

2015-11-13

Växt och miljöavdelningen

Inst. för växtbiologi
SLU
750 07 Uppsala

CRISPR-muterad backtrav

Sammanfattning

Jordbruksverket gör den tolkningen att era växter som bär på T-DNA omfattas av kravet på tillståndsplikt i bestämmelserna i 13 kap. Miljöbalken och förordning (2002:1086) om utsättning av genetiskt modifierade organismer i miljön och att de inte omfattas av undantagen från reglering. Ni måste söka tillstånd för fältförsök med dessa växter.

Era växter som inte bär på T-DNA, och är muterade på det sätt som ni beskriver, bedömer Jordbruksverket inte omfattas av kraven på tillståndsplikt med mer i samma bestämmelser. Ni behöver inte söka tillstånd för att göra fältförsök med dessa växter.

Det finns idag ingen gemensam uttolkning av definitioner och undantag i lagstiftningen på EU-nivå och Jordbruksverkets tolkning kan komma att ändras när en sådan finns.

Ärendet

Ni frågade den 17 juni 2015 om ni behöver ansöka om tillstånd för att genomföra fältförsök med backtrav som ni har muterat med hjälp av metoden CRISPR/Cas9. Ni frågade också om ni behöver söka tillstånd för att genomföra fältförsök med sådana muterade växter där en sekvens av DNA:t har tagits bort med hjälp av metoden och där egenskapen sedan har återställts genom transformation med hjälp av *Agrobacterium*, så kallad komplementering.

Ni beskriver en transformering där ni med hjälp av *Agrobacterium* för in ett T-DNA som kodar för nukleas Cas9 och en sekvens som kodar för ett (single guide) sgRNA. Detta CRISPR/Cas9-system orsakar ett platsspecifikt dubbelsträngsbrott i växtens DNA, som repareras av cellens egna byggstenar. Vid denna reparation kan vissa mutationer uppstå. Ni använder inte exempelvis en mall-oligonukleotid eller en så kallad gene targeting(GT)-kassett i T-DNA:t vid muteringen. Det gör att dubbelsträngsbrottet i växtens DNA resulterar i återligering av kromosomändarna med hjälp av cellens egna system utan att en främmande DNA-sekvens inkorporeras. Målsekvensen i växtens DNA kan därför endast muteras med hjälp av cellens reparationssystem, genom s.k. non-homologous end-joining. En eller ett par baser kan förloras eller adderas. Om två dubbelsträngsbrott induceras kan hela den mellanliggande DNA-sekvensen förloras. Ni kommer att leta efter och endast välja växter där DNA har förlorats. Dels en förlust om 1-2 baser, dels en om 3-4 baser och dels en om 30kb, producerad genom att initiera två dubbelsträngsbrott på 30 kb:s avstånd.

Bedömning

Definitioner av vad som är en genetiskt modifierad organism (GMO) finns i 13 kap. 4§ Miljöbalken samt artikel 2.2 direktiv 2001/18/EG om avsiktlig utsättning av genetiskt modifierade organismer i miljön. I 1 kap. 4 § i förordning (2002:1086) om utsättning av genetiskt modifierade organismer i miljön, samt i artikel 3.1 i direktivet, bestäms att GMO framställda genom vissa metoder undantas från tillståndsplikt och annan reglering. För att bedöma ifall en viss växt omfattas av tillståndsplikt måste man först avgöra om växten är en GMO eller inte. Om den är en GMO bedömer man sedan om den undantas från reglering.

Ni har två typer av växter. Dels sådana där mutation har gjorts och T-DNA:t är bortkorsat och dels likadana växter där sedan ett nytt T-DNA har införts för att återställa växternas egenskaper. Båda kategorierna uppfyller definitionen för GMO genom att växtens DNA har ändrats på ett sätt som inte sker naturligt genom parning eller naturlig rekombination. Detta eftersom ni har inducerat en ändring med hjälp av ett främmande nukleas och de senare växterna bär även på främmande DNA.

Era växter med återställd egenskap

De av era växter som har en ny DNA-sekvens (T-DNA:t) införd i sitt genom är framtagna med en av de metoder för genetisk modifiering som beskrivs i bilaga 1A, del 1 i direktiv 2001/18/EG. Jordbruksverket anser att de därmed omfattas av direktivets reglering. Växter med infört främmande DNA är den vanligaste kategorin av GM växter och har alltid bedömts omfattas av lagstiftningen.

Detta betyder att ni måste ha tillstånd från Jordbruksverket för att få utföra fältförsök med de växter där T-DNA finns i växten.

Era växter med enbart mutation

Den andra typen av era växter innehåller endast den mutation som CRISPR/Cas9-systemet inducerade, eftersom den införda T-DNA-sekvensen har korsats bort och ingen ny har tillförts. För att göra bedömningen av om växterna är GMO som ska regleras eller inte så har vi följt den tolkningsmetod som återfinns i Jordbruksverkets yttrande till Landsbyggsdepartementet från den 4 april 2013. Yttrandet innehåller bland annat den tolkning av begreppet hybridnukleinsyramolekyler som Gentekniknämnden föreslog 2012-09-19.

Mutagenes

Växterna undantas reglering om de är framtagna med mutagenes enligt 1 kap. 4§ i förordning (2002:1086). Det gäller dock inte om framställningen inbegriper användning av hybridnukleinsyramolekyler eller GMO.

Det saknas en definition av mutagenes i lagstiftningen. Skäl 17 i direktivet säger att organismer som har erhållits med vissa metoder för genetiska förändringar vilka på vedertaget sätt har använts i ett antal tillämpningar och vilka under en längre tid inte har visat sig medföra säkerhetsproblem inte bör omfattas av direktivet. Därför undantas bland annat mutagenes i bilaga 1B. Jordbruksverket

anser att det bör tolkas så att undantaget gäller de molekylära processer som sker vid traditionell mutagenes och inte metoden för att erhålla mutationer, såsom bestrålning. Det bör även ha varit lagstiftarens intention, eftersom annars skulle all metodutveckling som skett efter att direktivet skrevs per automatik leda till en reglerad GMO.

Enligt denna tolkning så är införande av främmande DNA en ny molekylär process, medan förändring enbart med cellens egna byggstenar inte är det. Inget främmande DNA har förts in på mutationsstället. De förändringar som kan induceras av CRISPR/Cas9 i era växter är förändringar av växtens genom med byggstenar från den egna cellen. Vi anser att den andra typen av era växter är framställda med hjälp av mutagenes.

Vi anser inte att metoden för framtagandet av mutationen inbegriper användning av hybridnukleinsyramolekyler. Vi tolkar begreppet så att det gäller under förutsättning att tekniken överensstämmer med någon av de tekniker för genetisk modifiering som beskrivs i bilaga 1A, del 1, stycke ett i direktivet.

Tidigare användning av GMO

Däremot har ni vid en tidigare tidpunkt använt hybridnukleinsyror och GMO för framställningen av mutationerna, eftersom växterna som har använts är transformerade med T-DNA. De växter där T-DNA:t har korsats bort omfattas dock inte av regelverket enligt Jordbruksverkets tolkning. Tillfällig eller tidigare närvaro av DNA ska inte avgöra om en växt är en GMO som ska regleras eller inte. Det är den aktuella växtens genetiska material som är avgörande, inte föregående generationers. Det är dessutom omöjligt att se eller analysera om en mutation är naturlig eller om växtens tidigare generationer har modifierats genetiskt. Samma förändring i växtens DNA kan fås genom att injicera nukleas och sgRNA (samma som i det aktuella T-DNA:t). Det vore inte lika behandling att skilja på växter med samma mutation men framställt på olika sätt. Detta betyder att ni inte måste ha tillstånd från Jordbruksverket för att få utföra fältförsök med de beskrivna växterna med enbart de mutationer som CRISPR/Cas9-systemet inducerade och där ingen del av T-DNA finns kvar i växtgenomet.

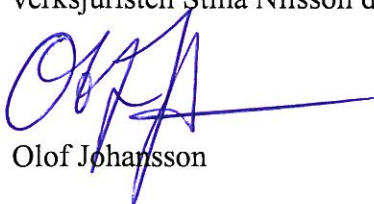
CRISPR/Cas9 innefattar flera olika deltekniker. Vi har gjort bedömningen av de växter som ni beskriver i er kommunikation och med er beskrivning som underlag. Bedömningen gäller inte nödvändigtvis för andra växter framtagna med CRISPR/Cas9 eller vid andra förhållanden.

Eftersom ingen gemensam uttolkning av definitioner och undantag i lagstiftningen finns på EU-nivå kan Jordbruksverkets tolkning komma att ändras när en sådan finns. Det betyder att krav på ansökan om fältförsök med GMO kan komma att ställas i ett senare skede.

För de växter som inte bedöms vara GMO som ska regleras finns inget annat regelverk för fältförsök. Jordbruksverket manar dock till viss försiktighet vid odling, då växternas juridiska status snabbt kan ändras. Vi skulle även uppskatta om ni informerade oss ifall ni använder dessa växter i fältförsök innan en EU-

tolkning finns beslutad. Dessutom gäller miljöbalkens allmänna hänsynsregler alla som bedriver en verksamhet.

I detta ärende har avdelningschefen Olof Johansson beslutat. Staffan Eklöf har varit föredragande. I den slutliga handläggningen har också Heléne Ström och verksjuristen Stina Nilsson deltagit.



Olof Johansson



Staffan Eklöf