. ** - tā kā holīna hlorīda un 60 % kukurūzas paraugs sastāv no divām sastāvdaļām, tas ir iekļauts arī šajā tabulā, lai gan pamatā tas pieder pie dzīvnieku barības piedevām. *** - AGS - Accelerated Growth Salmon

19. tabula

ĢMO piemaisījumu kvalitatīva un kvantitatīva noteikšana pozitīvajos pārtikas un barības paraugos

Nr.	Produkts, izcelsmes valsts	ĢMO mērķa organisms	Konstatētie ĢMO notikumi (% m/m $\pm$ SD)	Atbilstība ĢMO regulējumam
1-8	Zīda tofu, ASV	soja	Soja - GTS40-3-2 (0,15 $\pm$ 0,11), A2704 (0,13 $\pm$ 0,006), MON89788 (0,03 $\pm$ 0,012)	Atbilst, jo ĢM sojas piemaisījumu līmenis ir <0,9 % m/m.
1-15	Mīklas maisījums, Dienvidkoreja	kvieši, kukurūza, soja, rīsi	Soja - MON89788 (74,75 $\pm$ 20,94)	Neatbilst , jo ĢM sojas piemaisījumu līmenis ir >0,9 % m/m un produkta marķējumā nav norādīts, ka tas satur ĢMO.
1-24	Konservēta kaķu barība, Spānija	lasis, dārzeņi	Soja - MON89788 (78,74 $\pm$ 9,70)	Neatbilst , jo ĢM sojas piemaisījumu līmenis ir >0,9 % m/m un produkta marķējumā nav norādīts, ka tas satur ĢMO.
2-8	Siers sojas zīda tofu, ASV	soja	Soja - A2704 (< LOQ $\leq$ 0.045)	Atbilst, jo ĢM sojas piemaisījumu līmenis ir <0,9 % m/m.
2-15	Granulēta kukurūzas ēsma, Lietuva	kukurūza	Soja - A2704 (< LOQ $\leq$ 0.045), GTS40-3-2 (6,74 $\pm$ 2,41), MON87701 (0,25 $\pm$ 0,07), MON87708 (3,40 $\pm$ 0,11), MON89788 (<LOQ). Kukurūza - MON863 (<LOQ)	Neatbilst , jo ĢM sojas piemaisījumu līmenis ir >0,9 % m/m un produkta marķējumā nav norādīts, ka tas satur ĢMO.
2-16	Kukurūzas sojas maisījums (granulēts) – zivju barība, Lietuva	Kukurūza, soja, rapsis	Soja - GTS40-3-2 (1,28 $\pm$ 0,05), MON87701 (101,41 $\pm$ 6,67), MON87708 (0,01 $\pm$ 0,00), MON89788 (1,02 $\pm$ 0,20). Kukurūza - MON863 (<LOQ), 89034 (<LOQ)	Neatbilst , jo ĢM sojas piemaisījumu līmenis ir >0,9 % m/m un produkta marķējumā nav norādīts, ka tas satur ĢMO.
2-39	Čipsi ar grilētas kukurūzas garšu, Dienvidkoreja	kukurūza	Kukurūza - TC1507 (0,01 $\pm$ 0,00)	Atbilst, jo ĢM kukurūzas piemaisījumu līmenis ir <0,9 % m/m.
2-40	Aromatizēti siera čipsi, ASV	kukurūza	Kukurūza - MON810 (15,72 $\pm$ 5,84), DAS59122 (0,63 $\pm$ 0,05),	Neatbilst , jo ĢM kukurūzas piemaisījumu līmenis ir >0,9 % m/m un produkta marķējumā nav norādīts, ka tas satur ĢMO.

Nr.	Produkts, izcelsmes valsts	ĢMO mērķa organisms	Konstatētie ĢMO notikumi (% m/m ± SD)	Atbilstība ĢMO regulējumam
			MIR604 (99,80±9,30)	
2-41	Sausās brokastis, pufi ar zemesriekstu sviestu un kraukšķīgi kukurūzas pufi, ASV	kukurūza	Kukurūza - MON810 (28,04±2,64)	Atbilst, jo produkta marķējumā norādīts, ka tas satur ģenētiski modificētas pārtikas izejvielas.
2-42	Čipsi ar zilā siera garšu, ASV	kukurūza	Kukurūza - DAS59122 (71,36±13,27), MIR604 (7,70±2,26)	Neatbilst , jo ĢM kukurūzas piemaisījumu līmenis ir >0,9 % m/m un produkta marķējumā nav norādīts, ka tas satur ĢMO.
2-50	Suņu barība ar vistu, Ukraina	kukurūza	PSP-MAI-1-A un PSP-SOY-1-A negatīvs, MON71200 negatīvs; H7-1 negatīvs, LLRICE62 negatīvs.	Galīgais vērtējums – negatīvs.

20.tabula
RI PĶR un dPĶR rezultātu salīdzinājums

Nr.	ĢMO notikums	RI PĶR rezultāts, % m/m	dPĶR rezultāts, % m/m
1-8	GTS40-3-2	0,15±0,11	0,16±0,10
2-15	GTS40-3-2	6,74±2,41	32,47±19,42
2-16	GTS40-3-2	1,28±0,05	5,85±0,02
2-40	MON810	15,72±5,84	20,11±4,44
2-41	MON810	28,05±2,64	40,26±0,49

21.tabula

Pārtikas un dzīvnieku barības piedevu un uztura bagātinātāju paraugi un to izmeklējumu rezultāti

Nr.	Produkts, izcelsmes valsts	Produkta sastāvs	DNS koncentrācija, ng/μl	trnL/ taksonam specifisks gēns	p35S, tNOS, pat, tE9, pFMV, Cry1Ab/Ac, nptII	GMM markieri 558, cat, tetL, aad paraugā (Ct)	Sekvenēšanas rezultāti – amplifikācijas produkti 16S, ITS1 (%)	<i>Bacillus</i> spp. kultūra (konstatētie GMM markieri (Ct))
1-29	Holīna hlorīds, 60 % kukurūza, Ķīna	Holīna hlorīds, 60 % kukurūza.	34,12±15,78	hmg+	p35S+, pFMV+/-, nesatur nevienu no 21 kukurūzas līnijas	tetL+ (39), cat+ (39), aad+ (37)	<i>Bacillus</i> sp. (0,45%), <i>Corynebacterium</i> sp. (0,01 %), <i>Nectriacea</i> dzimtas sēnes (44,34 %)	<i>B. cereus</i> (nav), <i>B. pumilis</i> (tetL, (40), aad (39)), <i>Brevibacillus laterosporus</i> (tetL, (39), aad (38))
2-1	Augu izcelsmes enzīmu maisījums suņiem, ASV	Proteāze, amilāze, diastāze, lipāze, celuloze, bromelīns, beta-glukonāze, peptidāze, hemiceluloze, kalcija helāts, magnija helāts, magnija oksīds, vara glicināta helāts, mangāns, biešu sakņu šķiedra.	2,10±1,00	trnL-, lec+	negatīvs	negatīvs	<i>Lactobacillus plantarum</i> (16,87 %), <i>Bacillus</i> sp. (0,71 %), ITS1 amplifikācijas nav.	<i>Bacillus</i> spp. kultūras nav iegūtas.
2-17	L-Arginīns kapsulās, Lielbritānija	L- Arginīns, silīcija dioksīds, magnija stearāts, želatīns.	2,57±1,09	trnL-, lec+	p35S+/-, tNOS+, nesatur nevienu no 15 sojas līnijām	aad+ (38)	<i>Tepidiphilus</i> (19,94 %), <i>Anoxybacillus</i> (10,48 %), <i>Bacillus</i> sp. (9,81 %)	<i>B. subtilis</i> (tetL (40))
2-18	L-Lizīns tabletēs, Lielbritānija	L-lizīns, mikrokristāliska celuloze, kalcija fosfāts, magnija stearāts.	4,93±4,83	trnL-, lec+	negatīvs	aad+ (36)	<i>Lactobacillus</i> sp. (9,12 %), <i>Anaerobacillus</i> sp.	<i>Bacillus</i> spp. kultūras nav iegūtas.

Nr.	Produkts, izcelsmes valsts	Produkta sastāvs	DNS koncentrācija, ng/μl	trnL/ taksonam specifisks gēns	p35S, tNOS, pat, tE9, pFMV, Cry1Ab/Ac, nptII	ĢMM marķieri 558, cat, tetL, aad paraugā (Ct)	Sekvenēšanas rezultāti – amplifikācijas produkti 16S, ITS1 (%)	<i>Bacillus</i> spp. kultūra (konstatētie ĢMM marķieri (Ct))
							(4,00 %), <i>Corynebacterium</i> sp. (0,02-1,38 %)	
2-19	Vitamīns B2 tabletēs, Lielbritānija	B2 vitamīns, mikrokristāliska celuloze, kalcija fosfāts, magnija stearāts.	14,78±0,88	trnL-, lec+	negatīvs	negatīvs	<i>Anaerobacillus</i> sp. (5,68 %) , <i>Bacillus</i> sp. (0,14 %)	<i>Bacillus</i> spp. kultūras nav iegūtas.
2-23	Papildu minerālbarība govīm, Polija	Beta karotīns, vitamīns A, vitamīns D ₃ , vitamīns E, vitamīns B ₆ , vitamīns B ₁₂ , biotīns, tokoferols. Mikro un makro elementi. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> MUCL 39885 – 1,5 x10 ¹⁰ KVV/kg.	3,80±2,12	Nav testēts	negatīvs	negatīvs	<i>Bacillus</i> spp. (4,15 %), no kuriem <i>B. licheniformis</i> 3,64 %, <i>Saccharomyces</i> sp. (99,14 %)	<i>Bacillus licheniformis</i> (marķieri nav atrasti)
2-24	Papildbarība slaucamām govīm, Polija	Kalcijs, fosfors, nātrijs, magnijs, sērs, A vitamīns, D ₃ vitamīns, E vitamīns, biotīns, niacīns, cinks, mangāns, varš, kobalts, jods, selēns, žāvēts raugs.	3,78±0,59	Nav testēts	negatīvs	negatīvs	<i>Staphylococcus</i> sp. (5,02 %), <i>Bacillus</i> sp. (0,21%)	<i>Bacillus</i> spp. kultūras nav iegūtas.
2-56	L-Lizīna pulveris, Lielbritānija	L-lizīns (kā hidrohlorīds)	35,90±22,13	Nav testēts	negatīvs	negatīvs	<i>Bacillus</i> sp. (2,79 %), <i>Corynebacterium</i> sp. (0,10 %)	<i>Bacillus</i> spp. kultūras nav iegūtas.

Nr.	Produkts, izcelsmes valsts	Produkta sastāvs	DNS koncentrācija, ng/μl	trnL/ taksonam specifisks gēns	p35S, tNOS, pat, tE9, pFMV, Cry1Ab/Ac, nptII	ĢMM marķieri 558, cat, tetL, aad paraugā (Ct)	Sekvenēšanas rezultāti – amplifikācijas produkti 16S, ITS1 (%)	<i>Bacillus</i> spp. kultūra (konstatētie ĢMM marķieri (Ct))
2-57	L-Lizīna pulveris, Polija	L-lizīns (kā hidrohlorīds), var saturēt soju u.c. piemaisījumus no ražošanas vides.	80,1±104,16	Nav testēts	negatīvs	negatīvs	<i>Bacillus</i> sp. (1,65 %), <i>Corynebacterium</i> sp. (0,65 %)	<i>Bacillus</i> spp. kultūras nav iegūtas.
2-58	L-Arginīns ar apelsīnu garšu, Polija	L-Arginīns, var saturēt soju u.c. piemaisījumus no ražošanas vides.	1,95±1,63	Nav testēts	negatīvs	negatīvs	16S, ITS1 amplifikācijas nav	<i>Bacillus</i> spp. kultūras nav iegūtas.
2-59	L-Karnitīns ar hromu kapsulās, Ungārija	L-carnitine, L-tartrate (85%), kapsulai želatīns u.c., hroma (III) hlorīds 0,006%.	0,65±0,07	Nav testēts	negatīvs	negatīvs	<i>Bacillus</i> sp. (2,62 %)	<i>Bacillus</i> spp. kultūras nav iegūtas.
2-60	L-Leicīns, L-Izoleicīns, L-Valīns, Vitamīns B ₆ kapsulās, Ungārija	BCAA 2:1:1 - L-Leicīns, L-Izoleicīns, L-Valīns, Vitamīns B ₆ . Satur lecitīnu u.c.	1,55±0,07	Nav testēts	negatīvs	negatīvs	<i>Bacillus</i> sp. (3,96 %), <i>Corynebacterium</i> sp. (0,4 %)	<i>Bacillus</i> spp. kultūras nav iegūtas.
2-61	Sorbīts, Spānija	Sorbīts (E420), mannīts	6,25±1,20	Nav testēts	Nav testēts	Nav testēts	16S, ITS1 amplifikācijas nav	<i>B. pumilis</i>
2-62	Citronskābe, Ķīna	Citronskābe	4,25±0,64	Nav testēts	Nav testēts	Nav testēts	<i>Bacillus</i> sp. (1,02 %), ITS1 amplifikācijas nav	<i>Bacillus</i> spp. kultūras nav iegūtas.

2.2. Jaunu zinātniski analītisko metožu izmantošana darbā ar modeļorganismiem

Lai praktiski izmēģinātu genoma modifikāciju noteikšanu ar NGS, šī projekta ietvaros tika veikts sekojošs eksperiments ar modeļorganismiem. Eksperimenta mērķis bija raksturot ar ātro neitronu (*fast neutron*) apstarošanu iegūtas nezināmas delēcijas miežu *nec1* gēnā (Rostoks et al., 2006):

- Amplificēt *nec1* gēna fragmentus, izmantojot praimerus, kas norādīti 22. tabulā;
- Iegūtos PĶR produktus, kuru sagaidāmais garums ir dots 23. tabulā, sekvenēt ar Sangeru sekvenēšanu vai Illumina MiSeq;
- Raksturot mutantu *nec1* gēna sekvences.

Eksperimentā izmantotie paraugi:

1. *Hordeum vulgare* Cv. 'Steptoe' G13;
2. *Hordeum vulgare* FN085 (*nec1* delēcijas mutants šķirnē Steptoe);
3. *Hordeum vulgare* Cv. 'Morex' (tālāk tekstā un attēlos apzīmēts arī kā MX);
4. *Hordeum vulgare* FN338 (*nec1* delēcijas mutants šķirnē Morex).

22. tabula

Oligonukleotīdi FN338 delēcijas kartēšanai. Visas nukleotīdu pozīcijas norādītas uz GenBank LR812970.1 *Hordeum vulgare* cv. 'Morex' 1H hromosomas pseidomolekulas

N.p.k.	Nosaukums	Sekvence	Koordinātes
1	abc26333_L29	CACCTCTGCCTCGACCTCGT	441547983-441547964
2	abc26333_R29	ACACCTCCGTGCTCTCCAGC	441547561-441547580
3	abc26333_R61	GCTCGAACCCTAAAGCGGAT	441540049-441540067
4	abc26333_R62	CGACCACATACCTCCACGGT	441544064-441544083
5	abc26333_R63	TTCCCCAACTCTAGCTTCTTGA	441546599-441546621
6	abc26333_L61	CTTGCCATGCCACCACCTAC	441553964-441553945
7	abc26333_L21	TTCAGGCTTCCAAAAGCCCA	441552510-441552491
8	abc26333_L62	CACGTTCATAGCCGTGAGCC	441554586-441554567
9	abc26333_L63	GCTAGCCGCGACATAACACC	441556751-441556732

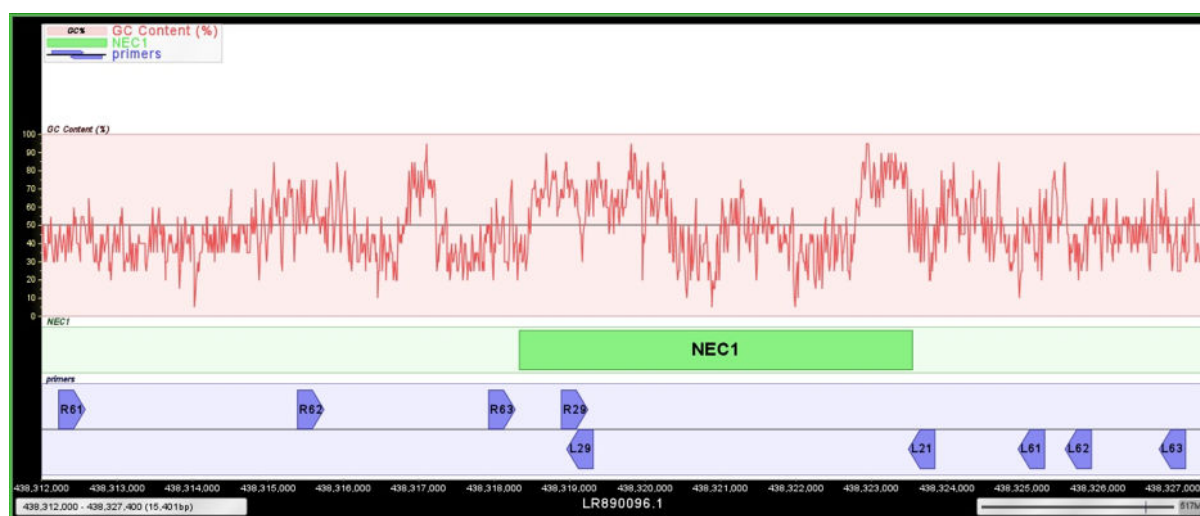
23. tabula

Sagaidāmais amplificēto fragmentu garums

Praimeru kombinācijas PCR		Garums (Morex), bp
PCR L	PCR R	
abc26333_L29	abc26333_R29	423
abc26333_L29	abc26333_R61	7935
abc26333_L29	abc26333_R62	3920
abc26333_L29	abc26333_R63	1385
abc26333_L61	abc26333_R29	6404
abc26333_L21	abc26333_R29	4950
abc26333_L62	abc26333_R29	7026
abc26333_L63	abc26333_R29	9191

Vispirms tika veikta *nec1* gēna reģiona identifikācija šķirnes 'Morex' V3 genoma sekvencē (GenBank LR890096.1, koordinātas 438318333-438323541 pēc BLAST rezultāta ar

AY972619.1 sekvenci (Rostoks et al., 2006)) ar vizualizētu GC saturu un praimeru saistīšanās vietām analizējamajā fragmentā, izmantojot programmu MochiView v1.45 (Homann and Johnson, 2010) (14. attēls).



14. attēls. *nec1* gēna reģiona identifikācija ‘Morex’ V3 genoma sekvencē (GenBank LR890096.1, koordinātas 438318333-438323541 pēc BLAST rezultāta ar AY972619.1 sekvenci (Rostoks et al., 2006)) ar vizualizētu GC saturu un praimeru saistīšanās vietām analizējamajā fragmentā, izmantojot programmu MochiView v1.45 (Homann and Johnson, 2010).

Pēc tam tika veikta *in silico* PCR, izmantojot programmu CLC Genomics Workbench 12.0, lai novērtētu iespējamās praimeru kombinācijas. Izmantojot programmas noklusējuma *in silico* PCR apstākļus, visā 1H hromosomas sekvencē tika atrastas ļoti daudzas potenciālās praimeru saistīšanās vietas, un potenciālus PCR produktus ar vienu un to pašu praimeru abos galos, ko varētu izskaidrot ar to, ka abās *nec1* gēna pusēs ir atkārtojumi (retrotranspozoni).

Retrotranspozoni pieder pie mobilajiem ģenētiskajiem elementiem (Wicker et al., 2007). Mobilos elementus genoma sekvencēs var identificēt, atrodot tiem raksturīgos sekvenču atkārtojumus. Visiem mobilajiem ģenētiskajiem elementiem ir raksturīgi īsi tiešie atkārtojumi abos galos – insercijas vietas duplikācijas. Papildus šajai insercijas vietas duplikācijai var būt arī garāki tiešie atkārtojumi vai apgrieztie atkārtojumi (Lodish et al., 2016).

Retrotranspozonu meklēšana tika veikta ar programmu Generic Repeat Finder (Shi and Liang, 2019), ar kuras palīdzību var meklēt terminālos tiešos atkārtojumus (Terminal direct repeats (TDR), terminālos invertētos atkārtojumus (Terminal inverted repeats, TIR), īsus invertētos atkārtojumus (Miniature inverted-repeat transposable elements, MITE), kuru minimālais atkārtoto elementu garums ir 10. Tika konstatēts, ka visām praimeru saistīšanās pozīcijām 1. hromosomā (LR890096.1 *Hordeum vulgare* subsp. *vulgare* genome assembly, chromosome: 1H) atbilst vismaz daži potenciāli atkārtojumi, ja atkārtojumu sekvencēs tiek pieļautas nelielas nesakritības (*mismatches*). MITE esamība miežu *nec1* gēnā ir konstatēta arī sakotnējā pētījumā vienā no mutantiem, kas nav iekļauts šajā projektā (Rostoks et al., 2006).

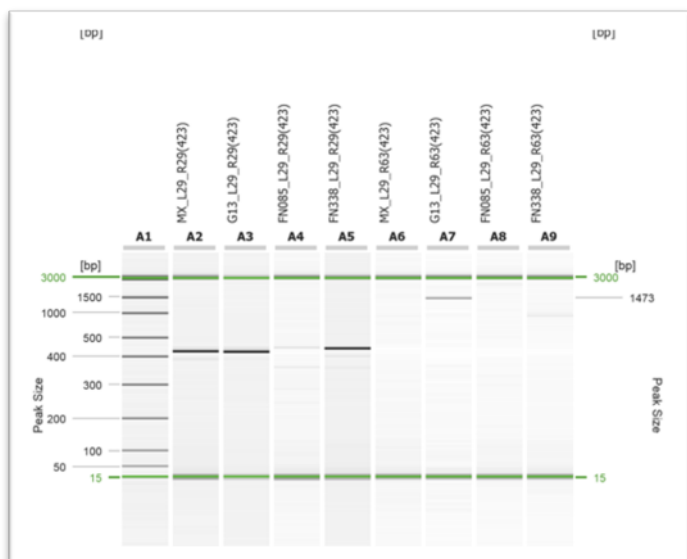
Eksperimentā izmantoto paraugu graudi tika izdiedzēti LU Bioloģijas fakultātē, pēc tam nogādāti uz BIOR, kur no tiem tika izdalīta DNS. Informācija par analizēto paraugu lapu un sakņu masu, DNS koncentrāciju un tīrību ir dota 23. tabulā.

Tika iegūti īsāki fragmenti (15. attēls), kuru sekvenēšanai bija iespējams izmantot Sangera sekvenēšanas metodi, kā arī garāki fragmenti (16. attēls), kuru sekvenēšanai tika izmantota NGS.

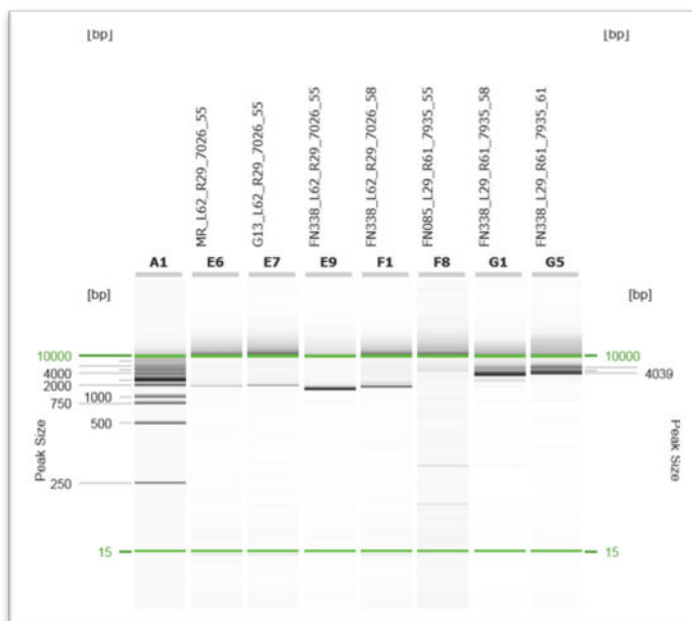
23. tabula

Izdalītās DNS koncentrācija un tīrība (DNS izdalīta ar NucleoSpin Food Mini kit un DNeasy *mericon* Food kit)

Mieži	FN085	MX	MX	FN338	G13	G13	G13 (<i>mericon</i>)
Lapu un sakņu materiāla masa, mg	155.8	204	106	169.5	209	213	220
260/280	2.09	2.10	2.11	2.08	2.11	2.11	1.88
260/230	1.93	2.10	2.18	2.36	2.35	2.36	2.07
ng/μL	80.3	161.5	197.6	1798.6	2960.4	2852.4	49.4



15. attēls. Iegūtie fragmenti sekvenēšanai. A2 - MX, A3 - G13 un A5 - FN338, izmantojot praimerus L29 un R29 (fragmenta garums apmēram 423 bp); A7 - G13 izmantojot praimerus L29 un R63 (fragmenta garums apmēram 1385 bp).



16. attēls. Iegūtie fragmenti sekvenēšanai - ar praimeriem L62-R29 'Morex' (E6) un 'Steptoe' (E7), ar praimeriem L62-R29 FN338 (E9 un F1) un ar praimeriem L29-R61 FN338 (G1 un G5).

Tika iegūtas sekojošas sekvenses:

>Consensus_MX_L29_R29

TTTACCTCTGCCTCGACCTCGTCCGCCAGGTGCCCCTCTTCCACCACATGGACGACCTCGTCCTCGAG
AACATGTGCGACCGGGTCCGCTCCCTCATCTACCCCAAGGGCGAGACAGTAAGTAGTCCAGTGACG
AACCAAATCAGATTGAATGTTTTCGTGTGTGTGTGTTTGATCATCGTCCATGCGTGCATGCATGCAT
GCAGATCGTGCGGGAAGGTGACCCGGTGCAGCGGATGGTGTTTCATCGTGCGGGGGGCACCTGCAGT
GCAGCCAGGAGCTGCGGAACGGGGGGACGAGCTGCTGCATGCTGGGGCCGGGCAACTTCACGGG
CGACGAGCTGCTGCCGTGGTGCTGCGGCGGCCGTTTCGCGGAGCGGCTGCCGGCGTCTGTCGTCGAC
GCTGGTGACGCTGGAGAGCACGGAGGTA

>Consensus_G13_L29_R29

TTACCTCTGCCTCGACCTCGTCCGCCAGGTGCCCCTCTTCCACCACATGGACGACCTCGTCCTCGAGA
ACATGTGCGACCGGGTCCGCTCCCTCATCTACCCCAAGGGCGAGACAGTAAGTAGTCCAGTGACGA
ACCAAATCAGATTGAATGTTTTCGTGTGTGTGTGTTTGATCATCGTCCATGCGTGCATGCATGCATGC
AGATCGTGCGGGAAGGTGACCCGGTGCAGCGGATGGTGTTTCATCGTGCGGGGGGCACCTGCAGTGC
AGCCAGGAGCTGCGGAACGGGGGGACGAGCTGCTGCATGCTGGGGCCGGGCAACTTCACGGGGCG
ACGAGCTGCTGCCGTGGTGCTGCGGCGGCCGTTTCGCGGAGCGGCTGCCGGCGTCTGTCGTCGACGC
TGGTGACGCTGGAGAGCACGGAGGTGT

>Consensus_FN338_L29_R29

CACCTCTGCCTCGACCTCGTCCGCCAGGTGCCGCTCTTCCACCACATGGACGACCTCGTGCTCGACAA
CATCTGCGACAGGGTCAAGTCCCTCGTCTTCCCAAGGGAGAAGTGGAACAGCCAAGCCCATGC
AAAAACAAAAACAAAAACGTCTCCATTGATTCTCGTAGAAGCTGCTCGCCTGGTGACCTTGCTTCTG
CATGCATGCGCAGATCGTGAGGGAAGGCGACCCGGTGCAGGAGGATGGTGTTTCATCGTGCGGGGGC
ACCTGGAGAGCAGCCAGGCGCTGCGGAACGGCGGGACGAGCTGCTGCATGCTGGGGCCGGGGAA
CTTCAGCGGGGACGAGCTGCTGTCGTGGTGCTGCGGCGGCCGTTCCAGGAGCGGCTGCCGGCGG
CGTCGTCGACGCTGGCGACGCTGGAGAGCACGGAGGTG

>Consensus_G13_L29_R63

CATGTGCGACCGGGTCCGCTCCCTCATCTACCCCAAGGSCKWTKTWCAGKAAGTAGTCCAGTGACG
AACCAAATCAGATTGAATGTTTTCGTGTGTGTGTGTTTGATCATCGTCCATGCGTGCATGCATGCAT
GCAGATCGTGCGGGAAGGTGACCCGGTGCAGCGGATGGTGTTTCATCGTGCGGGGGGCACCTGCAGT
GCAGCCAGGAGCTGCGGAACGGGGGGACGAGCTGCTGCATGCTGGGGCCGGGCAACTTCACGGG
CGACGAGCTGCTGCCGTGGTGCTGCGGCGGCCGTTTCGCGGAGCGGCTGCCGGCGTCTGTCGTCGAC
GCTGGTGACGCTGGAGAGCACGGAGGTGTTTCGGGTTGGGAGGGCGGCGGACGTCAAGTACGTGA
CGCAGCACTTCCGCTACACCTTCACCAACGAGCGGGTGCAGCGGAGCGCGCGCTACTACTCGCCCCG
GRGTGGCGCACATGGGGCCGCCGTGGCCGTGCAGCTCGCGTGCGGACGCTWCAAGCACCGCAAGAC
GCTCTCGTCTCTCTTTCATCCGCCCGCGCCGGCCGCTCTCCCGGTGCTCGTCTGCTCGGCGAGGAG
AAGCTCCGGCTCTACACCGCCATCTCGCCTCGCCCAAGCCCAACCAGGACGACGGCTTCTAGTTCC
AGACCACCGGCCGTGAACTGCAGTTGGCGAGGGAGCTCTTTCGCGCTCTCGCGCACGGGACACGGA
TGCCCTGCCTGCTGCTGTGTGCAGCCGGGCGTCAGGAAWTGGGACCAAGTGATGGATACGTTTTGTC
CTCCTCGCAGGAAMCTTGAATCTGCAAATGATGAGTAGTWAGAAGTATCTTTTTTCATGGGGACATG
AATTGTGAATCTCATACTGTGTGTTTATATGGAGCAAAAAGTGAATCCCGTATTATTGGGTAAACGA
AGCAAATAGTCTCCMAAAGTTTCTATCATTAGATTTCRGCACTGGSMAAGAACACATCGAAAGTCGTT
GKTAGTATAGTGGGTAAAGTATTCCCCGCCYTGKTACGSCGGRGGTGAACYCCGGTTCGAATCYCCC
GGCAACGGCCGAAATTTTTTTCTCTTTTTTTAGCGGATAATTTTTTTTCSGTTTKCCSGAATTTTCCC

TYCCGTTTTCTCCKTCTWTTTGKTCTTCCAMWWWAGTACTCCCTCCGTTTCSTAAGGGCCTCTTAGG
AACTGTTCTGCTCCTTAAAATTCAGCTCTGCTCCTTAAAAGACAAACCAAACGGG

Sākotnēji iegūto sekvenču BLAST analīze, izmantojot NCBI datu bāzi, tika veikta 17.06.2021. Šķirņu 'Morex' un 'Steptoe' G13 fragmenti (423 bp), kas bija iegūti ar praimeriem L29 un R29, bija 100% identiski ar attiecīgo reģionu 1H hromosomā (NCBI sekvences ID LR890096.1), bet FN338 fragments uzrādīja 100% identitāti ar reģionu no 3H hromosomas (sekvences ID LR890098.1) (17.-19. attēli). 1H hromosomas sekvenca LR890096.1 ir izveidota no garajiem nolasījumiem no miežu šķirnes 'Morex', kas iegūti ar PacBio sekvenatoru, un bija iesniegta NCBI datu bāzē 09.10.2020. (Mascher et al., 2017; Mascher et al., 2021). Veicot atkārtotu BLAST analīzi 11.11.2021., tika konstatēts, ka iegūtajai 'Morex' sekvencai ar praimeriem L29 un R29 ir 100 % identitāte (19. attēls) ar iepriekš publicētajām šķirnes 'Parkland', kā arī 'Steptoe' un 'Morex' subklona NRG098 sekvencēm (Rostoks et al., 2006). Sekvences atbilda *nec1* gēnam (*cyclic nucleotide-gated ion channel 4*). Identisiki rezultāti tika iegūti sekvencai 'Steptoe' G13 ar praimeriem L29 un R29. Veicot atkārtotu BLAST analīzi mutanta FN338 fragmentam 11.11.2021., tika konstatēts, ka NCBI datu bāzē nav līdzīgu sekvenču ar augstu ticamību (20. attēls). Ar praimeriem L29 un R29 iegūto fragmentu savstarpējs salīdzinājums ir dots 21. attēlā, kur redzams, ka FN338 atšķiras ar piecu un sešu nukleotīdu inserciju divās vietās, kā arī vēl ar vienu nukleotīda inserciju.

Ar praimeriem L29 un R63 fragments (1385 bp) tika iegūts tikai G13 miežiem. Iegūtajās sekvencēs bija vairāki nenoteikti nukleotīdi. Bija vietas, kur vienlaicīgi tika konstatēti fluorescences signāli, kas atbilst vairākiem nukleotīdiem, kas varētu nozīmēt, ka augs ir heterozigotisks. Šim fragmentam 17.06.2021. veiktajā NCBI BLAST analīzē tika konstatēti līdzīgi fragmenti arī citās hromosomās, ne tikai H1 (22. attēls). To varētu skaidrot ar to, ka *nec1* gēns pieder pie radniecīgu gēnu saimes. Veicot atkārtotu analīzi 11.11.2021., tika konstatēts, ka NCBI datu bāzē augstākā šīs sekvences līdzība ir ar iepriekš publicētajām šķirnes 'Parkland', kā arī 'Steptoe' un 'Morex' subklona NRG098 sekvencēm (Rostoks et al., 2006) (23. attēls).

Hordeum vulgare subsp. vulgare genome assembly, chromosome: 1H				
Sequence ID: LR890096.1 Length: 516505932 Number of Matches: 1				
Range 1: 438318891 to 438319310 GenBank Graphics			▼ Next Match ▲ Previous Match	
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
776 bits(420)	0.0	420/420(100%)	0/420(0%)	Plus/Minus
Query 4	ACCTCTGCCTCGACCTCGTCCGCCAGGTGCCCTCTTCCACCATGGACGACCTCGTCC	63		
Sbjct 438319310		438319251		
Query 64	TCGAGAACATGTGCGACCGGGTCCGCTCCCTCATCTACCCCAAGGGCGAGACAGTAAGTA	123		
Sbjct 438319250		438319191		
Query 124	GTCCAGTGACGAACCAATCAGATTGAATGTTtgcgtgtgtgtgtgtttgatcatcgtcc	183		
Sbjct 438319190		438319131		
Query 184	atgcgtgcatgcatgcatgcagatcGTGCGGGAAGGTGACCCGGTGACGCGGATGGTGTT	243		
Sbjct 438319130		438319071		
Query 244	CATCGTGCGGGGGCACCTGCAGTGCAGCCAGGAGCTGCGGAACGGGGGACGAGCTGCTG	303		
Sbjct 438319070		438319011		
Query 304	CATGCTGGGGCCGGGCAACTTCACGGGCGACGAGCTGCTGCCGTGGTGCCTGCGGCGGCC	363		
Sbjct 438319010		438318951		
Query 364	GTTGCGGGAGCGGCTGCCGGCGTCGTCGTCGACGCTGGTGACGCTGGAGAGCACGGAGGT	423		
Sbjct 438318950		438318891		

17. attēls. Šķirnes 'Morex' fragmenta, kas iegūts ar praimeriem L29 un R29, salīdzinājums ar attiecīgo reģionu 1H hromosomā, izmantojot NCBI datu bāzi. Sekvenca LR890096.1 iegūta no garajiem nolasījumiem no miežu šķirnes 'Morex', kas iegūti ar PacBio sekvenatoru.

Sequence ID: [LR890096.1](#) Length: 516505932 Number of Matches: 1

Range 1: 438318889 to 438319310 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
780 bits(422)	0.0	422/422(100%)	0/422(0%)	Plus/Minus
Query 3		ACCTCTGCCTCGACCTCGTCCGCCAGGTGCCCTCTTCCACCACATGGACGACCTCGTCC		62
Sbjct 438319310				438319251
Query 63		TCGAGAACATGTGCGACCGGGTCCGCTCCCTCATCTACCCCAAGGGCGAGACAGTAAGTA		122
Sbjct 438319250				438319191
Query 123		GTCCAGTGACGAACCAAATCAGATTGAATGTTtgctgtgtgtgtgtttgatcatcgtcc		182
Sbjct 438319190				438319131
Query 183		atgctgtgcatgcatgcatgcagatcGTGCGGGAAGGTGACCCGGTGCAGCGGATGGTGTT		242
Sbjct 438319130				438319071
Query 243		CATCGTGCGGGGGCACCTGCAGTGCAGCAGGAGCTGCGGAACGGGGGACGAGCTGCTG		302
Sbjct 438319070				438319011
Query 303		CATGCTGGGGCCGGGCAATTCACGGGCACGAGCTGCTGCCGTGGTGCCTGCGGCGGCC		362
Sbjct 438319010				438318951
Query 363		GTTGCGGAGCGGCTGCCGGCGTCGTCGTCGACGCTGGTGACGCTGGAGAGCACGGAGGT		422
Sbjct 438318950				438318891
Query 423		GT 424		
Sbjct 438318890		.. 438318889		

18. attēls. Šķirnes 'Steptoe' G13 fragmenta, kas iegūts ar praimeriem L29 un R29, salīdzinājums ar attiecīgo reģionu 1H hromosomā.

Hordeum vulgare subsp. vulgare genome assembly, chromosome: 3H

Sequence ID: [LR890098.1](#) Length: 621516506 Number of Matches: 1

Range 1: 511250379 to 511250810 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
798 bits(432)	0.0	432/432(100%)	0/432(0%)	Plus/Minus
Query 1	CACCTCTGCCTCGACCTCGTCCGCCAGGTGCCGCTCTTCCACCACATGGACGACCTCGTG	60		
Sbjct 511250810		511250751		
Query 61	CTCGACAACATCTGCGACAGGGTCAAGTCCCTCGTCTTCCCAAGGGAGAAGTGGTAACC	120		
Sbjct 511250750		511250691		
Query 121	AGCCAAGCccatgcaaaaaacaaaaacaaacgtcTCCATTGATTCTCGTAGAAGCTGC	180		
Sbjct 511250690		511250631		
Query 181	TCGCCTGGTGACCTTGCTTCTGCATGCATGCGCAGATCGTGAGGGAAGGCGACCCGGTGC	240		
Sbjct 511250630		511250571		
Query 241	GGAGGATGGTGTTTCATCGTGCGGGGGCACCTGGAGAGCAGCCAGGCGCTCGCGAACGGCG	300		
Sbjct 511250570		511250511		
Query 301	GGACGAGCTGCTGCATGCTGGGGCCGGGGAAC TTCAGCGGGGACGAGCTGCTGTCGTGGT	360		
Sbjct 511250510		511250451		
Query 361	GCCTGCGGGCGCCGTTCCAGGAGCGGCTGCCGGCGGCGTCGTCGACGCTGGCGACGCTGG	420		
Sbjct 511250450		511250391		
Query 421	AGAGCACGGAGG	432		
Sbjct 511250390		511250379		

19. attēls. *nec1* delēcijas mutanta šķirnē 'Morex' FN338 fragmenta, kas iegūts ar praimeriem L29 un R29, salīdzinājums ar attiecīgo reģionu 3H hromosomā (sekvences ID LR890098.1).

BLAST® » blastn suite » results for RID-STFWONXE013

Home Recent Results Saved Strategies Help

[< Edit Search](#) [Save Search](#) [Search Summary](#) [How to read this report?](#) [BLAST Help Videos](#) [Back to Traditional Results Page](#)

Job Title: **'Morex' L29_R29**

RID: [STFWONXE013](#) Search expires on 11-12 14:00 pm [Download All](#)

Program: BLASTN [Citation](#)

Database: nt [See details](#)

Query ID: lcl|Query_12429

Description: None

Molecule type: dna

Query Length: 424

Other reports: [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#)

Filter Results

Organism: only top 20 will appear ☐ exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[+ Add organism](#)

Percent Identity: to E value: to Query Coverage: to

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

Sequences producing significant alignments Download [New Select columns](#) Show 100 [?](#)

☒ select all 84 sequences selected

[GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [New MSA Viewer](#)

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Parkland cyclic nucleotide-gated ion channel 4 (Nec1)...	Hordeum vulg...	776	776	99%	0.0	100.00%	2305	AY972627.1
☒	Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Steptoe cyclic nucleotide-gated ion channel 4 (Nec1)...	Hordeum vulg...	776	776	99%	0.0	100.00%	2308	AY972624.1
☒	Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Morex subclone NRG098 cyclic nucleotide-gated ion...	Hordeum vulg...	776	776	99%	0.0	100.00%	9090	AY972619.1

19. attēls. Šķirnes 'Morex' fragmenta, kas iegūts ar prameriem L29 un R29, salīdzinājums ar iepriekš publicētajām sekvencēm NCBI datu bāzē.

Job Title: **FN338_L29_R29**

RID: [STHACHYC016](#) Search expires on 11-12 14:25 pm [Download All](#)

Program: BLASTN [Citation](#)

Database: nt [See details](#)

Query ID: lcl|Query_39547

Description: None

Molecule type: dna

Query Length: 434

Other reports: [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#)

Filter Results

Organism: only top 20 will appear ☐ exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[+ Add organism](#)

Percent Identity: to E value: to Query Coverage: to

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

Sequences producing significant alignments Download [New Select columns](#) Show 100 [?](#)

☒ select all 73 sequences selected

[GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [New MSA Viewer](#)

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein, complete cds, clone: NIAHv3098P13	Hordeum vulgar...	403	615	76%	7e-108	100.00%	2396	AK375593.1
☒	PREDICTED: Triticum aestivum cyclic nucleotide-gated ion channel 4-like (LOC123062255), mRNA	Triticum aestivum	364	548	76%	3e-96	96.79%	2586	XM_044485700.1
☒	PREDICTED: Triticum dicoccoides cyclic nucleotide-gated ion channel 4-like (LOC119269216), mRNA	Triticum dicocco...	359	543	76%	2e-94	96.33%	2573	XM_037551009.1
☒	PREDICTED: Triticum aestivum cyclic nucleotide-gated ion channel 4-like (LOC123079385), mRNA	Triticum aestivum	353	543	76%	7e-93	95.87%	2279	XM_044502154.1
☒	PREDICTED: Aegilops tauschii subsp. stragulata cyclic nucleotide-gated ion channel 4 (LOC109769371),...	Aegilops tauschi...	353	543	76%	7e-93	95.87%	2451	XM_020328119.2
☒	PREDICTED: Triticum aestivum cyclic nucleotide-gated ion channel 4-like (LOC123071011), transcript vari...	Triticum aestivum	342	543	76%	2e-89	94.95%	2672	XM_044494468.1
☒	PREDICTED: Triticum aestivum cyclic nucleotide-gated ion channel 4-like (LOC123071011), transcript vari...	Triticum aestivum	342	543	76%	2e-89	94.95%	2662	XM_044494467.1
☒	PREDICTED: Triticum dicoccoides cyclic nucleotide-gated ion channel 4-like (LOC119277223), mRNA	Triticum dicocco...	337	532	76%	7e-88	94.50%	2578	XM_037558475.1
☒	Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Parkland cyclic nucleotide-gated ion channel 4 (Nec1) gene, exon...	Hordeum vulgar...	335	478	78%	3e-87	92.41%	2305	AY972627.1
☒	Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Steptoe cyclic nucleotide-gated ion channel 4 (Nec1) gene, exons...	Hordeum vulgar...	335	478	78%	3e-87	92.41%	2308	AY972624.1
☒	Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Morex subclone NRG098 cyclic nucleotide-gated ion channel 4 (N...	Hordeum vulgar...	335	478	78%	3e-87	92.41%	9090	AY972619.1

20. attēls. Mutanta FN338 fragmenta, kas iegūts ar prameriem L29 un R29, salīdzinājums ar iepriekš publicētajām sekvencēm NCBI datu bāzē.

[< Edit Search](#)
[Save Search](#)
[Search Summary](#)

[How to read this report?](#)
[BLAST Help Videos](#)
[Back to Traditional Results Page](#)

Job Title G13_L29_R63
RID [STJAPUHA016](#) Search expires on 11-12 14:42 pm [Download All](#)
Program BLASTN [Citation](#)
Database nt [See details](#)
Query ID lcl|Query_23183
Description None
Molecule type dna
Query Length 1248
Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#)

Filter Results

Organism only top 20 will appear ☐ exclude

[+ Add organism](#)

Percent Identity to
E value to
Query Coverage to

[Filter](#)
[Reset](#)

Descriptions
Graphic Summary
Alignments
Taxonomy

Sequences producing significant alignments
[Download](#)
[Select columns](#)
[Show](#) 100

☒ select all 89 sequences selected

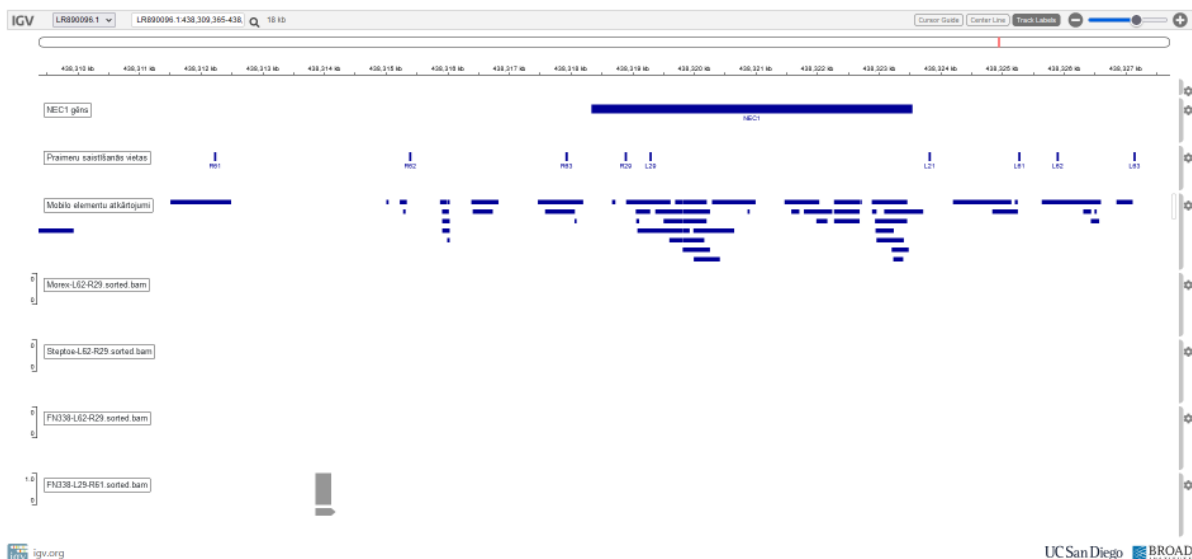
[GenBank](#)
[Graphics](#)
[Distance tree of results](#)
[MSA Viewer](#)

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Morex subclone NRG098 cyclic nucleotide-gated ion channel 4 (Nec1) gene, exons 2...	Hordeum vulgare...	1816	1816	100%	0.0	93.07%	9090	AY972619.1
☒	Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Steptoe cyclic nucleotide-gated ion channel 4 (Nec1) gene, exons 2...	Hordeum vulgare...	1714	1714	80%	0.0	97.42%	2308	AY972624.1
☒	Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Parkland cyclic nucleotide-gated ion channel 4 (Nec1) gene, exons 2...	Hordeum vulgare...	1712	1712	80%	0.0	97.42%	2305	AY972627.1
☒	Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Optic cyclic nucleotide-gated ion channel 4 (Nec1) gene, exons 2...	Hordeum vulgare...	1676	1676	80%	0.0	96.72%	2321	AY972625.1
☒	Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Carlsberg II cyclic nucleotide-gated ion channel 4 (Nec1) gene, exons 2...	Hordeum vulgare...	1672	1672	80%	0.0	96.81%	2306	AY972626.1

23. attēls. Šķirnes ‘Steptoe’ G13 fragmenta, kas iegūts ar praimeriem L29 un R63, sekvences analīzes rezultāti 11.11.2021.

Tā kā ar Sangera sekvenēšanas tehnoloģiju nav iespējams visā garumā nosekvenēt garus fragmentus (vairākus tūkstošus bp), garākie amplifikācijas produkti tika sekvenēti ar Illumina MiSeq: Morex un Steptoe L62-R29, FN338 L62-R29 un FN338 L29-R61. PĶR produkti tika fragmentēti un sagatavoti sekvenēšanai ar Nextera XT reaģentu komplektu (Illumina). Iegūtās sekvences tika analizētas ar programmu Integrative Genomics Viewer, kartējot nolasījumu izvietojumu uz references genoma sekvences - no hromosomas paņemtas *nec1* gēna aptuvenās sākuma un beigu koordinātas +10 kbp uz abām pusēm. Piemērs redzams 24. attēlā. Redzams, ka daudzi potenciālie mobilie elementi pārklājas ar gēna sekvenci, un domājams, ka daļa no tiem ir viltus pozitīvi. Attēlā redzams, ka neviens no nosekvenētajiem fragmentiem (Morex un Steptoe L62-R29, FN338 L62-R29 un FN338 L29-R61) nekartējas *nec1* gēna tuvumā (attēlā pēdējās četras joslas pretī *nec1* koordinātām ir tukšas), tātad nosekvenētie PĶR produkti neatbilst šim genoma reģionam.

Šķirņu ‘Steptoe’, ‘Morex’ un mutanta FN338 L62 un R29 fragmenti uzrādīja līdzīgu fragmentu kartēšanos uz references. Dažus no *nec1* homoloģiem izdevās nokartēt uz miežu ģenētiskās kartes. Viens no tiem kartējās uz 3. hromosomas (abc44574, cDNS GenBank AY273925).



24. attēls. Miežu šķirņu 'Morex' un 'Steptoe' L62-R29 un mutantu FN338 L62-R29 un FN338 L29-R61 fragmentu kartēšanās pret *necl* references genoma sekvenci, izmantojot programmu Integrative Genomics Viewer. Reference ir 'Morex' V3 genoms. No mobilajiem elementiem atlasīti tie, kas atrodas 20 kb attālumā uz abām pusēm no *NEC1* saturošā reģiona.

Secinājumi

Augu genomi ir lieli un kompleksi. Ja nav iepriekš pieejama informācija par ģenētisko modifikāciju, vai genoma rediģēšanu, tad izveidot specifiskas skrīninga vai vēl jo vairāk kvantitatīvas noteikšanas metodes ir ļoti sarežģīti. Strādājot ar izvēlēto modeļorganismu, un divām neraksturotām delēciju mutāciju alēlēm tika konstatēts, ka liela izmēra delēciju raksturošanu apgrūtinā atkārtotumi genoma sekvencē (iespējams transpozoni un retrotranspozoni), kas traucē iegūt specifiskus amplifikācijas produktus konkrētajam genoma rajonam. Ja delēcijas ir ierobežotas gēna kodējošās sekvences ietvaros un kokrētais gēns ir zināms, iespējams, ka specifiskas delēciju noteikšanas metodes izveide būtu vienkāršāka.

Tas arī parāda, cik liela praktiska nozīme ir tam, ka autorizētu ĢMO detekcijas metožu izstrāde gulstas uz pieteikuma iesniedzēja nevis oficiālās kontroles institūciju pleciem.

3. Genomiski rediģētu organismu risku vadības rekomendācijas

3.1. Ar jauniem genomikas paņēmieniem iegūtu augu riska novērtējums

2021. gada 29. aprīlī Eiropas Savienības Padomes publicētajā Komisijas pētījumā “Pētījums par jaunu genomikas paņēmienu statusu Savienības tiesībās un saistībā ar Tiesas spriedumu lietā C-528/16” Komisija lūdz EPNI sniegt pārskatu par riska novērtējumu augiem, kas izveidoti izmantojot JGP, ņemot vērā gan EPNI zinātniskos viedokļus, gan dalībvalstu kompetento iestāžu un nacionālo institūciju viedokļus, kas publicēti kopš 2012. gada, kad bija publicēts pirmais EPNI viedoklis par JGP⁷. Pārskata sagatavošanai EPNI saņēma 16 attiecināmus zinātniskos viedokļus, kurus bija iesniegušas astoņas dalībvalstis. Papildus tiem EPNI ņēma vērā trīs EPNI ĢMO paneļa zinātniskos viedokļus par JGP: 2012. gada viedokļus par *sic-ģenēzi*/intra-ģenēzi⁸ un SDN-3⁹, kā arī nesen apstiprināto viedokli par SDN-1, SDN-2 un ODM paņēmieniem¹⁰.

EPNI pārskatā¹¹ tika iekļauti sekojoši JGP: 1) *cisģenēze* un *intraģenēze*; 2) ZFN un SDN; 3) oligonukleotīdu vadīta *mutaģenēze*; 4) RNS atkarīga DNS metilēšana; 5) potēšana uz ģenētiski modificēta potcelma; 6) reversā selekcija; 7) agroinfiltrācija; 8) sintētiskā genomika.

Cisģenēze šī pārskata ietvaros ir aprakstīta kā ģenētiskās modifikācijas tehnika, ar kuras palīdzību organismā tiek ievietota DNS tikai no tās pašas sugas vai tuvu radniecīgas sugas. Papildus tai ievietotie gēni, introni un regulatorie elementi ir blakus un neizmainīti. *Intraģenēzes* gadījumā ievietotā DNS var būt kā jauna DNS fragmentu kombinācija no tās pašas vai saderīgas sugas. *Intra-ģenēze* var ietvert arī tādas metodes, kur tiek izmantota RNS interference (RNAi). *Cisģenēze* un *intraģenēze* augi pašlaik tiek iegūti, izmantojot tās pašas transformācijas metodes kā veidojot transģenētiskos augus. Biežāk izmantotā metode ir *Agrobacterium*-mediēta transformācija, kā arī biolistiskās pieejas.

EPNI pārskatā augu, kas iegūti ar ***cisģenēzi* vai *intraģenēzi***, ietekme uz cilvēkiem, dzīvniekiem un vidi tika salīdzināta ar augiem, kas iegūti konvencionālās selekcijas ceļā vai transģenēzes ceļā. Izvērtējot draudus, kas saistīti ar augiem, kas iegūti ar *cisģenēzes* vai *intraģenēzes* metodēm, galvenie apsvērumi ĢMO paneļa izpratnē bija:

- 1) DNS izcelsme un gēnu produktu drošums – ĢMO panelis uzskatīja, ka tie gēni, kuru izcelsme ir tāda pati kā gēniem, kuri tiek izmantoti konvencionālajā selekcijā, var tikt izmantoti *cisģenēzē* un *transģenēzē*. Tiek uzskatīts, ka izmantoto gēnu potenciālie riski varētu būt līdzvērtīgi kā konvencionālajā selekcijā vai mazāki metožu specifiskuma dēļ. Tomēr, ja *intraģenēzē* tiek izmantots saistīts augu izcelsmes gēns, var rasties dažas

⁷ <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.2903/j.efsa.2021.6314>

⁸ EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO), ‘Scientific opinion addressing the safety assessment of plants developed through *cisgenesis* and *intragenesis*’, EFSA Journal 2012;10(2):2561. doi:10.2903/j.efsa.2012.2561

⁹ EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO), ‘Scientific opinion addressing the safety assessment of plants developed using ZFN-3 and other SDNs with similar function’, EFSA Journal 2012;10(10):2943. doi:10.2903/j.efsa.2012.2943

¹⁰ EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO), ‘Applicability of the EFSA Opinion on SDNs type 3 for the safety assessment of plants developed using SDNs type 1 and 2 and oligonucleotide-directed mutagenesis’, EFSA Journal 2020;18(11):6299. doi:10.2903/j.efsa.2020.6299

¹¹ EFSA (European Food Safety Authority), Paraskevopoulos K and Federici S, 2021. Overview of EFSA and European national authorities’ scientific opinions on the risk assessment of plants developed through New Genomic Techniques. EFSA Journal 2021;19(4):6314, 43 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6314>

jaunas ģenētisko elementu kombinācijas, kas nav sastopamas cisgeniskajos un tradicionāli audzētajos augos, un tās, tāpat kā transgēniem augiem, var radīt jaunas pazīmes ar jauniem apdraudējumiem.

- 2) Izmaiņas genomā insercijas vietā un citur – insercijas, delēcijas, endogēno gēnu un regulatoro sekvenču pārkārtojumi; jaunu nolasīšanas rāmju veidošanās var potenciāli radīt jaunus proteīnus;
- 3) Potenciāla ne-augu izcelsmes sekvenču klātbūtne insertā – dažos gadījumos īsas sekvences, kuru izcelsme nav donora auga (piemēram, vairākas klonēšanas vietas vai T-DNS robežas sekvenču atkārtojumi) var tik insertētas recipienta augā kopā ar cisgēnu vai intragēnu kā transformācijas metodes rezultāts. Robežas sekvences ir īsi DNS sekvenču atkārtojumi līdz 25 nukleotīdiem. Tiek secināts, ka jebkuri draudi, kas var būt saistīti ar T-DNS robežas sekvenču neatšķiras no konvencionālās selekcijas.
- 4) Pazīmes ekspresija un potenciālie tālākie pielietojumi – jaunu proteīnu vai metabolītu ekspresija vai paaugstināts endogēno proteīnu un metabolītu līmenis var radīt drošības problēmas gan dabiskiem augiem, gan augiem, kas iegūti ar jebkurām selekcijas metodēm. Tāpat kā transgēnu ekspresijā, dažādi faktori var ietekmēt cisgēnu un intragēnu ekspresiju.

ZFN un SDN (SDN-1, SDN-2 un ODM) tehnikas ir aprakstītas projekta 1. gada atskaitē. Galvenie aspekti attiecībā uz šīm tehnikām EPNI pārskatā bija sekojoši. Kopumā tika paredzēti divi iespējamie scenāriji atkarībā no tā, vai genoma rediģēšanas procesā apzināti ir izmantota kāda nukleīnskābju secība (piemēram, pilns vai daļējs SDN modulis). Ja kāda nukleīnskābju secība ir izmantota, iegūtā produkta risks tiks vērtēts kā transgēnam augam attiecībā uz genomā integrēto eksogēno DNS un kā gēnu rediģētam augam attiecībā uz mērķa sekveni, kas modificēta, izmantojot SDN-1. Ja nukleīnskābju secība nav izmantota, riska novērtējums fokusēsies tikai uz modifikācijām, kas iegūtas ar SDN. SDN-1 pielietojumam tika izvērtēti sekojoši aspekti (attiecināmi arī uz SDN-2 pielietojumu, bāzu rediģēšanu (*base editing*) un oligonukleotīdu vadītu mutāģenēzi):

- 1) DNS izcelsme un gēnu produktu drošums – SDN-1 izmantošanas gadījumā genomā netiek insertētas DNS sekvences, bet tiek modificēta jau eksistējoša endogēna sekvence. Atkarībā no modificētā gēna/lokusa rakstura un ar gala produktu saistītās alēles un iezīmes izcelsmes, riska novērtēšanas procesā obligāti tiks ņemta vērā drošas lietošanas vēsture.
- 2) Izmaiņas genomā insercijas vietā – SDN-1 gadījumā nav attiecināmas;
- 3) Izmaiņas auga genomā citās vietās - EPNI ĢMO ekspertu panelis 2020. gadā apsprieda, ka papildus modifikācijai (-ām) iepriekš noteiktos augu genomiskos reģionos, ko izraisa SDN-1 pieeja, var tikt ieviestas arī citas izmaiņas citos reģionos, kā rezultāts šo metožu ne-mērķa aktivitātēm. Šīs neplānotās mutācijas ārpus sākotnējās mērķa sekvences var būt iepriekš paredzamas (SDN-1 un SDN-2 izmantošanas gadījumos) vai neparedzamas (atsevišķām bāzu rediģēšanas sistēmām). SDN-1 tehnikas izmantotāji strādā pie metodes specifiskuma paaugstināšanas.

Arī **SDN-3** pielietojumam tika izvērtēti tie paši aspekti:

- 1) DNS izcelsme un gēnu produktu drošums – EPNI ĢMO ekspertu panelis uzskatīja, ka SDN-3 paņēmieni var izmantot, lai integrētu DNS noteiktā genoma lokusā. Attiecībā uz ieviestajiem gēniem SDN-3 tehnika neatšķiras no citām izmantotajām ģenētiskās modifikācijas metodēm, un to var izmantot, lai ievadītu genomā transgēnus, intragēnus vai cisgēnus. Kā aprakstīts EPNI ĢMO paneļa iepriekš sagatavotajā viedoklī (2012b), kad cisģenēzes ceļā tiek ieviests augu izcelsmes gēns, apdraudējums ir līdzīgs

tradicionāli audzētu augu riskam. Tomēr, ja intraģenēzē tiek izmantots līdzīgs augu izcelsmes gēns, var rasties jaunas ģenētisko elementu kombinācijas, un tās var radīt jaunas pazīmes ar jauniem apdraudējumiem. Bīstamības, kas raksturīgas transgēniem augiem, var identificēt, jo transgēni un to produkti var būt no jebkura avota, ieskaitot avotus, kas nav augi.

- 2) Izmaiņas genomā insercijas vietā - tā kā DNS tiek ievadīta precīzā, iepriekš noteiktā vietā augu genomā, izmantojot SDN-3, nejaušas integrācijas radītie draudi tiek samazināti līdz minimumam. Papildus mērķtiecīgai DNS integrācijai var rasties genoma izmaiņas, ko var izraisīt dažādi procesi un mehānismi (piemēram, divpavedienu pārrāvumu labošanas mehānismi). Nevēlamas izmaiņas, kas rodas genomā jebkurā selekcijas pieejā (konvencionālajā, transgēnā cisgēnā vai intragēnā selekcijā), vairumā gadījumu var novērst, krustojot un/vai veicot atlasi. Potenciālie apdraudējumi var būt saistīti ar somaklonālu variāciju, jaunu nolasīšanas rāmju rašanos, gēnu ekspresijas modifikāciju, ne-augu izcelsmes sekvenču klātbūtni insercijas vietā. SDN-3 paņēmienā tiek izmantotas tādas pašas transformācijas metodes kā transģenēzē, un gan pārejošu, gan stabilu SDN ekspresiju var izmantot, lai ieviestu sait-specifisku divpavediena DNS pārrāvumu. SDN gēnu stabilas integrācijas gadījumā vēlāk var atlasīt tikai tos augus, kas satur integrēto gēnu. Tāpēc SDN-3 tehnika var optimizēt genoma vidi gēnu ekspresijai un var samazināt apdraudējumus, kas var rasties, ievietojot nejaušos lokusus (piemēram, endogēno gēnu un/vai regulējošo elementu pārtraukšana). Integrācija var notikt, izmantojot homologu rekombināciju (HR) vai nehomologu gala savienošanu (*non-homologous end joining*, NHEJ), un tas var ietekmēt izmaiņas, kas rodas insercijas vietā: ja DNS ievieto ar SDN-3, izmantojot HR, genoma izmaiņas ievietošanas vietā noteiks donora DNS dizains. Mērķtiecīga NHEJ gadījumā genoma izmaiņas DNS labošanas dēļ būs līdzīgas tām, kas novērotas pašlaik izstrādātajos transģenajos augos.
- 3) Izmaiņas auga genomā citās vietās - šādas izmaiņas var rasties audu kultūras posma rezultātā (somaģenētiskās variācijas), ko var izmantot SDN-3 procesa laikā, vai SDN ne-mērķa darbības rezultātā. Izmaiņas audu kultūru posma dēļ nav specifiskas SDN-3, un tās var rasties arī citos selekcijas procesos. Attiecībā uz izmaiņām, kas rodas SDN ne-mērķa darbības dēļ, secināts, ka tas būs atkarīgs no SDN specifiskuma un DNS secību klātbūtnes, kas līdzīgas SDN atpazīšanas vietai recipienta genomā. Ir izstrādātas vairākas metodes, lai samazinātu ne-mērķa modifikāciju biežumu. Gan fizikālās, gan ķīmiskās mutaģenēzes metodes izraisa ievērojamu skaitu mutāciju visā genomā. SDN pielietojums izraisītu mazāk neparedzētu izmaiņu nekā lielākā daļa parasto mutaģenēzes metožu, un, ja tās notiek, izmaiņas būtu tāda paša veida (nelielas delēcijas/insercijas/aizvietošanas vai lielākas pārkārtošanās) kā tās, kas iegūtas ar parastajām selekcijas metodēm. Šādas izmaiņas notiek dabiski arī pēc DNS labošanas vai spontānām mutācijām.

RNS atkarīga DNS metilēšana (*RNA-dependent DNA methylation*, RdDM) ir tehnika, kas dod iespējas modificēt gēnu ekspresiju, pateicoties epiģenētikai. RdDM inducē mērķa gēna izslēgšanu transkripcijā, metilējot promotera sekvenci. Lai tas notiktu, auga šūnās ievada gēnus, kas kodē RNS molekulas, kas ir homologas promotera reģionam. Kad šie gēni tiek transkribēti, veidojas divpavediena RNS molekulas, kuras pēc apstrādes ar specifiskiem enzīmiem, kas dabiski atrodas augu šūnās, inducē mērķa promotera sekvences metilēšanu, tādējādi inhibējot mērķa gēna transkripciju. Metilēšana augos ir meiotiski stabila un tiek

pārmantota nākamajā paaudzē. Starp transgēnā auga pēcnācējiem būs arī tādas augu līnijas, kuras segregācijas dēļ nesaturēs insertētos gēnus, bet saglabās nepieciešamo pazīmi. Metilētais statuss var turpināties vairākās paaudzēs. Pēcnācēji nesatur svešas DNS sekvenses, kā arī to genomiskajās sekvencēs nav veiktas nekādas izmaiņas. dsRNS kodējošie gēni augu šūnās tiek ievadīti ar standarta transformācijas metodēm (biolistisko transformāciju un transformāciju ar *Agrobacterium tumefaciens*).

RdDM atšķiras no RNAi tehnoloģijas ar to, ka RdDM notiek šūnas kodolā ar tāda mehānisma palīdzību, kuru sauc par transkripcionālu gēnu izslēgšanu (*transcriptional gene silencing*). Savukārt RNAi darbība notiek citoplazmā ar cita mehānisma palīdzību, kuru sauc par pēc-transkripcionālu gēnu izslēgšanu (*post-transcriptional gene silencing*). DNS metilēšanu var sasniegt arī ar citām metodēm.

EPNI pārskatā tiek citēts vienas dalībvalsts (Vācijas) viedoklis. Šī dalībvalsts savā ziņojumā pauž uzskatu, ka ar RdDM iegūtiem augiem un to produktiem pieteikumā ir jānorāda molekulārais raksturojums un ģenētiskā stabilitāte, jāpārbauda, vai nav radušies nevēlami efekti vai blakusefekti, kā arī jāveic salīdzinājums ar konvencionālu produktu, jāveic arī toksicitātes un alergenitātes analīze. Zinātniskajā literatūrā pašlaik trūkst pētījumu par endogēnu garāku dsRNS, siRNS vai miRNS lietošanu cilvēku pārtikā un dzīvnieku barībā. Ne kopējais mazo RNS molekulu daudzums, ne labdabīgo mazo RNS klātbūtne parastajos augos nav pietiekama, lai pierādītu, ka visas jaunās mazās RNS būs drošas pārtikas ķēdē vai vidē. Mazās RNS veic savu funkciju, izmantojot secībai specifisku mijiedarbību ar mērķa molekulām. Šīs darbības, kuras nosaka secība, vispārīgi nevar uzskatīt par "vispārēji atzītām par drošām". Jaunākie pierādījumi liecina, ka augu izcelsmes mazās RNS izdzīvo cauri zīdītāju kuņģa-zarnu traktam, iziet cauri zarnu barjerai un ietekmē zīdītāju aknu enzīmu gēnu ekspresijas regulēšanu. Šķiet, ka RdDM augiem pārtikas nekaitīgums un riska novērtējums galvenokārt ir saistīts ar diviem svarīgiem jautājumiem. Pirmais ir jautājums par to, vai ir notikusi neparedzēta ietekme saistībā ar piemēroto stabilo vai pārejošo transgēno pieeju un vai tie attiecas uz augu izcelsmes pārtikas nekaitīgumu, un otrais ir jautājums, vai sintētiskajām RNS molekulām varētu būt negatīva ietekme uz dzīvnieku un cilvēku veselību. Visbeidzot, potenciālie riski, kas rodas, pielietojot RdDM augiem, vai nu pašas transgēnās pieejas dēļ vai ieviesto sintētisko nukleotīdu dēļ, ir jānovērtē, veicot *in vivo* pētījumus ar dzīvniekiem, nosakot iespējamās neparedzētās sekas. Turklāt ir nepieciešami rūpīgi gēnu ekspresijas pētījumi (*in vitro* un *in vivo*), lai identificētu gēnus, kuru ekspresiju var ietekmēt specifiskas miRNS metodes. Autori uzskata, ka ir jāpēta arī šādu RNS molekulu ietekme uz vidi – saglabāšanās vidē, ietekme uz augsnes mikroorganismiem vai vīrusiem, augstāka uzņēmība pret augu slimībām, siRNS ietekme uz saimniekorganisma transkriptomu, ne-mērķa ietekme uz organismiem, kas uzņem augus (cilvēkiem, dzīvniekiem), neparedzēta ietekme uz molekulārām un celulārām mijiedarbībām. Ar RdDM iegūtajiem augiem, kurus paredzēts laist tirgū, būtu jāuzlabo pašreizējās monitoringa un uzraudzības sistēmas. Noslēgumā autori apkopo svarīgākos riska novērtējuma aspektus atbilstoši viņu viedoklim:

- Augu izcelsmes mazās RNS molekulas ir mobilas;
- Metilēšanas izplatību nevar paredzēt;
- Izslēgšanas signāla izplatīšana uz ne-mērķa audiem;
- Gēnu izslēgšana nav audu specifiska;
- Izslēgšanas signāla fenotipiskā stabilitāte nav skaidra (ir iespējama signāla pastiprināšana/pavājināšana);
- Šķiet, ka izslēgšanas efektu variācijas ir atkarīgas no paaudzes skaita;
- Līdz šim nav pierādīts, ka RdDM ir stabils vairākās paaudzēs;

- Promotera DNS metilēšana ne vienmēr izraisa transkripcijas inaktivāciju;
- RNS izslēgšana ir atkarīga no vides apstākļiem;
- Neskaidrības par uzņemto RNS molekulu ietekmi;
- Metode pašlaik intensīvi attīstās;
- Niecīga datu bāze.

Potēšana ir metode, kad viena auga virszemes daļa (potzars) tiek piestiprināta pie otra auga apsakņotas apakšējās daļas (potcelma), tādējādi radot himerisku organismu ar uzlabotām agronomiskajām īpašībām. Lai transformētu potcelmu un/vai potzaru, var tikt izmantota transģenēze, cisģenēze un virkne citu tehniku. Kad ne-ĢMO potzars tiek uzpotēts uz ĢM celma, auga lapas, stumbrs, ziedi, sēklas un augļi var nesaturēt ģenētisko modifikāciju attiecībā uz izmaiņām genomiskās DNS sekvencēs. Potcelms var būt uzlabots ar ģenētiskajām modifikācijām attiecībā uz uzlabotu sakņu veidošanos vai rezistenci pret augšnes izcelsmes slimībām, kas rezultējas ar lielāku ražu. Potētajos augos mazās RNS molekulas, kuras, piemēram, ekspresē RdDM, var pārvietoties caur potējuma vietu, kā rezultātā gēnu izslēgšanas signāls var ietekmēt gēnu ekspresiju potzarā. Vācijas viedoklī ir definēti vairāki aspekti, kuriem ir jāpievērš uzmanība:

- Hromosomālās DNS izmaiņas potētā auga ne-transģenējās daļās – līdz šim ir pierādīts, ka potējuma vietu var šķērsot plastīdu DNS. Hromosomālās DNS pārvietošanās nav pierādīta. Attiecībā uz riska vērtēšanu īpašs uzsvars ir jāvērs uz transformācijas protokola veidu, kas ir ticis pielietots, un transģenā inserta lokalizāciju, piemēram, vai transformācija ir bijusi vērsta uz plastīdu DNS. Šķiet, ka *Agrobacterium* mediētā transformācija, kas transģenos insertus novirza uz augu šūnas kodolu, nerada papildu apdraudējumu interferencei ar potēto augu netransģenējo daļu.
- mRNS translokācija - ir pierādīts, ka mRNS liela attāluma translokācija augos ir ļoti regulēts un selektīvs process. Lai gan transportēšana un mērķēšana ir atkarīga no īpašām sekvencēm, kas atrodas 5' un 3' netranslētajos reģionos, joprojām pastāv iespēja netīši pārnest transģenas mRNS molekulas. Tāpēc ieteicams rūpīgi uzraudzīt transģēnu specifisko mRNS klātbūtni potēto augu ne ĢM daļās ar RT-PCR vai Northern blot metodēm.
- Mazu ne-kodējošu RNS molekulu translokācijas ietekme – mazas nekodējošas RNS molekulas augos ir mobilas un tās neierobežo savu gēnu izslēgšanas efektu uz atsevišķām šūnām, kur tās tiek ģenerētas. Parasti inducētais gēnu izslēgšanas efekts tiek transportēts tālu augā, un varbūtība saglabājas, ka neparedzēts gēnu ekspresijas efekts varētu būt arī ne-transģenējā auga daļā.
- Proteīnu translokācija – ir pierādīts, ka augos šis process notiek lielos attālos, un, šķiet, ka tas tiek stingri regulēts. Tā kā transģeno proteīnu esamība ne-transģenējā organisma daļā nevar tikt izslēgta, to ir nepieciešams uzraudzīt. Tāpat ir jāuzrauga adventīvie dzinumi no kallusa (robežrajona starp transģeno un ne-transģeno auga daļu) vai no ĢM potcelma, jo, piemēram, augļi, kas iegūti šādā ceļā, ir transģēni.

Potēšanas gadījumā atsevišķi specifiski aspekti ir jāņem vērā salīdzinošajā novērtējumā, toksikoloģijas un alergenitātes riska novērtējumā, kā arī vides riska novērtējumā.

Reversā selekcija ir selekcijas metode, ar kuru tiek veikts pretējs process hibrīdā auga šķirnes iegūšanai. Tas nodrošina homozigotisku vecāku līniju iegūšanu, kas pēc hibridizācijas atjauno elitārā heterozigotā auga ģenētisko sastāvu, neprasot atkrustošanu un selekciju. Reversās selekcijas metode ietver vairākus soļus:

- Elites heterozigotiskas līnijas selekcijas, kura ir tālāk jāpavairo;
- Elites heterozigotiskās līnijas meiotiskās rekombinācijas supresija, izslēdzot tādus gēnus kā *dmc1* un *spo11*. Parasti tas tiek sasniegts augus transformējot ar transgēniem, kas kodē RNS interferences (RNAi) sekvenču, bet var tikt izmantotas arī citas metodes;
- Haploīdu mikrosporu (nenobriedušu ziedputekšņu) iegūšana no transgēnās elites heterozigotiskās līnijas ziediem;
- Dubulto haploīdu tehnoloģijas izmantošana, lai dubultotu haploīdo mikrosporu genomu un iegūtu homozigotiskas šūnas;
- Mikrosporu kultivēšana, lai iegūtu homozigotiskus diploīdus augus;
- Augu pāru (vecāku līniju) selekcija, kas nesatur transgēnu un kuru hibridizācija atjaunotu heterozigotisko elites līniju.

Reversās selekcijas metode izmanto transgēnēzi, lai nomāktu meiotisko rekombināciju. Nākamajos soļos tiek selekcionēti tikai netransgēni augi. Tādējādi selekcionēto vecāku līniju pēcnācēji būs ģenētiski identiski heterozigotiskajam elites augam un nesaturēs nekādas papildus genomiskās izmaiņas. Vācijas viedoklī tiek pausts uzskats, ka otrajā solī iegūtie augi ir transgēni. Tādēļ šo augu molekulārais raksturojums varētu dod norādes uz potenciāliem neplānotiem efektiem negatīvajā segregantā, kas rodas transformācijas procesa rezultātā. Tālāk Vācijas viedoklī tiek dotas norādes un izanalizēti dažādi apsvērumi, kas jāņem vērā, veicot šādu augu salīdzinošo vērtējumu, toksicitātes un alergenitātes riska vērtējumu, kā arī vides riska vērtējumu.

Agroinfiltrācija – tā ir metode, kas tiek pielietota augu audiem, galvenokārt lapām. Šajos audos tiek infiltrēta *Agrobacterium* sp. suspensija, kas satur vēlamo gēnu vai gēnus, kas ir jāekspresē augā. Šie gēni tiek lokāli un pārejoši ekspresēti augstā līmenī. Šo metodi parasti izmanto zinātniskām vajadzībām, bet to izmanto arī kā ražošanas platformu augstvērtīgiem rekombinantajiem proteīniem. Jebkurā gadījumā, interesējošais augs ir infiltrētais augs nevis pēcnācējs. Atkarībā no audu veida un infiltrētajiem gēnu konstruktiem agroinfiltrācijai var izšķirt trīs veidus:

- Agroinfiltrācija *sensu stricto* – izmanto ne-dzimumšūnu audus (parasti lapu audus), tie tiek infiltrēti ar replikatīviem konstruktiem ar mērķi iegūt lokālu ekspresiju infiltrētajā zonā.
- Agroinokulēšana ar agroinocēšanu - izmanto ne-dzimumšūnu audus (parasti lapu audus), tie tiek infiltrēti ar konstruktu, kas satur svešu gēnu pilna garuma virusālajā vektorā ar mērķi iegūt ekspresiju visā augā.
- Ziedu iemērcēšana – dzimumšūnu audus (parasti ziedus) iegremdē *Agrobacterium* suspensijā, kas satur DNS konstruktu ar mērķi panākt dažu embriju transformāciju, kas var tikt atlasīti dīgšanas stadijā. Mērķis ir iegūt stabili transformētus augus. Iegūtie augi ir ĢMO, kas neatšķiras no ĢM augiem, kas ir iegūti ar citām transformācijas metodēm.

3.2. Sintētiskās bioloģijas organismu riska novērtēšana

3.2.1. Ievads

Sintētiskā bioloģija (SynBio) ir starpdisciplināra zinātnes nozare, kas apvieno inženierzinātņi un bioloģiju ar mērķi veidot jaunas bioloģiskās sistēmas un piešķirt dzīvām šūnām jaunas īpašības. Šī vispārīgā un neprecīzā definīcija norāda, ka tēma ir ārkārtīgi plaša un to nav iespējams apskatīt vienā zinātniskā atzinumā. Bioloģiskās daudzveidības konvencija savukārt apstiprināja, ka pagaidām nepastāv vienota starptautiski atzīta sintētiskās bioloģijas definīcija, taču norādīja, ka tai raksturīga *de novo* ģenētiskā materiāla sintēze un inženierzinātnēs balstīta pieeja komponentu, organismu un produktu veidošanai¹². Vēsturiski sintētiskās bioloģijas apskatu un vērtējumu 2014. un 2015. gadā ir sniegušas Eiropas Komisijas zinātniskās komitejas SCENIHR (*Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks*), SCHER (*Scientific Committee on Health and Environmental Risks*) un SCCS (*Scientific Committee on Consumer Safety*) (SCENIHR, SCHER and SCCS, 2014; SCENIHR, SCHER and SCCS, 2015a; SCENIHR, SCHER and SCCS, 2015b). Šie zinātniskie atzinumi apskatīja sešas SynBio attīstības jomas: 1) ģenētisko detaļu bibliotēkas un metodes; 2) minimālo šūnu un šasijas organismu; 3) protošūnas un mākslīgās šūnas; 4) ksenobioloģiju; 5) DNS sintēzi un genoma rediģēšanu un 6) pilsoņu zinātņi (*do-it-yourself biology*). Šie trīs zinātniskie atzinumi izstrādāja darba definīciju, kā arī apskatīja riska novērtēšanas metodoloģiju un drošības aspektus, risku videi un bioloģiskajai daudzveidībai un galvenos SynBio pētniecības virzienus. Darba definīcija ir sekojoša: “*SynBio is the application of science, technology and engineering to facilitate and accelerate the design, manufacture and/or modification of genetic materials in living organisms*”. Šie trīs zinātniskie atzinumi arī secināja, ka SynBio organismus var izvērtēt izmantojot esošo ĢMO riska novērtēšanas metodoloģiju, taču ņemot vērā straujo tehnoloģiju attīstību ir nepieciešamas regulāri izvērtēt esošo riska novērtēšanas metodoloģiju. 2018. g. EPNI saņēma EC mandātu M-2018-0205 izstrādāt atzinumu par ĢMO, kas iegūti izmantojot SynBio pieeju un iespējamo ietekmi uz riska novērtēšanas metodoloģiju. Ņemot vērā ļoti plašo mandātu, tas tika sadalīts sešās darba paketēs (WP), kuru ietvaros veic 1) mikrobioloģisko raksturojumu un vides riska novērtējumu (ERA) ģenētiski modificētiem mikroorganismiem (GMM) (WP1), molekulāro raksturojumu (MC) un ERA ģenētiski modificētiem augiem (GMP) (WP2), pārtikas un dzīvnieku barības riska novērtējumu GMM (WP3), pārtikas un dzīvnieku barības riska novērtējumu GMP (WP4), MC un ERA ģenētiski modificētiem dzīvniekiem (WP5) un pārtikas un dzīvnieku barības risku novērtējumu ģenētiski modificētiem dzīvniekiem (WP6). 2020. g. EPNI publicēja pirmo no sešiem zinātniskajiem atzinumiem par ģenētiski modificētu mikroorganismu raksturojumu un vides riska novērtējumu (EFSA Scientific Committee, 2020). Minētajā atzinumā konstatēts, ka patreizējās SynBioM riska novērtēšanas vadlīnijas ir noderīgas, bet tās nepieciešams atjaunot un papildināt. Tuvākajā desmitgadē sagaidāmie SynBioM produkti visticamāk neradīs jaunu vides apdraudējumu, taču var novest pie izmainītas ekspozīcijas. 2021. g. EPNI publicēja otro no sešiem zinātniskajiem atzinumiem par MC un ERA ģenētiski modificētiem augiem (GMP) (EFSA GMO Panel, 2021). Pašlaik sagatavošanā ir arī zinātniskais atzinums par ģenētiski modificētu augu pārtikas un dzīvnieku barības risku novērtējumu (WP4).

¹² The Convention on Biological Diversity, <https://www.cbd.int/doc/meetings/cop/cop-12/information/cop-12-inf-11-en.pdf>

Nemot vērā plašo SynBio pielietojumu daudzveidību, kā arī tehnoloģiju attīstības stadiju, šajā apskatā tiks apkopota informācija par SynBio pielietojumiem pārtikā un dzīvnieku barībā izmantotos augos. Tādējādi šis pārskats ir balstīts uz 2021. g. EPNI atzinumu par SynBio augu molekulāro raksturojumu un vides riska novērtējumu (EFSA GMO Panel, 2021), kā arī iepriekšējiem EK komiteju sagatavotajiem zinātniskajiem atzinumiem (SCENIHR, SCHER and SCCS, 2014; SCENIHR, SCHER and SCCS, 2015a; SCENIHR, SCHER and SCCS, 2015b) un EK ekspertu sagatavoto ziņojumu par jaunajām metodēm lauksaimniecības biotehnoloģijā (High Level Group of Scientific Advisors, 2017). Ar SynBio jomu ir saistīts arī 2020. g. pieņemtais EPNI zinātniskais atzinums par SDN-1, SDN-2 un ODM metodēm (EFSA GMO Panel, 2020a) un gēnu dziņu atzinums (EFSA GMO Panel, 2020b).

3.2.2. EK mandāts (Terms of Reference)

2018. g. EK uzdeva Eiropas pārtikas nekaitīguma iestādei mandātu M-2018-0205¹³, kas sastāvēja no 4 darba uzdevumiem:

1. EPNI tika uzdots izvērtēt, kādi jauni SynBio sektori un attīstības virzieni ir jāņem vērā papildus jau zinātnisko komiteju noteiktajām sešām jomām (ToR1);
2. EPNI tika aicināta noteikt potenciālu jaunu bīstamību, kas saistīta ar esošajiem un sagaidāmiem jauniem SynBio augiem, attiecībā uz riskiem cilvēkam, dzīvniekiem un videi (ToR2);
3. EPNI tika aicināta noteikt, vai esošās riska novērtēšanas vadlīnijas ir adekvātas un pietiekamas esošajiem un nākotnē sagaidāmiem SynBio augiem, vai arī ir nepieciešams vadlīnijas atjaunot un papildināt (ToR3);
4. Gadījumā, ja būtu nepieciešamība atjaunot riska novērtēšanas vadlīnijas, EPNI tika uzdots noteikt specifiskās jomas, kurās tas nepieciešams (ToR4).

Nemot vērā ļoti plašo mandātu, tas tika sadalīts sešās darba paketēs (WP), attiecīgi plānojot sagatavot sešus zinātniskos atzinumus:

1. mikrobioloģiskais raksturojums un vides riska novērtējums (ERA) ģenētiski modificētiem mikroorganismiem (GMM) (WP1);
2. molekulārais raksturojums (MC) un ERA ģenētiski modificētiem augiem (GMP) (WP2);
3. pārtikas un dzīvnieku barības riska novērtējums GMM (WP3);
4. pārtikas un dzīvnieku barības riska novērtējums GMP (WP4);
5. MC un ERA ģenētiski modificētiem dzīvniekiem (WP5);
6. pārtikas un dzīvnieku barības risku novērtējums ģenētiski modificētiem dzīvniekiem (WP6).

EPNI zinātniskā atzinuma sagatavošanai tika ievēroti sekojoši pieņēmumi:

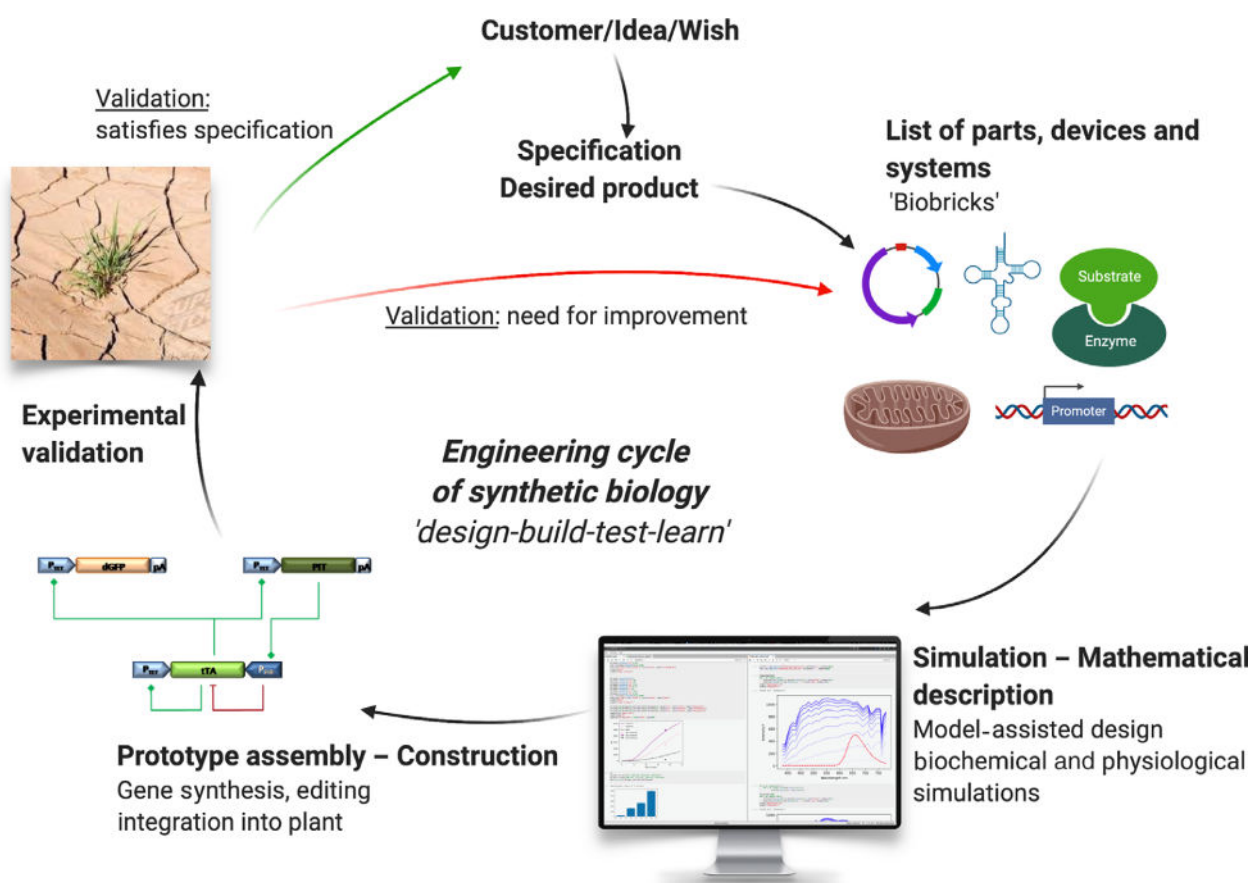
1. Zinātniskais atzinums attiecas tikai uz WP2 un tas nosedz tikai divas SynBio jomas, t.i., ģenētisko detaļu bibliotēkas un metodes, kā arī DNS sintēzi un genoma rediģēšanu;
2. Tuvākā nākotne nozīmē produktus, kuri varētu nonākt tirgū tuvāko 10 gadu laikā;
3. Lauksaimniecības un pārtikas pielietojums nozīmē, ka atzinumā netiek apskatīti bioremediācijas, bioieroču, medicīniskie un biodeģvielas pielietojumi;

¹³ <http://registerofquestions.efsa.europa.eu/roqFrontend/wicket/page?3>

4. Vides riska novērtējums (ToR2) attiecas tikai uz riskiem apkārtējai videi, bet ne uz riskiem cilvēkam un dzīvniekiem.

3.2.3. Zinātniskās literatūras analīze par SynBio attīstību (*horizon scanning*)

SynBio inženiertehniskais cikls “*design-build-test-learn*” ir parādīts 25. attēlā (EFSA GMO Panel, 2021). Ņemot vērā plašo sintētiskās bioloģijas tvērumu, uzsākot darbu pie WP2 tika veikta zinātniskās literatūras analīze par produktiem, kas tuvākajā nākotnē (aptuveni 10 gadi) varētu nonākt tirgū. Šim nolūkam tika veikta sistemātisks literatūras apskats, ekspertu intervijas un informācija par uzņēmumos izmantotajām SynBio pieejām augos (Unkel et al. 2020). Literatūras apskats liecina, ka SynBio augu produkti, kuri varētu nonākt tirgū tuvāko 10 gadu laikā, visdrīzāk būs veidoti izmantojot esošās ģenētiskās modifikācijas metodes un genoma rediģēšanu, taču ticams, ka šo produktu veidošanā būs izmantotas modelēšanas un inženiertehniskās pieejas, kas ļaus iegūt kompleksākas augu pazīmes.



25. attēls. Pārskats par sintētiskās bioloģijas produktu attīstības ciklu. Sintētiskā bioloģija apvieno inženierzinātnes un dzīvās dabas zinātnes, pielietojot inženierzinātnes pamatprincipus, lai veiktu racionālu, modulāru bioloģisko daļu savākšanu augstākos, sarežģītos signālceļu un metabolisma struktūrās ar jaunu, vēlamu funkcionalitāti. Attēls adaptēts no (EFSA GMO Panel, 2021). Produktu attīstības cikls balstās matemātiskajā modelēšanā atsevišķu molekulāro daļu dizainam un funkcionālam raksturojuma, kā arī molekulāro daļu savākšanā, un kompleksa darbības optimizācijā.

Balstoties uz literatūras apskatu tika iegūts saraksts ar augu pazīmēm, kuras varētu pieskaitīt SynBio jomai:

1. Augi vai augu šūnu kultūras, kas ražo pārtikas sastāvdaļas, piemēram, pigmentus (Appelhaugen et al. 2018);
2. Augu izcelsmes pārtikas vai dzīvnieku barības produkti ar uzlabotām barības vielu īpašībām, piemēram, astaksantīns, vitamīnu un tml. (Betancor et al. 2016; Breitenbach et al. 2016);
3. Nevēlamu gēnu produktu aizvākšana no pārtikā vai dzīvnieku barībā izmantotiem lauksaimniecības augiem, piemēram, alergēni, glutēns, rūgti savienojumi un tml. (Sanchez-Leon et al. 2018);
4. Augi, kas pārveidoti, lai ražotu slimības ierobežojošas vielas, piemēram, vīrusveidīgās daļiņas uzņemšanai ar pārtiku vai dzīvnieku barību (Balke and Zeltins 2020; Lemire et al. 2018);
5. Augi, kas pārveidoti, lai uzlabotu kompleksas pazīmes, piemēram, ražību, fotosintēzes kapacitāti, toleranci pret biotisko un abiotisko stresu (De la Concepcion et al. 2019; South et al. 2019).

Minētās jomas ir gan koncepcijas stadijā, gan atsevišķos gadījumos jau sasniegušas lauka izmēģinājumu stadiju. No šī literatūras apskata tika izvēlēti 3 hipotētiski gadījumi, kas ekspertu ieskatā atspoguļo reālus produktus, kas varētu nonākt tirgū tuvāko 10 gadu laikā.

1. Ģenētiski modificēta saldā kukurūza, kas ražo B12 vitamīnu (kobalamīnu). Kukurūza un citi augi šo vitamīnu nespēj sintezēt, tādēļ kukurūzas genomā ir paredzēts ievietot B12 vitamīna biosintēzes gēnus no baktērijām. Kopējais gēnu skaits (25) ievērojami pārsniedz parastajos transgēnajos augos ievietoto svešo gēnu skaitu (Fang et al. 2017), turklāt nepieciešams panākt koordinētu visu biosintēzes gēnu ekspresijas regulāciju. Dotajā brīdī tādus transgēnus augus vēl nav izdevies iegūt, pastāv iespēja, ka to varēs tuvākajos 10 gados paveikt.
2. Transgēnus nesaturoši, glutēna brīvi kvieši. Kvieši ar pazeminātu glutēna daudzumu jau ir radīti izmantojot genoma rediģēšanas metodi vienlaicīgi daudzos a-gliadīna gēnos izmantojot CRISPR/Cas9 metodi (Sanchez-Leon et al. 2018). CRISPR/Cas9 konstrukcija pēc genoma rediģēšanas tika aizvākta no auga genoma izmantojot ģenētisko skaldīšanos, tādējādi iegūstot genomiski rediģētus un transgēnus nesaturošus augus. Lai gan kokrētājā pētījumā iegūtie kvieši nebija pilnīgi brīvi no glutēna, tomēr šo pieeju ir iespējams izmantot, lai nākotnē iegūtu kviešus, kas nesatur nevienu glutenīna un gliadīna proteīnu peptīdus, kuri var izraisīt ar celiakiju saistīto iekaisuma kaskādi.
3. Ģenētiski modificēts pret patogēnām sēnēm izturīgs rapsis, kura genomā ir transgēns slimību izturības gēns un papildus tam arī izmainīti slimību uzņēmības gēni. Šis gadījums balstās uz publicētu pētījumu par paplašināta spektra slimību izturības gēnu rīsos (De la Concepcion et al. 2019), kā arī uz pētījumu, kur parādīta iespēja uzlabot augu slimību izturību, izmainot vai izslēdzot augu slimību uzņēmības gēnus (Zaidi et al. 2018). Tādējādi plānots iegūt augus ar plašāka spektra slimību izturību pret patogēnajām sēnēm.

3.2.4. SynBio organismu molekulārais raksturojums

EPNI ĢMO panelis atzina, ka esošās vadlīnijas un tajās iekļautās prasības molekulārajam ģenētiski modificēto augu raksturojumam ir adekvātas un pietiekamas, lai veiktu SynBio augu

riska novērtēšanu. Tomēr balstoties uz trim izvēlētajiem gadījumiem ir skaidrs, ka atsevišķas prasības nav piemērojamas visiem gadījumiem. Tas īpaši attiecas uz gadījumiem, kad auga genoms nesatur transgēnu(s), bet tikai atsevišķus genomiski rediģētus rajonus. Šādas situācijas ir sīkāk apskatītas EPNI zinātniskajā atzinumā par SDN-1 un SDN-2 nukleāzēm (EFSA GMO Panel, 2020a; Rostoks 2021). EPNI zinātniskais atzinums par SynBio augiem ņēma vērā nepieciešamību izvērtēt sekojošus aspektus:

1. ģenētiskās modifikācijas dizains un izmantotās metodes;
2. modificēto, insertēto vai deletēto sekvenču raksturojums, tai skaitā arī iespējamās *off-target* modifikācijas;
3. informācija par modificēto/ievietoto sekvenču ekspresiju, tai skaitā RNS, proteīnu un metabolītu daudzumu;
4. modificēto vai ievietoto sekvenču ģenētiskā stabilitāte un ģenētiski modificētā auga fenotipiskā stabilitāte;
5. bioinformātiskās analīzes prasības, tai skaitā attiecībā uz jauniem nolasīšanas rāmjiem (ORF), alerģenitāti, toksiskumu un horizontālās gēnu pārnesei iespēju;
6. iespējamām mijiedarbībām saliktajos notikumos (angl. *stacked events*).

Noslēgumā jāatzīmē, ka SynBio augu iegūšanā izmantotās metodes principā ir zināmas un, ar tām saistītie riski ir zināmi un nosakāmi izmantojot esošās vadlīnijas. Tomēr šo metožu pielietojuma rezultātā SynBio augiem var piešķirt kvantitatīvas pazīmes, kuras kontrolē vairāki gēni, vai arī ievietot gēnus, kas veido veselus biosintēzes ceļus, kā arī veidot jaunus gēnus, kuri augiem piešķir jaunas īpašības. Tādējādi sagaidāms SynBio augu pazīmju kompleksitātes pieaugums, kas padarīs riska novērtējumu sarežģītāku.

3.2.5. SynBio organismu vides riska novērtēšana

EPNI GMO panelis atzina, ka esošās vadlīnijas un tajās iekļautās prasības SynBio augu vides riska novērtēšanai ir adekvātas un pietiekamas, lai veiktu SynBio augu riska novērtēšanu. Tomēr balstoties uz trim izvēlētajiem gadījumiem ir skaidrs, ka ne visas vadlīniju prasības attiecas uz visiem trijiem izskatītajiem gadījumiem. Tas attiecas uz gadījumiem, kad augi nesatur transgēnu sekvences, vai arī nesatur mikrobiālas izcelsmes DNS sekvences, kas varētu veicināt horizontālo gēnu pārnesei. Augiem, kas izturīgi pret patogēnām sēnēm būtu nepieciešams raksturot mijiedarbības ar mērķa un nemērķa organismiem, kamēr pārējiem gadījumiem tas nebūtu nepieciešams.

EPNI zinātniskais atzinums par SynBio augiem ņēma vērā nepieciešamību izvērtēt sekojošus aspektus:

1. invazitāte un noturība apkārtējā vidē, tai skaitā gēnu plūsma no auga uz augu;
2. gēnu plūsma no auga uz mikroorganismiem (horizontālā gēnu pārnese);
3. SynBio augu mijiedarbības ar mērķa organismiem;
4. SynBio augu mijiedarbības ar nemērķa organismiem;
5. ietekme uz augu audzēšanas praksi un ražas novākšanu;
6. ietekme uz biogeoķīmiskajiem procesiem;
7. ietekme uz cilvēka un dzīvnieku veselību
8. *post-market* vides monitoringa plāns.

Svarīgi ņemt vērā, ka SynBio augi var saturēt ļoti kompleksas izmaiņas, kas būtiski ietekmētu to agronomiskās, fenotipiskās un sastāva īpašības, kas varētu būtiski ietekmēt to mijiedarbību ar apkārtējo vidi. Tas varētu radīt izaicinājumus salīdzinošajam riska novērtējumam, tā kā tas definēts EPNI vadlīnijās. Tas varētu novest pie nepieciešamības

izvērtēt katru atsevišķu SynBio augu produktu atsevišķi un katram gadījumam izstrādāt noteiktus izmēramos parametrus, piemēram, B12 vitamīna daudzums. Varētu rasties situācijas, kad nav iespējams atrast atbilstošu salīdzinātāju (angl. *comparator*), kas būtu pietiekami ģenētiski līdzīgs, piemēram, abiotiskā stresa tolerances gadījumā izogēns salīdzinātājs varētu būt pārāk uzņēmīgs pret stresu, kas traucētu lauka izmēģinājumu veikšanu.

3.2.6. Secinājumi

SynBio metodes attīstās ļoti strauji, tādēļ EPNI zinātniskajā atzinumā apskatītie gadījumi varētu nenosegt visu metožu klāstu un iegūto fenotipu/pazīmju daudzveidību. Svarīgi, ka dotajā brīdī EPNI ĢMO panelis tomēr neatrada jaunus SynBio sektorus un attīstības virzienus, kas būtu jāņem vērā papildus jau zinātnisko komiteju noteiktajām sešām jomām (ToR1). Attiecībā uz ToR2, netika konstatēti jauni potenciālie riski, kurus SynBio augi varētu radīt cilvēkam, dzīvniekiem un videi. Tāpat netika konstatēts jauns apdraudējums (angl. *hazard*), salīdzinot ar jau zināmajām ģenētiskās modifikācijas metodēm. Literatūras apskats par SynBio augu produktiem, kas varētu nonākt tirgū tuvāko gadu laikā, liecina, ka tie visdrīzāk balstīsies uz jau esošām tehnoloģijām, kā transgēnu ievietošana genomā un genoma rediģēšana, tādēļ tie būs līdzīgi esošajiem ģenētiski modificētajiem augiem. Attiecībā uz ToR3, konstatēts, ka esošās riska novērtēšanas prasības un metodoloģija ir adekvātas un pietiekamas, lai gan visas prasības ir piemērojamas visos gadījumos. Attiecībā uz ToR4 tika konstatēts, ka nepieciešams uzlabot SynBio augu riska novērtēšanu sekojošās jomās:

- termins “ģenētiskā modifikācija” labāk atspoguļo izmaiņas genomā genoma rediģēšanas rezultātā nekā vadlīnijās izmantotais termins “ģenētiskā transformācija”;
- jāprecizē vienkāršo un salikto notikumu jēdziens attiecībā uz SynBio augiem;
- jāprecizē kompleksu pazīmju raksturošanas un novērtēšanas pieejas;
- nepieciešams pilnveidot agronomiskā un fenotipiskā raksturojuma mērījumu (angl. *endpoint*) pielietojumu individuāliem gadījumiem;
- nepieciešams pilnveidot prasības salīdzinātājam (angl. *comparator*);
- nepieciešams izvērtēt citas riska novērtēšanas pieejas, kas neizmanto salīdzinātāju;
- jāizvērtē iespēja izmantot “*safe-by-design*” jēdzienu SynBio augu veidošanā tādējādi pilnveidojot “*design-build-test-learn*” ciklu;
- ņemt vērā ekosistēmu modelēšanas pieeju SynBio augu mijiedarbību ar vidi novērtēšanā;
- jāuzlabo PMEM attiecībā uz SynBio augiem.

3.2.7. Nākotnes perspektīvas

Dotajā brīdī turpinās darbs pie zinātniskā atzinuma sagatavošanu par pārtikas un dzīvnieku barības riska novērtēšanu SynBio augiem (WP4). SynBio FF WG savu darbu uzsāka 2021. g. februārī, bet darba dokuments tika parādīts ĢMO Panelī 2021. g. septembrī. Zinātniskā atzinuma atbalstīšana sabiedriskajai konsultācijai paredzēta 2021. g. novembrī, bet galīgo atzinumu paredzēts pieņemt 2022. g. jūnijā. Attiecībā uz ToR2, šis zinātniskais atzinums apskatīs konkrētus apdraudējumus un riskus cilvēkam un dzīvniekiem, kurus varētu radīt SynBio augu produkti. Šajā zinātniskajā atzinumā tiek izmantoti tie paši 3 gadījumi, kā jau publicētajā atzinumā, bet papildus paņemts klāt *de novo* domestikācijas piemērs tomātā

(Zsögön et al. 2018), kur izmantojot CRISPR/Cas9 genoma rediģēšanas metodi 6 ģenētiskajos lokusos ir iespējams izmainīt savvaļas *Solanum pimpinellifolium* morfoloģiju un augļu izmēru, skaitu un uzturvērtību. Līdzīgi rezultāti iegūti arī citā pētījumā (Li et al. 2018). Ņemot vērā šo papildus piemēru var rasties jautājums par salīdzinātāju, jo genomiski rediģētais *de novo* domesticētais tomāts ļoti atšķirsies no ģenētiski līdzīgā savvaļas radnieka, kā arī no domesticētā tomāta *Solanum lycopersicum*.

3.3. Genomiski rediģētu organismu risku vadības rekomendācijas

Analizējot zinātnisko literatūru un pētot citu valstu pieredzi Latvijas kontekstā, projekta realizācijas gaitā ir identificēti potenciālie **draudi** sekojošās jomās, kas varētu būt saistītas ar jaunām ģenētisko modifikāciju metodēm iegūtu pārtikas, dzīvnieku barības un to piedevu importu, ražošanu, pārstrādi, tirdzniecību, audzēšanu un izplatīšanu vidē:

1. Pārtikas un dzīvnieku barības drošums;
2. Potenciālā ietekme uz vidi, ja augi, kas iegūti ar jaunajiem ģenētiskajiem paņēmieniem, tiktu audzēti ES un arī Latvijā; gēnu dziņu un JGP dzīvnieku potenciālā ietekme.
3. Nejauši piemaisījumi pārtikā, barībā, to piedevās, sēklās un augu pavairojamajā materiālā;
4. Testēšanas metodes;
5. Tirgus attīstība;
6. Sabiedrības attieksme;
7. Līdzāspastāvēšana ar bioloģisko un no "ĢMO brīvu" produktu tirgus segmentu.

Sīkāka šo potenciālo draudu analīze ir dota 24. tabulā.

Risku novērtējums un risku vadības plāns (balstīts uz EK pētījumā apkopotajiem dalībvalstu un ieinteresēto pušu viedokļiem¹⁴)

Risku novērtējums				
Risks	Riska apraksts	Novērtējums		Risku novēršanas/mazināšanas pasākumi
		Iespējamība	Ietekme	
Pārtikas un dzīvnieku barības drošums	Ar JGP iegūtu produktu ne-mērķa un neparedzēta ietekme uz genomiski rediģētā organisma genomu, kas tālāk varētu radīt potenciāli negatīvas sekas cilvēku, dzīvnieku un augu veselībai un videi. Bažas galvenokārt ir saistītas ar jaunu toksīnu vai alergēnu veidošanos. JGP nav ilgas izmantošanas vēstures, un pašlaik nav pietiekoši daudz zinātniskās informācijas, lai izvērtētu to drošumu.	Tiek vērtēta pretrunīgi. NVO un bioloģiskās/no ĢMO brīvas pārtikas ražotāji saskata potenciālas JGP produktu drošuma problēmas. Citi pārtikas ražotāji, JGP izstrādātāji un akadēmiķi uzskata, ka JGP produkti ir droši.	Grūti paredzēt ietekmi, jo pašlaik nav pietiekoši daudz zinātniskās informācijas, lai izvērtētu ar JGP iegūtu produktu drošumu.	Risku novērtēšanas procedūru un vadlīniju pielāgošana JGP, it sevišķi attiecībā uz molekulāro raksturojumu un vides monitoringu (galvenokārt attiecībā uz gēnu dziņu organismu ne-mērķa ietekmi). Fokusēšanās uz produktu, nevis uz ģenētiskajā modifikācijā izmantoto metodi.
Potenciālā ietekme uz vidi, ja augi, kas iegūti ar jaunajiem ģenētiskajiem paņēmieniem, tiktu audzēti ES un arī Latvijā;	Jaunu īpašību ieviešana, mijiedarbība ar savvaļas sugām, gēnu pārnese, ietekme uz barības ķēdēm, ietekme uz mijiedarbību starp augiem un apputeksnētājiem, ietekme uz mikrobiomiem, ietekme uz bioloģisko daudzveidību,	Tiek vērtēta pretrunīgi. Tie, kas uzskata JGP produktus par drošiem, to pamato ar izmantoto paņēmienu augsto specifiskumu. Nav	Grūti paredzēt ietekmi, jo pašlaik nav pietiekoši daudz zinātniskās informācijas, lai izvērtētu ar JGP iegūtu produktu drošumu.	SAM HLG ir secinājusi, ka JGP drošums ir jāvērtē individuāli katrā gadījumā, un tas ir atkarīgs no konkrētā produkta īpašībām, paredzētā pielietojuma un saņemotās vides.

¹⁴ Study on the status of new genomic techniques under Union law and in light of the Court of Justice ruling in Case C-528/16.

gēnu dziņu un JGP dzīvnieku potenciālā ietekme.	potenciāli nekontrolēta ĢMO izplatība vidē, potenciāla neiespējamība "atsaukt" šādus organismus pēc izplatīšanas vidē, kā arī ietekme uz visu savvaļas populāciju kopumā, izplatot vidē gēnu dziņu organismus. Jaunu kaitēkļu rašanās veicināšana un kaitēkļu rezistences veidošanās. JGP dzīvnieku labturības jautājumi, nevajadzīgas dzīvnieku ciešanas un nāve eksperimentu laikā, epigēnētiskie un epistatiskie efekti, dzīvnieku integritāte.	sagaidāms, ka ģenētiski un fenotipiski līdzīgi produkti, kas iegūti, izmantojot dažādas metodes, radītu būtiski atšķirīgus riskus.		
Nejauši piemaisījumi pārtikā, barībā, to piedevās, sēklās un augu pavairojamajā materiālā	Lielākā daļa ES dalībvalstu pašlaik nav adaptējušas savas ĢMO uzraudzības sistēmas, lai ietvertu arī JGP produktus. Citi apgalvo, ka, tā kā ES Tiesa nolēma, ka JGP produkti ir ĢMO un uz tiem attiecas ES ĢMO tiesību akti, un likumdevējs pēc sprieduma nav grozījis ĢMO izpildes noteikumus, esošajai ĢMO uzraudzības izpildei vajadzētu būt pietiekamai, lai aptvertu JGP. Citas valstis uzskata, ka pašlaik nav pierādījumu tam, ka JGP produkti jau ir ES tirgū, līdz ar to nav nepieciešams mainīt ĢMO uzraudzības izpildi.	Zema.	Zema.	Dažas dalībvalstis ir adaptējušas savas uzraudzības sistēmas, piemēram, iekļaujot papildus jautājumus, kas tiek uzdoti inspekciju laikā. Būtu nepieciešama JPG-specifiska paraugu ņemšanas stratēģiju izstrāde.

Testēšanas metodes	Testēšanas metožu limitētās iespējas diferencēt JGP produktus no identiskām izmaiņām genomā, kas var būt radušās nejauši vai konvencionālās selekcijas rezultātā. Gandrīz neiespējami detektēt nezināmus JGP produktus. Daļa ES dalībvalstu uzskata, ka uzticamu detekcijas metožu ieviešana varētu būt pārāk dārga, metodēm varētu būt neiespējami sasniegt nepieciešamos metožu performances kritērijus, līdz ar to ar tām iegūtie rezultāti varētu tikt apstrīdēti tiesā.	Augsta, it īpaši ja ir veiktas viena vai dažu nukleotīdu nomaiņas, insercijas vai delēcijas. Garākas insercijas un delēcijas, kas rezultējas ar vairāku allēļu un gēnu izslēgšanu, varētu būt vieglāk diagnosticēt.	Augsta, kā arī pašlaik trūkst empīrisku datu, ir tikai teorētiski pieņēmumi.	Pastāvīga testēšanas metožu uzlabošana, personāla apmācība. Testēšanas metodēm jāietver - omikas tehnoloģijas¹⁵, pilna genoma sekvencēšana, kā arī ir jābūt globālai datu bāzei, kas ietver visu nepieciešamo informāciju par JGP un ar tiem saistītajiem patentiem.
Tirgus attīstība	NVO un bioloģiskās/no ĢMO brīvas pārtikas ražotāju neticība tam, ka JGP varētu dot labumu lauksaimniecības un pārtikas sektoram. Uzskats, ka potenciālie ieguvumi var tikt sasniegti ar citām lauksaimniecības metodēm, kā arī, ka ieguvēji būs tikai daži tirgus dalībnieki, bet ne sabiedrība kopumā. Uzskats, ka aiz JGP attīstības stāv daudznacionālas	Tiek vērtēta pretrunīgi. Konvencionālās pārtikas ražotāji, JGP izstrādātāji un akadēmiķi uzskata, ka JGP dos būtisku labumu sektoram un sabiedrībai kopumā, kā arī atbilst ES zaļā kursa mērķiem un	Grūti paredzēt ietekmi, jo pašlaik nav pietiekoši daudz zinātniskās informācijas, lai izvērtētu šos pretrunīgos viedokļus.	Komunikācija un sadarbība ar NVO un bioloģiskās/no ĢMO brīvas pārtikas ražotājiem, izglītojošu semināru organizēšana.

¹⁵Hrbek, V., Krtkova, V., Rubert, J., Chmelarova, H., Demnerova, K., Ovesna, J., & Hajslova, J. (2017). Metabolomic strategies based on high-resolution mass spectrometry as a tool for recognition of GMO (MON 89788 Variety) and non-GMO soybean: A critical assessment of two complementary methods. Food Analytical Methods, 10(11), 3723-3737.

	korporācijas, kuras dod priekšroku viendabīgam sēklas materiālam, monokultūrām, vai specifiskiem ģenētiskajiem resursiem, kas dod labumu tikai vienā lauksaimniecības modelī.	stratēģijai “No lauka līdz galdam”. Ieguvumi varētu būt augi ar uzlabotu toleranci vai izturību pret abiotisku un biotisku stresu (tai skaitā klimata izmaiņu ietekmi), augi ar paaugstinātu ražu un augi ar samazinātu tādu kaitīgo vielu sastāvu kā alergēni, toksīni un ķīmisku un piesārņojošu vielu klātbūtni. Citi ieguvumi varētu būt saistīti ar augu aizsardzības līdzekļu un mēslošanas līdzekļu iespējamu samazinājumu, kā arī ātrāks selekcijas process.		
Sabiedrības attieksme	Vispārējai sabiedrībai varētu būt grūti iesaistīties diskusijās par šiem produktiem, kā arī tā varētu būt pakļauta sliktas kvalitātes informācijai.	Augsta	Augsta	Regulāra informatīvu semināru rīkošana, populārzinātnisku rakstu publicēšana.

Līdzāspastāvēšana ar bioloģisko un no "ĢMO brīvu" produktu tirgus segmentu	Draudi "no ĢMO brīva" tirgus sektora un JGP produktu līdzāspastāvēšanai, kas būtu īpaši aktuāli tādā gadījumā, ja JGP produktus izslēgtu ārpus ĢMO regulējuma.	Augsta	Augsta	Izsekojamība kopā ar analītiskajām detekcijas metodēm, tai skaitā alternatīvas izsekojamības sistēmas, kas varētu būt balstītas uz dokumentiem balstītu izsekojamību, kā tas ir no ĢMO iegūtas eļļas gadījumā, bioloģiskajā lauksaimniecībā, liellopu gaļas izcelsmes pierādīšanā; no-JGP brīvu sertifikātu sistēmas ieviešana; ražošanas ķēdes caurspīdīgums, kam varētu būt nepieciešamas segregētas piegādes ķēdes; sekvenēšanas informācijas uzkrāšana ES līmenī un no visiem tirdzniecības partneriem; JGP-specifiska paraugu ņemšanas stratēģiju izstrāde. Līdzāspastāvēšanas nodrošināšanai var izmantot principus un rekomendācijas no līdz šim izstrādātajām vadlīnijām, piemēram, EFSA, 2018 ¹⁶ .
--	--	--------	--------	---

¹⁶ Rizov, I., Rühl, G., Langhof, M., Kathage, J., & Rodríguez-Cerezo, E. (2018). *Best practice document for the coexistence of genetically modified potato with conventional and organic farming* (No. JRC109645). Joint Research Centre (Seville site).

Izmantotā literatūra

- Abbas CA, Sibirny AA. Genetic control of biosynthesis and transport of riboflavin and flavin nucleotides and construction of robust biotechnological producers. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2011 Jun;75(2):321-60.
- Ahmed, Y., Rebets, Y., Estévez, M. R., Zapp, J., Myronovskyi, M., & Luzhetskyy, A. (2020). Engineering of *Streptomyces lividans* for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters. *Microbial cell factories*, 19(1), 1-16.
- Aman Mohammadi, M., Ahangari, H., Mousazadeh, S., Hosseini, S. M., & Dufossé, L. (2021). Microbial pigments as an alternative to synthetic dyes and food additives: a brief review of recent studies. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 1-12.
- Anzalone, A. V., Randolph, P. B., Davis, J. R., Sousa, A. A., Koblan, L. W., Levy, J. M., ... & Liu, D. R. (2019). Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*, 576(7785), 149-157.
- Appelhagen I, Wulff-Vester AK, Wendell M, Hvoslef-Eide A-K, Russell J, Oertel A, Martens S, Mock H-P, Martin C, Matros A (2018) Colour bio-factories: Towards scale-up production of anthocyanins in plant cell cultures. *Metabolic Engineering* 48:218-232
- Areal, F. J., & Riesgo, L. (2021). EU Inspections of GM Content in Food and Feed: Are They Effective?. *Agriculture*, 11(9), 842.
- Arshad, Z. I. M., Amid, A., Yusof, F., Jaswir, I., Ahmad, K., & Loke, S. P. (2014). Bromelain: an overview of industrial application and purification strategies. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(17), 7283-7297.
- Auchtung JM, Lee CA, Monson RE, Lehman AP, Grossman AD. Regulation of a *Bacillus subtilis* mobile genetic element by intercellular signaling and the global DNA damage response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Aug 30;102(35):12554-9.
- Bae, S. J., Park, B. G., Kim, B. G., & Hahn, J. S. (2020). Multiplex gene disruption by targeted base editing of *Yarrowia lipolytica* genome using cytidine deaminase combined with the CRISPR/Cas9 system. *Biotechnology journal*, 15(1), 1900238.
- Balke I, Zeltins A (2020) Recent Advances in the Use of Plant Virus-Like Particles as Vaccines. *Viruses* 12
- Barbau-Piednoir E, De Keersmaecker SC, Delvoye M, Gau C, Philipp P, Roosens NH. Use of next generation sequencing data to develop a rIPK method for specific detection of EU-unauthorized genetically modified *B. subtilis* overproducing riboflavin. *BMC Biotechnol.* 2015b Nov 11;15:103.
- Barbau-Piednoir E, De Keersmaecker SC, Wuyts V, Gau C, Pirovano W, Costessi A, Philipp P, Roosens NH. Genome Sequence of EU-Unauthorized Genetically Modified *B. subtilis* Strain 2014-3557 Overproducing Riboflavin, Isolated from a Vitamin B2 80% Feed Additive. *Genome Announc.* 2015a Apr 9;3(2):e00214-15.
- Barbe V, Cruveiller S, Kunst F, Lenoble P, Meurice G, Sekowska A, Vallenet D, Wang T, Moszer I, Médigue C, Danchin A. From a consortium sequence to a unified sequence: the *Bacillus subtilis* 168 reference genome a decade later. *Microbiology (Reading)*. 2009 Jun;155(Pt 6):1758-1775.
- Berbers B, Saltykova A, Garcia-Graells C, Philipp P, Arella F, Marchal K, Winand R, Vanneste K, Roosens NHC, De Keersmaecker SCJ. Combining short and long read sequencing to

- characterize antimicrobial resistance genes on plasmids applied to an unauthorized genetically modified *Bacillus*. *Sci Rep*. 2020 Mar 9;10(1):4310
- Bernal, V., Sevilla, Á., Cánovas, M., & Iborra, J. L. (2007). Production of L-carnitine by secondary metabolism of bacteria. *Microbial cell factories*, 6(1), 1-17.
- Betancor MB, Sprague M, Sayanova O, Usher S, Metochis C, Campbell PJ, Napier JA, Tocher DR (2016) Nutritional Evaluation of an EPA-DHA Oil from Transgenic *Camelina sativa* in Feeds for Post-Smolt Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *PLOS ONE* 11:e0159934
- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C., Al-Ghalith, G. A., ... & Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology* 37: 852–857.
- Breitenbach J, Nogueira M, Farré G, Zhu C, Capell T, Christou P, Fleck G, Focken U, Fraser PD, Sandmann G (2016) Engineered maize as a source of astaxanthin: processing and application as fish feed. *Transgenic Research* 25:785-793
- Cangiano G, Sirec T, Panarella C, Isticato R, Baccigalupi L, De Felice M, Ricca E. The *sps* Gene Products Affect the Germination, Hydrophobicity, and Protein Adsorption of *Bacillus subtilis* Spores. *Appl Environ Microbiol*. 2014 Dec;80(23):7293-302.
- De la Concepcion JC, Franceschetti M, MacLean D, Terauchi R, Kamoun S, Banfield MJ (2019) Protein engineering expands the effector recognition profile of a rice NLR immune receptor. *eLife* 8:e47713
- Debode, F., Huber, I., Macarthur, R., Rischitor, P. E., Mazzara, M., Herau, V., ... & Zel, J. (2017). Inter-laboratory studies for the validation of two singleplex (tE9 and pea lectin) and one duplex (pat/bar) real-time PCR methods for GMO detection. *Food Control*, 73, 452-461.
- Deckers M, Vanneste K, Winand R, Keersmaecker SCJ, Denayer S, Heyndrickx M, Deforce D, Fraiture MA, Roosens NHC. Strategy for the identification of micro-organisms producing food and feed products: Bacteria producing food enzymes as study case. *Food Chem*. 2020 Feb 1;305:125431.
- Deckers, M., Deforce, D., Fraiture, M. A., & Roosens, N. H. (2020a). Genetically modified micro-organisms for industrial food enzyme production: an overview. *Foods*, 9(3), 326.
- Dorn-In S, Bassitta R, Schwaiger K, Bauer J, Hölzel CS. Specific amplification of bacterial DNA by optimized so-called universal bacterial primers in samples rich of plant DNA. *J Microbiol Methods*. 2015 Jun;113:50-6.
- EFSA GMO Panel, Naegeli H, Bresson J-L, Dalmay T, Dewhurst IC, Epstein MM, Firbank LG, Guerche P, Hejatko J, Moreno FJ, Mullins E, Nogué F, Sánchez Serrano JJ, Savoini G, Veromann E, Veronesi F, Casacuberta J, Gennaro A, Paraskevopoulos K, Raffaello T, Rostoks N (2020a) Applicability of the EFSA Opinion on site-directed nucleases type 3 for the safety assessment of plants developed using site-directed nucleases type 1 and 2 and oligonucleotide-directed mutagenesis. *EFSA Journal* 18:e06299
- EFSA GMO Panel, Naegeli H, Bresson J-L, Dalmay T, Dewhurst IC, Epstein MM, Firbank LG, Guerche P, Hejatko J, Moreno FJ, Nogue F, Rostoks N, Sanchez Serrano JJ, Savoini G, Veromann E, Veronesi F, Casacuberta J, De Schrijver A, Messean A, Patron N, Zurbruggen M, Alvarez F, Devos Y, Gennaro A, Streissl F, Papadopoulou N, Mullins E (2021) Evaluation of existing guidelines for their adequacy for the molecular characterisation and environmental risk assessment of genetically modified plants obtained through synthetic biology. *EFSA Journal* 19:e06301
- EFSA GMO Panel, Naegeli H, Bresson J-L, Dalmay T, Dewhurst IC, Epstein MM, Guerche P, Hejatko J, Moreno FJ, Mullins E, Nogué F, Rostoks N, Sánchez Serrano JJ, Savoini G, Veromann E, Veronesi F, Bonsall MB, Mumford J, Wimmer EA, Devos Y, Paraskevopoulos

- K, Firbank LG (2020b) Adequacy and sufficiency evaluation of existing EFSA guidelines for the molecular characterisation, environmental risk assessment and post-market environmental monitoring of genetically modified insects containing engineered gene drives. EFSA Journal 18:e06297
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), Koutsoumanis K, Allende A, Alvarez-Ordóñez A, Bolton D, Bover-Cid S, Chemaly M, Davies R, De Cesare A, Hilbert F, Lindqvist R, Nauta M, Peixe L, Ru G, Simmons M, Skandamis P, Suffredini E, Cocconcelli PS, Fernández Escámez PS, Maradona MP, Querol A, Suarez JE, Sundh I, Vlak J, Barizzone F, Correia S, Herman L. Scientific Opinion on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA (2017-2019). EFSA J. 2020 Feb 3;18(2):e05966.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), Ricci A, Allende A, Bolton D, Chemaly M, Davies R, Girones R, Herman L, Koutsoumanis K, Lindqvist R, Nørrung B, Robertson L, Ru G, Sanaa M, Simmons M, Skandamis P, Snary E, Speybroeck N, Ter Kuile B, Threlfall J, Wahlström H, Cocconcelli PS, Klein G, Prieto Maradona M, Querol A, Peixe L, Suarez JE, Sundh I, Vlak JM, Aguilera-Gómez M, Barizzone F, Brozzi R, Correia S, Heng L, Istace F, Lythgo C, Fernández Escámez PS. Scientific Opinion on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA. EFSA J. 2017 Mar 14;15(3):e04664.
- EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP), Bampidis V., Azimonti G., Bastos M. D. L., Christensen H., Dusemund B., ... & Pizzo F. (2020). Assessment of the application for renewal of authorisation of Biosprint® (*Saccharomyces cerevisiae* MUCL 39885) as a feed additive for weaned piglets. EFSA Journal, 18(11), e06284.
- EFSA Scientific Committee, More S, Bampidis V, Benford D, Bragard C, Halldorsson T, Hernández-Jerez A, Susanne HB, Koutsoumanis K, Machera K, Naegeli H, Nielsen SS, Schlatter J, Schrenk D, Silano V, Turck D, Younes M, Glandorf B, Herman L, Tebbe C, Vlak J, Aguilera J, Schoonjans R, Cocconcelli PS (2020) Evaluation of existing guidelines for their adequacy for the microbial characterisation and environmental risk assessment of microorganisms obtained through synthetic biology. EFSA Journal 18:e06263
- Eiropas Parlamenta un Padomes Regula (EK) Nr. 1331/2008, ar ko nosaka vienotu atļauju piešķiršanas procedūru attiecībā uz pārtikas piedevām, fermentiem un aromatizētājiem. OV L 354, 31.12.2008., 1./6. lpp.
- Eiropas Parlamenta un Padomes Regula (EK) Nr. 1332/2008 par pārtikas fermentiem un par grozījumiem Padomes Direktīvā 83/417/EEK, Padomes Regulā (EK) Nr. 1493/1999, Direktīvā 2000/13/EK, Padomes Direktīvā 2001/112/EK un Regulā (EK) Nr. 258/97). OV L 354, 31.12.2008., 7./15. lpp.
- Eiropas Parlamenta un Padomes Regula (EK) Nr. 1333/2008 par pārtikas piedevām. OV L 354, 31.12.2008., 16./33. lpp.
- Eiropas Parlamenta un Padomes Regula (EK) Nr. 1334/2008 par aromatizētājiem un dažām pārtikas sastāvdaļām ar aromatizētāju īpašībām izmantošanai pārtikā un uz tās un par grozījumiem Padomes Regulā (EEK) Nr. 1601/91, Regulās (EK) Nr. 2232/96 un (EK) Nr. 110/2008 un Direktīvā 2000/13/EK. OV L 354, 31.12.2008., 34./50. lpp.
- Eiropas Parlamenta un padomes Regula (EK) Nr. 1829/2003 (2003. gada 22. septembris) par ģenētiski modificētu pārtiku un barību. OV L 268, 18.10.2003., 1./23. lpp.

- European Food Safety Authority (EFSA). EFSA statement on the risk posed to humans by a vitamin B2 produced by a genetically modified strain of *Bacillus subtilis* used as a feed additive. *EFSA J.* 2019 Apr 23;17(4):e05615.
- Fang H, Kang J, Zhang D (2017) Microbial production of vitamin B12: a review and future perspectives. *Microb Cell Fact* 16:15
- Fatma, Z., Schultz, J. C., & Zhao, H. (2020). Recent advances in domesticating non-model microorganisms. *Biotechnology progress*, 36(5), e3008.
- Fraiture MA, Bogaerts B, Winand R, Deckers M, Papazova N, Vanneste K, De Keersmaecker SCJ, Roosens NHC. Identification of an unauthorized genetically modified bacteria in food enzyme through whole-genome sequencing. *Sci Rep.* 2020d Apr 27;10(1):7094.
- Fraiture MA, Deckers M, Papazova N, Roosens NHC. Strategy to Detect Genetically Modified Bacteria Carrying Tetracycline Resistance Gene in Fermentation Products. *Food Analytical Methods.* 2020c 13: 1929-1937.
- Fraiture MA, Deckers M, Papazova N, Roosens NHC. Are antimicrobial resistance genes key targets to detect genetically modified microorganisms in fermentation products? *Int J Food Microbiol.* 2020b Oct 16;331:108749.
- Fraiture MA, Deckers M, Papazova N, Roosens NHC. Detection strategy targeting a chloramphenicol resistance gene from genetically modified bacteria in food and feed products. *Food Control.* 2020a 18:106873.
- Fraiture MA, Joly L, Vandermassen E, Delvoye M, Van Geel D, Michelet JY, Van Hoeck E, De Jaeger N, Papazova N, Roosens NHC. Retrospective survey of unauthorized genetically modified bacteria harbouring antimicrobial resistance genes in feed additive vitamin B2 commercialized in Belgium: Challenges and solutions. *Food Control.* 2021; 119: 107476.
- Fujio, T., & Maruyama, A. (1997). Enzymatic production of pyrimidine nucleotides using *Corynebacterium ammoniagenes* cells and recombinant *Escherichia coli* cells: enzymatic production of CDP-choline from orotic acid and choline chloride (part I). *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 61(6), 956-959
- Fujio, T., Teshiba, S., & Maruyama, A. (1997). Construction of a plasmid carrying both CTP synthetase and a fused gene formed from cholinephosphate cytidylyltransferase and choline kinase genes and its application to industrial CDP-choline production: enzymatic production of CDP-choline from orotic acid (part II). *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 61(6), 960-964.
- Ginésy, M., Rusanova-Naydenova, D., & Rova, U. (2017). Tuning of the Carbon-to-Nitrogen Ratio for the Production of L-Arginine by *Escherichia coli*. *Fermentation*, 3(4), 60.
- High Level Group of Scientific Advisors (2017) New Techniques in Agricultural Biotechnology. In: Innovation DGfRa (ed). European Commission, Brussels
- Hiratsu K, Amemura M, Nashimoto H, Shinagawa H, Makino K. The *rpoE* gene of *Escherichia coli*, which encodes sigma E, is essential for bacterial growth at high temperature. *J Bacteriol.* 1995 May;177(10):2918-22.
- Homann OR, Johnson AD (2010) MochiView: versatile software for genome browsing and DNA motif analysis. *BMC Biol.* 21;8:49.
- Janda JM, Abbott SL. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J Clin Microbiol.* 2007 Sep;45(9):2761-4.
- Kallscheuer, N. (2018). Engineered microorganisms for the production of food additives approved by the European Union—a systematic analysis. *Frontiers in microbiology*, 9, 1746.

- Kleter, G., McFarland, S., Bach, A., Bernabucci, U., Bikker, P., Busani, L., ... & Einspanier, R. (2018). Surveying selected European feed and livestock production chains for features enabling the case-specific post-market monitoring of livestock for intake and potential health impacts of animal feeds derived from genetically modified crops. *Food and Chemical Toxicology*, 117, 66-78.
- Lemire S, Yehl KM, Lu TK (2018) Phage-Based Applications in Synthetic Biology. *Annual Review of Virology* 5:453-476
- Li T, Yang X, Yu Y, Si X, Zhai X, Zhang H, Dong W, Gao C, Xu C (2018) Domestication of wild tomato is accelerated by genome editing. *Nature Biotechnology* 36:1160-1163
- Lodish et al., 2016. *Molecular Cell Biology* 8th ed., Macmillan Learning, 1280 p.
- Ma, W., Cao, W., Zhang, H., Chen, K., Li, Y., & Ouyang, P. (2015). Enhanced cadaverine production from L-lysine using recombinant *Escherichia coli* co-overexpressing CadA and CadB. *Biotechnology letters*, 37(4), 799-806.
- Markey B., Leonard F., Archambault M., Cullinane A., Maguire D. 2013. *Clinical Veterinary Microbiology*, 2nd Edition, section 2, chapter 14 - *Bacillus* species. Elsevier Health Sciences, 656 p.
- Mascher M, Gundlach H, Himmelbach A, Beier S, Twardziok SO, Wicker T, Radchuk V, Dockter C, Hedley PE, Russell J, Bayer M, Ramsay L, Liu H, Haberer G, Zhang X-Q, Zhang Q, Barrero RA, Li L, Taudien S, Groth M, Felder M, Hastie A, Šimková H, Staňková H, Vrána J, Chan S, Muñoz-Amatriaín M, Ounit R, Wanamaker S, Bolser D, Colmsee C, Schmutzer T, Aliyeva-Schnorr L, Grasso S, Tanskanen J, Chailyan A, Sampath D, Heavens D, Clissold L, Cao S, Chapman B, Dai F, Han Y, Li H, Li X, Lin C, McCooke JK, Tan C, Wang P, Wang S, Yin S, Zhou G, Poland JA, Bellgard MI, Borisjuk L, Houben A, Doležel J, Ayling S, Lonardi S, Kersey P, Langridge P, Muehlbauer GJ, Clark MD, Caccamo M, Schulman AH, Mayer KFX, Platzer M, Close TJ, Scholz U, Hansson M, Zhang G, Braumann I, Spannagl M, Li C, Waugh R, Stein N (2017) A chromosome conformation capture ordered sequence of the barley genome. *Nature* 544:427-433
- Mascher M, Wicker T, Jenkins J, Plott C, Lux T, Koh CS, Ens J, Gundlach H, Boston LB, Tulpová Z, Holden S, Hernández-Pinzón I, Scholz U, Mayer KFX, Spannagl M, Pozniak CJ, Sharpe AG, Šimková H, Moscou MJ, Grimwood J, Schmutz J, Stein N (2021) Long-read sequence assembly: a technical evaluation in barley. *The Plant Cell*
- Mironov AS, Korolkova NV, Errais LL, Semenova LE, Perumov DA, Kreneva RA, Glazunov AV, Akishina RI, Iomantas YAV, Abalakina EG, Stoyanova NV, Kozlov YI, Debabov VG. Method for producing riboflavin. WO 2004/046347 A1. https://www.lens.org/lens/patent/WO_2004_046347_A1 (10.05.2021.)
- Nah, H. J., Pyeon, H. R., Kang, S. H., Choi, S. S., & Kim, E. S. (2017). Cloning and heterologous expression of a large-sized natural product biosynthetic gene cluster in *Streptomyces* species. *Frontiers in microbiology*, 8, 394.
- Nilsson, R. H., Larsson, K. H., Taylor, A. F. S., Bengtsson-Palme, J., Jeppesen, T. S., Schigel, D., ... & Abarenkov, K. (2019). The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. *Nucleic acids research*, 47(D1), D259-D264.
- Nockemann, P., Thijs, B., Driesen, K., Janssen, C. R., Van Hecke, K., Van Meervelt, L., ... & Binnemans, K. (2007). Choline saccharinate and choline acesulfamate: ionic liquids with low toxicities. *The Journal of Physical Chemistry B*, 111(19), 5254-5263.
- O'Leary NA, Wright MW, Brister JR, Ciufo S, Haddad D, McVeigh R, Rajput B, Robbertse B, Smith-White B, Ako-Adjei D, Astashyn A, Badretdin A, Bao Y, Blinkova O, Brover V,

- Chetvernin V, Choi J, Cox E, Ermolaeva O, Farrell CM, Goldfarb T, Gupta T, Haft D, Hatcher E, Hlavina W, Joardar VS, Kodali VK, Li W, Maglott D, Masterson P, McGarvey KM, Murphy MR, O'Neill K, Pujar S, Rangwala SH, Rausch D, Riddick LD, Schoch C, Shkeda A, Storz SS, Sun H, Thibaud-Nissen F, Tolstoy I, Tully RE, Vatsan AR, Wallin C, Webb D, Wu W, Landrum MJ, Kimchi A, Tatusova T, DiCuccio M, Kitts P, Murphy TD, Pruitt KD. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Res.* 2016 Jan 4;44(D1):D733-45.x
- Paracchini V, Petrillo M, Reiting R, Angers-Loustau A, Wahler D, Stolz A, Schöning B, Matthies A, Bendiek J, Meinel DM, Pecoraro S, Busch U, Patak A, Kreysa J, Grohmann L. Molecular characterization of an unauthorized genetically modified *B. subtilis* production strain identified in a vitamin B2 feed additive. *Food Chem.* 2017 Sep 1;230:681-689.
- Park, S. H., Kim, H. U., Kim, T. Y., Park, J. S., Kim, S. S., & Lee, S. Y. (2014). Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-arginine production. *Nature communications*, 5(1), 1-9.
- Perkins JB, Sloma A, Hermann T, Theriault K, Zachgo E, Erdenberger T, Hannett N, Chatterjee NP, Williams V, Rufo Jr GA, Hatch R, Pero J. Genetic engineering of *Bacillus subtilis* for the commercial production of riboflavin. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 1999; 22:8-18.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., ... & Glöckner, F. O. (2012). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic acids research*, 41(D1), D590-D596.
- Radzikowski, D., Milczarek, A., Janocha, A., Ostaszewska, U., & Niedziałek, G. (2021). Feed additives in the diet of high-producing dairy cows. *Acta Scientiarum Polonorum Zootechnica*, 19(4), 5-16.
- Rostoks N (2021) Implications of the EFSA Scientific Opinion on Site Directed Nucleases 1 and 2 for Risk Assessment of Genome-Edited Plants in the EU. *Agronomy* 11:572
- Rostoks, N., Schmierer, D., Mudie, S., Drader, T., Brueggeman, R., Caldwell, D. G., ... & Kleinhofs, A. (2006). Barley necrotic locus *nec1* encodes the cyclic nucleotide-gated ion channel 4 homologous to the Arabidopsis HLM1. *Molecular Genetics and Genomics*, 275(2), 159-168.
- Sanchez-Leon S, Gil-Humanes J, Ozuna CV, Gimenez MJ, Sousa C, Voytas DF, Barro F (2018) Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnol J* 16:902-910
- SCENIHR, SCCS, and SCHER (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks, Scientific Committee on Consumer Safety and Scientific Committee on Health and Environmental Risks), 2014. Synthetic Biology I Definition, Opinion, 25 September, 2014. Available online: http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/docs/scenih_r_o_044.pdf
- SCENIHR, SCHER and SCCS (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks, Scientific Committee on Health and Environmental Risks, and Scientific Committee on Consumer Safety), 2015a. Synthetic Biology II - Risk assessment methodologies and safety aspects, Opinion, May 2015. Available online: http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/docs/scenih_r_o_048.pdf
- SCENIHR, SCHER and SCCS (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks and Scientific Committee on Health and Environmental Risks and Scientific Committee on Consumer Safety), 2015b. Synthetic Biology III – Research priorities, Opinion, December 2015. Available online: http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/docs/scenih_r_o_050.pdf

- Schuster, M., & Kahmann, R. (2019). CRISPR-Cas9 genome editing approaches in filamentous fungi and oomycetes. *Fungal Genetics and Biology*, 130, 43-53.
- Schwartz, C., Cheng, J. F., Evans, R., Schwartz, C. A., Wagner, J. M., Anglin, S., ... & Wheeldon, I. (2019). Validating genome-wide CRISPR-Cas9 function improves screening in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Metabolic engineering*, 55, 102-110.
- Shi, J., & Liang, C. (2019). Generic Repeat Finder: a high-sensitivity tool for genome-wide de novo repeat detection. *Plant physiology*, 180(4), 1803-1815.
- South PF, Cavanagh AP, Liu HW, Ort DR (2019) Synthetic glycolate metabolism pathways stimulate crop growth and productivity in the field. *Science* 363:eaat9077
- Srinivasan R, Karaoz U, Volegova M, MacKichan J, Kato-Maeda M, Miller S, Nadarajan R, Brodie EL, Lynch SV. Use of 16S rRNA gene for identification of a broad range of clinically relevant bacterial pathogens. *PLoS One*. 2015 Feb 6;10(2):e0117617.
- Sun, L., Xin, F., & Alper, H. S. (2021). Bio-synthesis of food additives and colorants-a growing trend in future food. *Biotechnology Advances*, 107694.
- Turgeon N, Laflamme C, Ho J, Duchaine C. Evaluation of the plasmid copy number in *B. cereus* spores, during germination, bacterial growth and sporulation using real-time PCR. *Plasmid*. 2008 Sep;60(2):118-24.
- Unkel K, Krause D, Sprink T, Hartung F, Wilhelm R (2020) Mapping of plant SynBio developments in the agri-food sector. *EFSA Supporting Publications* 17:1687E
- Utagawa, T. (2004). Production of arginine by fermentation. *The Journal of nutrition*, 134(10), 2854S-2857S.
- Vassilev, I., Gießelmann, G., Schwechheimer, S. K., Wittmann, C., Virdis, B., & Krömer, J. O. (2018). Anodic electro-fermentation: Anaerobic production of L-Lysine by recombinant *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnology and bioengineering*, 115(6), 1499-1508.
- Wang, Y. Y., Shi, K., Chen, P., Zhang, F., Xu, J. Z., & Zhang, W. G. (2020). Rational modification of the carbon metabolism of *Corynebacterium glutamicum* to enhance L-leucine production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 47(6-7), 485-495.
- Wang, Y. Y., Xu, J. Z., & Zhang, W. G. (2019). Metabolic engineering of L-leucine production in *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum*: a review. *Critical reviews in biotechnology*, 39(5), 633-647.
- Wicker T, Sabot F, Hua-Van A, Bennetzen JL, Capy P, Chalhoub B, Flavell A, Leroy P, Morgante M, Panaud O, Paux E, Sanmiguél P, Schulman AH (2007) A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nature Reviews Genetics* 8:973-982
- Winkler WC, Cohen-Chalamish S, Breaker RR. An mRNA structure that controls gene expression by binding FMN. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Dec 10;99(25):15908-13.
- Zaidi SS-e-A, Mukhtar MS, Mansoor S (2018) Genome Editing: Targeting Susceptibility Genes for Plant Disease Resistance. *Trends in Biotechnology* 36:898-906
- Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, Aarestrup FM, Larsen MV. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother*. 2012 Nov;67(11):2640-4.
- Zsögön A, Čermák T, Naves ER, Notini MM, Edel KH, Weinl S, Freschi L, Voytas DF, Kudla J, Peres LEP (2018) De novo domestication of wild tomato using genome editing. *Nature Biotechnology* 36:1211-1216.

Pielikumi

1. pielikums. Projekta darba grupas sanāksmes PROTOKOLS 1

Darba grupas sanāksme notiek attālināti, izmantojot Zoom

2021. gada 25. februārī, plkst. 13:00

Sēdē piedalās:

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

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

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

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

Elizabete Miltiņa, LU maģistrantūras studente, vecākā speciāliste, Zinātniskais institūts BIOR;

Guntis Boikmanis, LU un BIOR doktorantūras students.

Sanāksmi protokolē: projekta vadītāja L. Grantiņa-leviņa. Sanāksme tiek ierakstīta Zoom.

Sanāksmes darba kārtība:

1. L. Grantiņa-leviņa – ievads, informācija par projekta mērķi, darba uzdevumiem 2021. gadā. L. Grantiņa-leviņa informē, ka informācija par projektu ir ievietota Institūta BIOR mājas lapā janvārī.
 2. L. Grantiņa-leviņa informē par tuvākajām aktivitātēm projektā un pienākumu sadalījumu atbilstoši projekta uzdevumiem.
1. **uzdevums.** Veikt ekspozīcijas novērtējumu atbilstoši aktuālajai situācijai - eksperimentālu situācijas novērtēšanu, pārtikas un dzīvnieku barības un to piedevu paraugiem, kas iegūti mazumtirdzniecībā un no dzīvnieku barības ražotājiem, nosakot kvalitatīvu un kvantitatīvu ĢMO klātbūtni. Genomiski rediģētie organismi tiks analizēti pēc literatūras datiem, bet ekspozīcija tiks noteikta tradicionālajiem ĢMO un ĢMM. – Projekta vadītāja informē, ka ir saņemts viens paraugs no Pārtikas un veterinārā dienesta Robežkontroles departamenta (dzīvnieku barība – holīna hlorīds ar kukurūzu no Ķīnas). Gada laikā PVD plāno paņemt

projekta vajadzībām piecus paraugus. Notiek darbs pie projekta 1. gada noslēgumā mazumtirdzniecībā iegādātajiem 28 pārtikas un dzīvnieku barības paraugiem.

Paredzētais darbu sadalījums literatūras analīzei:

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

1.1. Ģenētiski modificētu mikroorganismu izmantošana pārtikas un dzīvnieku barības piedevu ieguvē – L. Grantiņa-Ieviņa, A. Jēriņa;

1.2. Genomiski rediģēti kultūraugi – N. Rostoks, L. Grantiņa-Ieviņa;

1.3. Sintētiskās bioloģijas organismi un to iespējamais pielietojums lauksaimniecībā – N. Rostoks.

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

Lai praktiski izmēģinātu genoma modifikāciju noteikšanu ar NGS, šī projekta ietvaros plānots veikt sekojošus eksperimentus ar modeļorganismiem:

1) Raksturot ar neitronu apstarošanu iegūtas nezināmas delēcijas miežu *nec1* gēnā (Rostoks et al., 2006):

- Amplificēt *nec1* gēna fragmentus;
- Iegūtos PĶR produktus sekvenēt ar Illumina MiSeq;
- Raksturot mutantu *nec1* gēna sekvences;
- Šo ģenētisko materiālu varētu izmantot kā pamatu tālākiem izmēģinājumiem ĢMO detekcijas metožu izstrādē.

2) Kā modeļorganismus izmantot Clearfield rapša šķirnes:

- Pamatojums – Clearfield šķirnes ir izturīgas pret imidazolinonu herbicīdiem, dēļ mutācijām; ALS (AHAS) gēnā. Protams, Clearfield produkti nav ĢMO;
- Mutācijas, kas piešķir imidazolinonu toleranci, ir zināmas;
- Eksperimenta mērķis – ieviest metodi ALS gēna sekvenēšanai BIORā.

Paredzētais darbu sadalījums 2. uzdevuma izpildei:

- 1) **Pārtikas un dzīvnieku barības paraugu analīzes** – E. Miltiņa (DNS ekstrakcija, ĢMO skrīnings, kvalitatīva un kvantitatīva noteikšana). Projekta ietvaros ir iegādāti 28 pārtikas un dzīvnieku barības paraugi, vairāk kā puse no trešajām valstīm. Ir izdalīta DNS un veikts skrīnings. Vairākos paraugos ir konstatēti viens vai vairāki skrīninga gēni. Jāveic paraugos esošo ĢMO notikumu kvalitatīva un kvantitatīva noteikšana.
- 2) **Pārtikas un dzīvnieku barības piedevu paraugu analīzes** – G. Boikmanis (DNS ekstrakcija), J. Ķibilds (sekvenēšana).
- 3) **Darbs ar modeļorganismiem** – G. Boikmanis (PCR reakcijas miežu mutantiem), N. Rostoks (ALS gēna amplificēšanai nepieciešamo praimeru izveide), J. Ķibilds (sekvenēšana). Projekta vadītāja informē, ka oligonukleotīdi miežu amplificēšanai jau ir piegādāti laboratorijā. Projekta darbinieki vienojas, ka N. Rostoks tuvākajās nedēļās miežus izdiedzēs un nogādās uz BIOR.
- 4) **Digitālās PCR izmantošana** – E. Miltiņa, A. Jēriņa (digitālās PCR verifikācija, metodes pielietojums no tirdzniecības vietām iegādāto pozitīvo paraugu kvantificēšanā).

2. **Uzdevums.** Genomiski rediģētu organismu risku vadības rekomendāciju izstrāde. Projekta noslēgumā tiks veikta ar jaunām ģenētisko modifikāciju metodēm iegūtu pārtikas, dzīvnieku barības un to piedevu riska vadības rekomendāciju izstrāde lēmumpieņemējiem. Tiks organizēts vismaz viens seminārs projekta rezultātu popularizēšanai.

Darba uzdevumu sadalījums literatūras analīzes veikšanai genomiski rediģētu organismu risku vadības rekomendāciju izstrādei:

- 1) Organismi, kas izveidoti izmantojot saitspecifiskās nukleāzes – N. Rostoks;
- 2) Gēnu dziņu un sintētiskās bioloģijas organismi – N. Rostoks, L. Grantiņa-leviņa;
- 3) Ģenētiski modificētu mikroorganismu biosintēzes produkti – L. Grantiņa-leviņa, A. Jēriņa.

Diskusija par projekta ieviešanas riskiem. Covid-19 pandēmijas radītās izmaiņas – maiņu darbs, darbs “burbuļos”, projektā iesaistīto BIOR darbinieku noslodze Covid-19 paraugu

testēšanā. Jautājums, vai plānotie darba uzdevumi nav pārāk apjomīgi? Kā kolēģi jūtas attiecībā uz noslodzi? Kopumā projekta eksperti domā, ka pietiks laiks darbam pie projekta. Diskusija par to, ka darba uzdevumus vēl var korigēt līdz projekta pieteikuma iesniegšanai aprīlī. Nolemj tuvākajā laikā sākt ar miežu mutantu pētījumu, lai līdz aprīļa vidum būtu skaidrs, vai to atstājām projekta pieteikumā. Projekta vadītāja ierosina sākt strādāt arī pie literatūras konspektēšanas.

Sanāksmes ieraksts tiks izsūtīts projekta ekspertiem.

Sanāksmi beidz pl. 13:40.

L. Grantiņa-leviņa

2. pielikums. Projekta darba grupas sanāksmes PROTOKOLS 2

Darba grupas sanāksme notiek attālināti, izmantojot Zoom

2021. gada 18. jūnijā, plkst. 10:00

Sēdē piedalās:

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

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

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

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

Elizabete Miltiņa, LU maģistrantūras studente, vecākā speciāliste, Zinātniskais institūts BIOR;

Guntis Boikmanis, LU un BIOR doktorantūras students.

Sanāksmi protokolē: projekta vadītāja L. Grantiņa-leviņa. Sanāksme tiek ierakstīta Zoom.

Sanāksmes darba kārtība:

1. N. Rostoks. Ievads par pētījumā izmantotajām miežu šķirnēm un mutantiem.
2. G. Boikmanis, J. Ķibilds. Prezentācija par miežu pētījuma progresu. Morex šķirnes miežu *NEC1* saturošā genoma rajona analīze.
3. J. Ķibilds. Miežu sekvenču bioinformātisko analīžu rezultāti.
4. A. Jēriņa. Prezentācija par literatūras apkopojumu par tēmu: "Ģenētiski modificētu mikroorganismu izmantošana pārtikas un dzīvnieku barības piedevu ieguvē un to detekcijas metodes";
5. E. Miltiņa, A. Jēriņa, L. Grantiņa-leviņa. dPQR ieviešanas rezultāti.
6. E. Miltiņa, L. Grantiņa-leviņa. Mazumtirdzniecībā iegādāto pārtikas un barības paraugu izmeklējumu rezultāti.
7. L. Grantiņa-leviņa. Turpmākie plānotie darbi projektā – galvenokārt saistīti ar pārtikas, dzīvnieku barības un to piedevu paraugu iegādi mazumtirdzniecībā. Projekta vadītāja

informē, ka ir sazinājusies ar Dzīvnieku barības ražotāju asociācijas vadītāju, kura ir paudusi uzskatu, ka neviens Latvijas ražotājs enzīmus neizmanto, līdz ar to paraugu ieguve no asociācijas biedriem nav iespējama.

Sanāksmes noslēgumā projekta vadītāja informē par dažādām aktualitātēm ĢMO jomā:

- 1) Eiropas savienībā ir iesniegts pirmais pieteikums, kurā ir izmantota CRISPR/Cas9 tehnoloģija - DP-915635-4 kukurūza! Šis pieteikums jau ir pieejams dalībvalstīm komentēšanai. Detekcijai ir paredzēts izmantot kvantitatīvu ĢMO notikumam specifisku PCR metodi.
- 2) Eiropas Komisijas pētījums "Study on the status of new genomic techniques under Union law and in light of the Court of Justice ruling in case C-528/16";
- 3) 27. maijā notika European Enforcement Project on Contained Use and Deliberate Release of GMOs virtuāla sanāksme. Rupert Hochegger (AGES, Austrija) prezentēja uzlabojumus oriģinālajai Cibus rapša detekcijas metodei – qPCR (LNA – Locked Nucleic Acid-PCR) ar alternatīvu praimeru sistēmu, lai paaugstinātu specifiskumu SNV līmenī, LOD 10 kopijas, nenožīmīga krossreaktivitāte. Otrs uzlabojums, izmantojot rhAmpPCR (RNase H atkarīga PCR).

Sanāksmes ieraksts tiks izsūtīts projekta ekspertiem.

Sanāksmi beidz pl. 12:00.

L. Grantiņa-leviņa

3. pielikums. Populārzinātniskā raksta manuskripts

Ģenētiski uzlaboti kultūraugi – mūsu nākotne!

Lelde Grantiņa-Ieviņa, Dr. biol.

Pārtikas drošības dzīvnieku veselības un vides zinātniskais institūts "BIOR"

Nils Rostoks, Dr. biol.

Latvijas Universitāte, Bioloģijas fakultāte

Mūsdienās ģenētisko modifikāciju metodes ir kļuvušas daudz precīzākas nekā pirms 25 gadiem, kad tika reģistrētas pirmās ģenētiski modificēto augu līnijas rapsim, sojai, kukurūzai un citiem kultūraugiem [1]. Šīs metodes dod iespēju selekcijas procesu padarīt daudz ātrāku. Šajā rakstā tiek sniegts neliels ieskats tajā, pie kā pašlaik strādā augu ģenētiķi pasaulē.

Mieži. Zinātnieku grupa Itālijā (*CREA Research Centre for Genomics and Bioinformatics*) strādā pie tā, lai paaugstinātu auglību un graudu veidošanos miežiem. Šajā procesā ir jāņem vērā, ka ogļhidrātu jeb cukuru pārvietošanās īpatnības augā no to avota uz uzglabāšanas audiem, ietekmē daudzus augu augšanas aspektus [2]. Ogļhidrāti augos rodas fotosintēzes procesā. Galvenā ogļhidrātu transporta forma ir disaharīds saharoze, bet daži augi var transportēt lielākas cukuru molekulas, kā arī cukuru spirtus. Galvenā ogļhidrātu uzglabāšanas forma augos ir ciete [7]. Itāļu zinātnieku grupa pētot *SWEET* gēnus miežos, konstatēja, ka *HvSW4* gēna aktivitāte ir saistīta ar vīrišķo sterilitāti. Savukārt, *SW4* ietekmē sēklu aizmešanās efektivitāti vārpā un vārpu skaitu. Graudu ražu miežiem raksturo tādi parametri kā graudu skaits uz laukuma vienību, graudu svars, vārpu skaits uz auga, graudu skaits vārpā, graudu lielums, graudu piepildījums. Pētījumos konstatēts, ka graudu īpašības ietekmē vairāki miRNS gēni. Savukārt, gēni *GRF4*, *SW5* un *miR397/LAC* ietekmē graudu garumu, platumu un biezumu [2].

Savukārt britu zinātnieki no Sainsbury Laboratory ir radījuši kailgraudu miežus GE-NUD Barley, kuriem ar CRISPR-Cas9 gēnu rediģēšanas metodi ir daļēji deletēta (dzēsta) *nud* gēna kodējošā sekvenca. *nud* gēns kodē etilēna atbildes transkripcijas faktoru. *nud* gēns atbild arī par plēkšņgraudu miežu fenotipu un plēksnes piesaistīšanos pie grauda [12]. 2020. gadā šo miežu izstrādātājs pieteica lauka izmēģinājumus ASV, lai noteiktu kailgraudu fenotipa ietekmi uz agronomiskajām īpašībām, iesala un alus ražošanas kvalitāti. Tiek prognozēts, ka būs 10 % samazinājums ražai, bet 7% iesala ekstrakta pieaugums, kā arī ka nebūs citu fenotipisku izmaiņu [14]. Jāpiebilst gan, ka tirgū ir pieejamas kailgraudu miežu šķirnes, kas ir iegūtas tradicionālās selekcijas ceļā, kā arī ir zināms, ka kailgraudu mieži eksistēja jau pirms mūsu ēras [8]. Latvijā arī notiek kailgraudu miežu selekcija, un ir reģistrētas šķirnes 'Irbe' un 'Kornelija' (<https://www.arei.lv/lv/miezi>). Šiem kailgraudu miežiem *nud* gēnā ir dabiska mutācija.

Tomāti. Zinātnieki no Japānas Tsukuba Universitātes sadarbībā ar kompāniju Sanatech Seed Co. ir izveidojuši genomiski rediģētus tomātus high GABA Tomato, kuru augļi satur paaugstinātu γ -aminosviestskābes (γ -aminobutyric acid, GABA) koncentrāciju (1. attēls). Japāņu zinātnieki jau pagājušā gadsimta 90.-jos gados bija konstatējuši, ka tomātu augļi dabiski satur salīdzinoši daudz šīs vielas [11].



1.attēls. Tomāti ar augstu γ -aminosviestskābes saturu (foto: <https://sanatech-seed.com/en/airprocess200817/>)

Šie tomāti iegūti izmantojot *Solanum lycopersicum* šķirni 'Sicilian Rouge CF', ar CRISPR/Cas tehnoloģiju veicot izmaiņas glutamīnskābes dekarboksilāzes gēnā (*gad*). Mutācijas mērķis bija paaugstināt GABA veidošanos tomātu augļos. GABA ir neproteīnogēna aminoskābe, līdz ar to tai ir pozitīva ietekme uz cilvēku veselību, piemēram, pazemina asinsspiedienu cilvēkiem, kuriem tas ir paaugstināts. GABA ietekme ir neitrāla cilvēkiem ar normālu asinsspiedienu. Glutamāta dekarboksilāze ir galvenais enzīms GABA biosintēzē. Šim enzīmam ir kalmodulīna saistošais domēns, kas regulē enzīmātisko funkciju. Šī domēna zudums paaugstina GAD aktivitāti. Tomāta genoms satur piecus *gad* gēnus, no kuriem trīs ekspresējas augļu attīstības laikā. GABA Tomato izstrādātājs izmainīja vienu no šiem gēniem. Jaunā tomātu šķirne tika iegūta izmantojot *Agrobacterium tumefaciens* mediētu transformāciju ar T-DNS, kas saturēja Cas9 sekvenci un DNS sekvences mērķa gēnam specifiskām guide RNS. Tā rezultātā iegūtā 1 bāzu pāra ievietošana izraisīja stop kodona izveidošanos pirms pašinhibējošā kalmodulīna domēna. Jaunizveidotā tomātu līnija gatavos augļos uzkrāj četras līdz sešas reizes vairāk GABA nekā citas tomātu šķirnes. Iegūtā īpašība ir stabila vismaz trīs paaudzēs [11]. Pašlaik šie tomāti ir izplatīti Japānā individuāliem audzētājiem [13], kā arī 2020. gadā ir iesniegts pieteikums USDA [15]. Bija plānots uzsākt augļu pārdošanu tirdzniecībā Japānā no 2021. g. 15. septembra (<https://sanatech-seed.com/en/20210915-2/>).

Soja. Sojas eļļa dabiski satur salīdzinoši augstu daudzumu polinepiesātināto taukskābju, kas veicina eļļas bojāšanos oksidācijas procesā. Lai samazinātu polinepiesātināto taukskābju daudzumu ir iespējams pielietot sojas eļļas hydrogenāciju, taču tās rezultātā papildus veidojas cilvēka veselībai kaitīgas trans-taukskābes. Tādējādi viens no sojas selekcijas mērķiem ir veidot šķirnes ar palielinātu mononepiesātināto un samazinātu polinepiesātināto taukskābju sastāvu (Clemente and Cahoon, 2009). ASV kompānija Calyxt ir izveidojusi sojas šķirni FAD2KO jeb soju ar augstu oleīnskābes sastāvu, kas satur delēcijas divos gēnos FAD2-1A un FAD2-1B. Delēcijas inaktivē šo gēnus, kas kodē taukskābju desaturāzes enzīmus. FAD2 taukskābju

desaturāzes nosaka mononepiesātināto taukskābju daudzumu sojas eļļā un šo divu gēnu inaktivācija noved pie oleīnskābes (mononepiesātinātas omega-9 taukskābes) daudzuma pieauguma līdz aptuveni 80%. Sojas sēklās to nobriešanas laikā oleīnskābe tiek pārvērsta par linolskābi desaturācijas procesā, kuru veic FAD2 gēna kodētā 12 taukskābju desaturāze. Linolskābe tālākā desaturācijas procesā, kuru veic FAD3 gēna kodētā 15 taukskābju desaturāze, tiek pārvērsta par linolēnskābi [3]. FAD2KO sojas līnija tika izveidota ar *Agrobacterium rhizogenes* K599 saknīšu transformāciju izmantojot sojas šķirnes 'Bert' dīgļus. Genoma rediģēšana tika panākta ar TALEN enzīmus ekspresējošu T-DNS konstrukciju. FAD2KO soja nav autorizēta ES. 2019. g. ir uzsākta FAD2KO sojas eļļas izplatīšana ASV tirgū ar preču zīmi "Calyno™ High Oleic Soybean Oil". ASV USDA APHIS ir atzinis, ka FAD2KO soja nav pakļauta regulācijas prasībām, ņemot vērā, ka tā nesatur DNS no citiem organismiem, kas varētu būt augu vai dzīvnieku kaitēkļi. Tomēr šī sojas audzēšana, pārstrāde un tirdzniecība notiek nodalīti no parastās sojas audzēšanas, pārstrādes un tirdzniecības procesa, kā arī tiek nodrošināta augsta izsekojamība (Identity-Preserved Supply Chain) [10]. No šīs sojas ir iegūta nākamā sojas šķirne, kas tiek izplatīta ar preču zīmi "High oleic low linolenic (HOLL)". Nesen Calyxt paziņoja, ka attīstīs jaunu sojas produktu, kas spēs aizstāt videi mazāk draudzīgo palmu eļļu (<https://www.fooddive.com/news/calyxt-partners-to-develop-soy-based-alternative-to-palm-oil/607431/>).

Kukurūza. Kompānija Pioneer Hi-Bred International, Inc. ir iesniegusi pieteikumu ES kukurūzas DP915635 autorizācijai izmantošanai pārtikā un barībā, bet ne audzēšanai. Šajā kukurūzā ir ievietota integrācijas vietu secība, kas tiek dēvēta par "nosēšanās paliktni" ("*landing pad*"), noteiktā kukurūzas genoma vietā, izmantojot mikroprojektīvu bombardēšanu un CRISPR-Cas9 mediētu mērķtiecīgu ievietošanas procesu, un pēc tam ievietojot paredzētās ekspresijas kasetes ar rekombinācijas metodi kukurūzas genoma "nosēšanās paliktnī", izmantojot *Agrobacterium* mediēto transformāciju. Kukurūza DP915635 ir ģenētiski modificēta, lai tā ekspresētu IPD079Ea proteīnu, kas iegūts no epifītiskas papardes *Ophioglossum pendulum*. Šis proteīns rada izturību pret kukurūzas sakņu kaitēkļiem. Vēl šī kukurūza ekspresē fosfinotricīna acetiltransferāzes proteīnu (PAT), kas ir iegūts no baktērijas *Streptomyces viridochromogenes* un piešķir toleranci pret gufozinātu saturošiem herbicīdiem, kā arī fosfomannozes izomerāzes proteīnu (PMI) no *Escherichia coli*, kas ir izmantots kā selekcijas marķieris izstrādes procesā. Pieteikuma iesniedzējs pauž, ka nav pieejamas ziņas par to, ka no epifītiskajām sūnām iegūtais proteīns varētu būt toksisks cilvēkiem vai lauksaimniecības dzīvniekiem, kā arī nav liecību par to, ka šāds proteīns varētu būt apdraudējums videi. Zīdītāju gremošanas traktā notiek ātra šī proteīna sašķelšana. Savukārt, PAT un PMI proteīni jau ir iepriekš izmantoti citiem ģenētiski modificētiem kultūraugiem, un tiem jau ir droša izmantošanas vēsture. Visi minētie proteīni kukurūzas audos ir zemās koncentrācijās, kas garantē patērētāju drošību (<https://open.efsa.europa.eu/study-inventory/EFSA-Q-2020-00834>).

Līdzīgā veidā ir radīta kukurūza DP23211, kuras izstrādātājs arī ir kompānija Pioneer Hi-Bred International, Inc. Arī šo kukurūzu ir paredzēts ES izmantot pārtikai un dzīvnieku barībai, bet ne audzēšanai. Tās izveidei, līdzīgi kā iepriekš minētajai, ir izmantota integrācija konkrētā genoma vietā. Tiek izmantota I-CreI endonukleāze, kas pieder pie meganukleāzēm. Vispirms kukurūzas genomā ar biolītisko bombardēšanu tika ievietots DNS fragments, jeb tā saucamais "nosēšanās paliktnis". Pēc tam ar *Agrobacterium* transformācijas palīdzību šūnā ievadīja T-DNS, kas integrējās specifiskajā integrācijas vietā, kas atrodas šajā "nosēšanās paliktnī". Šī kukurūza ekspresē DvSSJ1 divpavediena RNS un IPD072a proteīnu, kas abi nodrošina izturību pret kukurūzas sakņu kaitēkļiem, kā arī jau iepriekš minētos PAT un PMI proteīnus. Proteīns

IPD072a ir iegūts no baktērijas *Pseudomonas chlororaphis*. PAT proteīnu kodējošais mo-pat gēns ir iegūts no *Streptomyces viridochromogenes* (<https://open.efsa.europa.eu/study-inventory/EFSA-Q-2019-00807>). Divpavediena RNS drošumu jau agrāk ir izvērtējusi Eiropas Pārtikas nekaitīguma iestāde [4].

Kartupeļi. Zviedru kompānija SolEdits <https://soledits.com/> ir izveidojusi kartupeļus, kuriem ir izmainīta amilozes/amilopektīna attiecība cietē. Kartupeļu bumbuļi ir nozīmīgs cietes avots cilvēku uzturā. Ciete sastāv no glikozes vienībām, kuras gareniski saista $\alpha(1 \rightarrow 4)$ glikozīdsaites, bet sazarojumus veido $\alpha(1 \rightarrow 6)$ saites. Ciete bumbuļos tiek uzkrāta noteiktā veidā strukturētu cietes granulu formā, ko nodrošina stipri sazarotas amilopektīna molekulas un nesazarotas lineāras amilozes molekulas attiecībā apmēram 4:1. Pārtikas produktos augsts amilozes saturs un garas amilopektīna ķēdes nodrošina to, ka veidojas rezistenta ciete, kas ir saistīta ar zemu glikēmisko indeksu pēc uzņemšanas uzturā [17]. Glikēmiskais indekss tiek aprēķināts, mērot cukura pieaugumu asinīs pēc noteikta glikozes daudzuma apēšanas 3 stundu laikā salīdzinājumā ar glikozes pieaugumu asinīs pēc kāda pārtikas produkta uzņemšanas, kas satur tik pat daudz ogļhidrātu. Glikozes glikēmiskais indekss un ogļhidrātu saturs ir 100 %. Kartupeļu glikēmiskais indekss ir 62 - 85 %, bet ogļhidrātu saturs kartupeļos ir 15 - 18 %. Cietes forma (amiloze vai amilopektīns) produktā ir tā, kas nosaka dažādo glikēmisko indeksu, kā arī cietes daļiņu lielums un produkta termiskā apstrāde [16]. Vēl cits zviedru zinātnieku radīto kartupeļu pielietojums nākotnē varētu būt saistīts ar bioplastmasas ieguvī. Pētījumi par to, kā iegūt kartupeļus ar uzlabotu cietes kvalitāti notiek jau ilgu laiku. Kartupeļi, kuri sintezē tikai amilopektīnu saturošu cieti, ir iegūti ar dažādām ģenētisko modifikāciju metodēm izslēdzot ar granulām saistīto cietes sintāzes (*granule-bound starch synthase*, GBSS) aktivitāti. Tāda kartupeļu izveide, kas satur augstu amilozes cietes proporciju un/vai izmainītu amilopektīna ķēdes garumu, ir sasniegta izmainot divus cietes zarošanās enzīmus (*starch branching enzymes*, SBEs). Līdz šim zinātniekiem nebija izdevies iegūt kartupeļus ar cieti, kas satur tikai amilozi. Tiek uzskatīts, ka amilopektīna daļas esamība kartupeļu cietē ir būtiski nepieciešama augu attīstībai. Tomēr zviedru zinātnieku grupai jaunākajos pētījumos, izmantojot genomiskās rediģēšanas metodi (CRISPR-Cas9 RNP), ir izdevies inducēt mutācijas *Sbe1* un *Sbe2* gēnos visās astoņās *Sbe* alelēs. Tā rezultātā viņi ir ieguvuši pilnībā nesazarotu kartupeļu cieti [17].

Pateicības

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

Izmantotā literatūra

1. Baranski, R., Klimek-Chodacka, M., & Lukasiewicz, A. (2019). Approved genetically modified (GM) horticultural plants: A 25-year perspective. *Folia Horticulturae*, 31(1), 3-49.
2. Battaglia, R. 2021. Modulating yield components in barley. 2nd PlantEd conference, Lecce, Italy, 20-22 September 2021.
3. Clemente TE, Cahoon EB (2009) Soybean Oil: Genetic Approaches for Modification of Functionality and Total Content. *Plant Physiology* 151:1030-1040
4. Dávalos, A., Henriques, R., Latasa, M. J., Laparra, M., & Coca, M. (2019). Literature review of baseline information on non-coding RNA (ncRNA) to support the risk assessment of ncRNA-based genetically modified plants for food and feed. EFSA Supporting Publications, 16(8), 1688E.

5. EFSA. <https://open.efsa.europa.eu/study-inventory/EFSA-Q-2020-00834>
6. EFSA. <https://open.efsa.europa.eu/study-inventory/EFSA-Q-2019-00807>
7. Ieviņš, Ģ. Augu fizioloģija. Funkcijas un mijiedarbība ar vidi. Rīga: LU Akadēmiskais apgāds, 2016. 608 lpp.
8. Lister, D. L., & Jones, M. K. (2013). Is naked barley an eastern or a western crop? The combined evidence of archaeobotany and genetics. *Vegetation History and Archaeobotany*, 22(5), 439-446.
9. Nonaka, S., Arai, C., Takayama, M. et al. Efficient increase of γ -aminobutyric acid (GABA) content in tomato fruits by targeted mutagenesis. *Sci Rep* 7, 7057 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06400-y>
10. Pavely, C. 2021. Presentation by Calyxt USA on their cereal and oilseed product pipeline. Genome Editing webinar on International Regulatory Approaches and Product Development, 8th -9th September, 2021, FAS/USDA London.
11. Takayama, M., & Ezura, H. (2015). How and why does tomato accumulate a large amount of GABA in the fruit?. *Frontiers in Plant Science*, 6, 612.
12. Taketa S, Amano S, Tsujino Y, Sato T, Saisho D, Kakeda K, Nomura M, Suzuki T, Matsumoto T, Sato K, Kanamori H, Kawasaki S, Takeda K (2008) Barley grain with adhering hulls is controlled by an ERF family transcription factor gene regulating a lipid biosynthesis pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:4062-4067
13. Takeshita, T. 2021. Presentation on Sanatech Seeds' "heart healthy" tomato - richer in gamma-aminobutyric acid (GABA), known to prevent high blood pressure. Genome Editing webinar on International Regulatory Approaches and Product Development, 8th -9th September, 2021, FAS/USDA London.
14. USDA, 2020. USDA APHIS letter of inquiry https://www.aphis.usda.gov/biotechnology/downloads/reg_loi/20-113-01_air_inquiry.pdf
15. USDA, 2020a. USDA APHIS letter of inquiry https://www.aphis.usda.gov/biotechnology/downloads/reg_loi/20-140-01_air_CBI del_a2.pdf
16. Zariņš, Z., Neimane, L., Bodnieks, E. Uztura mācība. Rīga: LU Akadēmiskais apgāds, 2015. 422 lpp.
17. Zhao X et al (2021). Amylose starch with no detectable branching developed through DNA-free CRISPR-Cas mediated mutagenesis of two starch branching enzymes in potato. *Scientific Reports*, 11: 1-13.

4. pielikums. Semināra programma LU doktorantūras skolas studentiem



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

Seminārs LU Doktorantūras skolas "Augu un augsnes bioloģisko resursu izpēte ilgtspējīgai izmantošanai" studentiem

2021. gada 3. novembrī, ZOOM platformā

"ĢMO un genomiski rediģēti organismi: riska novērtējums un detekcijas metodes"

Programma

14:00 ĢMO riska vērtēšana un piemaisījumu noteikšana pārtikā, barībā un sēklās – no paraugu ieguves līdz testēšanas rezultātam – *Dr. biol. Lelde Grantiņa-leviņa, BIOR*

15:30 Uz čipu balstītās multiplex digitālās PĶR kvantifikācijas metodes novērtējums un verifikācija ĢMO testēšanas jomā – *Msc. Biol. Elizabete Miltiņa, BIOR*

16:00 Ģenētiski modificētu un genomiski rediģētu mikroorganismu izmantošana pārtikas un dzīvnieku barības piedevu ieguvē un to detekcijas metodes – *Dr. biol. Lelde Grantiņa-leviņa, BIOR*

16:40 Diskusija