

## ИНФОРМАЦИЯ

об оценке риска возможных вредных воздействий генно-инженерных организмов – трансгенного рапса – на здоровье человека и окружающую среду, а также о мерах по предупреждению такого риска

1. *Информация о биологических особенностях реципиентного организма:*

1.1. *Полное название:*

Отдел - *Magnoliophyta*

Класс - *Dicotyledones*

Порядок - *Capparales*

Семейство - *Brassicaceae*

Род - *Brassica*

Вид - *Napus*

Сорт - Прамень

Рапс (*Brassica napus* L.var.*napus*) — это однолетнее растение семейства крестоцветные (*Brassicaceae*) с геномом ААСС (2n=38). Он возник примерно в 1680 г. от естественного скрещивания капусты листовой (*B. oleracea*, 2n=18, геном СС) и сурепицы (*B. campestris*, 2n=20, геном АА) с последующим удвоением хромосом. Рапс существует в виде двух морфологически не отличимых форм: яровой (*B. napus annua* Metzger) и озимой (*B. napus biennis* Metzger). В таблице 1 приведена характеристика ярового рапса.

Таблица 1 - Морфологические признаки ярового рапса

Признак	Характеристика признака
1	2
Корень	Конусовидный, с хорошо развитой системой боковых корней, глубиной 2 м и более
Стебель	Один стебель высотой от 80 до 150 см
Соцветие	Многоцветковая, рыхлая кисть, отцветающая снизу вверх
Форма листьев	Нижние листья лировидно-перистонадрезанные, черешковые, верхние – удлинненно-ланцетовидные с расширенным основанием

1	2
Тип розетки	Приподнятая над поверхностью почвы
Семядольные листья	Симметричные
Розеточные листья	Ярко-зеленые или с восковым налетом
Цветки	Ярко-желтые среднего размера
Длительность цветения	Одного цветка – 2–3 дня, всего растения – 12–35 дней
Стручки	Гладкие или слабобугорчатые, длиной 5–10 см, с тонким небольшим носиком
Масса 1000 семян, г	2,8–4,8
Окраска и форма семян	Черная, темно-бурая, округлая или шаровидная, с одним рубчиком

### 1.2. информация, касающаяся особенностей размножения:

Рапс является факультативным самоопылителем. С помощью насекомых-опылителей у ярового рапса происходит от 3 до 5 % опыления, а у озимого – до 30 %. Основную роль в опылении играют такие насекомые-опылители как пчелы (*Apis mellifera*) и шмели (*Bombus sp.*). При создании новых форм рапса необходимо изолировать растения друг от друга. Размножение рапса в природе происходит семенами, которые могут сохранять всхожесть в течение 5-6 лет.

### 1.3. выживаемость в окружающей среде:

Размножение рапса в природе происходит семенами, их всхожесть может сохраняться в течение 5-6 лет. Семена обычно хранятся в специальных хранилищах при плюсовой температуре. На выживаемость оказывает влияние температура и степень поражения фитопатогенами.

### 1.4. рассеивание:

Рапс размножается семенами. См. раздел 1.3.

### 1.5. географическое распространение:

Рапс возделывается с 16 века в Англии. С 1836 года он известен на Западной Украине. Рапс *Brassica napus* L. var. *oleifera* DC. возделывается более чем в 50 странах мира, основные посевные площади сосредоточены в Китае, Канаде, Индии, Германии, Франции. Мировой сбор семян этой культуры в 2013 году составил более 62,5 млн. тонн (FAO), по количеству производимого растительного масла рапсу принадлежит третье место в мире после сои и хлопчатника. Яровой и озимый рапс занимают 6,3 % посевных площадей Республики Беларусь. Согласно перспективам развития продовольственного комплекса Республики Беларусь, к 2020 году производство рапса должно достичь 820 тыс. тонн [8].

*1.6. описание мест естественного произрастания, включая информацию о естественных хищниках, паразитах, конкурентах и симбионтах:*

Рапс — это однолетнее светолюбивое растение длинного дня, требовательное к влаге и плодородию почвы. Растения рапса цветут и плодоносят при 12-14 часовом дне, при укорочении светового дня вегетативная масса увеличивается, а семенная продуктивность снижается. Территории возделывания — умеренные широты Северного полушария. Температурный диапазон прорастания семян ярового рапса: минимальная температура, при которой семена ярового рапса могут прорасти — 1-3 °С, оптимальная — 14-17 °С.

Рапс растет на многих видах почв: черноземах, серых лесных, на супесях, суглинках и жирных глинах. Наиболее пригодными являются дерново-подзолистые почвы с содержанием гумуса не менее 1,5 %, имеющие рН=6,5-7,5. В Республике Беларусь условия для произрастания рапса вполне благоприятны.

Одной из важных проблем культивирования рапса, как и многих других с.-х. культур, является зарастание его сорняками. В условиях Республики Беларусь наибольшую опасность для растений рапса представляют такие заболевания как черная пятнистость, или альтернариоз, серая и белая гнили, а также фомоз.

*1.7. потенциально значимое взаимодействие с организмами, отличными от растений, включая информацию о токсичности для людей, животных или других организмов.*

Рапс является третьей по значимости масличной культурой в мире. Из масличных культур (подсолнечник, соя, лен) для условий Республики Беларусь по своим биологическим особенностям наиболее пригоден озимый и яровой рапс. Из рапса получают более трети всех масел для пищевой, косметической и лакокрасочной промышленности. Семена рапса содержат 40-45 % полувысыхающего масла, в котором до 60 % приходится на долю олеиновой кислоты.

Продукты, жмых и шрот, получаемые из семян рапса после экстракции масла, используются как богатый белком корм для животных в натуральном виде и для приготовления комбикормов. Растения рапса широко используются также в виде зеленой массы для скармливания всем с.-х. животным.

Одним из направлений в современном мире использования рапсового масла является биодизель. С 1 га посевных площадей можно получать около 1,5 т моторного биотоплива, либо около 5 т условного топлива для энергетических установок. Благодаря налаживанию производства биотоплива из рапсового масла топливная независимость Республики Беларусь может быть существенно повышена.

Более полная информация о биологических особенностях рапса как реципиентного организма представлена в Консенсусном документе OECD по биологии масличного рапса *Brassica napus L.*

## 2. Информация о биологических особенностях донора:

### 2.1. полное название:

Домен: Бактерии

Тип: Протеобактерии

Класс: Гамма-протеобактерии

Порядок: *Enterobacteriales*

Семейство: *Enterobacteriaceae*

Род: *Dickeya*

Вид: *dadantii*

Штамм: ENA49

### 2.2 происхождение организма-донора:

Вид *Dickeya dadantii* был ранее известный как *Erwinia chrysanthemi*, бактерии которого перенесены в род *Dickeya* в 2005 г. в результате изучения комплекса физиологических и молекулярных признаков.

### 2.3 биологические характеристики организма-донора:

Грамотрицательные палочки 1-3 мкм длиной и 0,5-1 мкм в диаметре. Подвижны, жгутикование перитрихиальное. Гетеротрофы, факультативные анаэробы. Вызывают как сосудистое поражение растений картофеля в поле (черную ножку), так и увядание, и гниль широкого круга с.-х. и декоративных растений в регионах с жарким климатом.

В качестве целевого использовался ген *aroA* бактерий *D. dadantii* ENA49, детерминирующий синтез фермента 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат синтазы (EPSPS). EPSPS катализирует перенос енолпирувильного остатка с фосфоенолпирувата (PEP) на 5-гидроксильный остаток шикимат-3-фосфата (S3P), при этом образуется 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат (EPSP) и неорганический фосфат (Pi) [1, 2].

## 3. Биологические особенности вектора:

3.1-3.2. природа и происхождение вектора, естественная среда обитания и соответствующие характеристики безопасности. Структура транспозонов, промоторов и других некодирующих генетических элементов, использованных для создания генетической конструкции, необходимых для ее переноса и функционирования в реципиентном организме:

В качестве исходного вектора был использован бинарный вектор pBI121 (GenBank: AF485783.1). На основе анализа геномной последовательности бактерий *D. dadantii* были разработаны олигонуклеотидные праймеры для амплификации гена *aroA*. В праймеры для амплификации были введены последовательности рестрикционных сайтов

*PstI* и *SacI*, необходимых для клонирования. Амплифицированный фрагмент ДНК был обработан рестриктазами *PstI* и *SacI*, после чего клонирован по тем же сайтам в векторе pAlter-1 (Promega). Наличие искомой вставки в рекомбинантной плазмиде было подтверждено рестрикционным анализом, а также функциональным тестом: клетки *E. coli* JM109 с векторной плазмидой pAlter-1 не росли на средах с концентрацией глифосата 0,5 ммоль/л и выше, тогда как эти же клетки, содержащие плазмиду с геном *aroA*, клонированным из *D. dadantii*, формировали изолированные колонии на среде, содержащей 1 ммоль/л глифосата в условиях индукции 0,5 ммоль/л ИПТГ.

С целью увеличения устойчивости EPSPS к глифосату был проведен сайт-направленный мутагенез для введения одиночной замены пролина на серин в 101 положении. Мутагенез производился по рекомендованной производителем методике (Altered Sites II, Promega) с использованием мутагенного олигонуклеотида. После мутагенеза полученная плазида pZH479 была введена с помощью электротрансформации в клетки штамма *E. coli* JM109. Отбор рекомбинантных клонов производился на минимальной глюкозо-солевой среде, содержащей глифосат в концентрации 2,5 ммоль/л и 0,5 ммоль/л ИПТГ в качестве индуктора. Полное секвенирование гена *aroA* показало присутствие искомой нуклеотидной замены, соответствующей аминокислотной замене P101S.

Фрагмент гена EPSPS *N. tabacum*, кодирующий хлоропластный сигнальный пептид, был амплифицирован, затем клонирован в векторе pK18 с использованием рестрицирующих эндонуклеаз *XbaI* и *SacI*. После верификации клонированного фрагмента секвенированием он был перенесен в плазмиду pZH479 с использованием рестриктаз *HindIII* и *NcoI*, откуда кассета ntСТР-*aroA* была клонирована в агробактериальный бинарный вектор с помощью рестриктаз *XbaI* и *SacI*.

Таким образом, сконструированный агробактериальный вектор pZH485 содержит ген *nptII*, обуславливающий устойчивость к антибиотику канамицину и находящийся под промотором нопалинсинтазы Pnos, имеет экспрессионную кассету 35S-СТР-*aroA*, состоящую из: конститутивного промотора вируса мозаики цветной капусты (35S), фрагмента, кодирующего сигнал транспорта продукта целевого гена в хлоропласт (СТР), и целевого гена *aroA*, детерминирующего синтез мутантного фермента 5-енолпирувилшिकимат-3-фосфатсинтазы, устойчивого к ингибированию глифосатом (рис. 1).

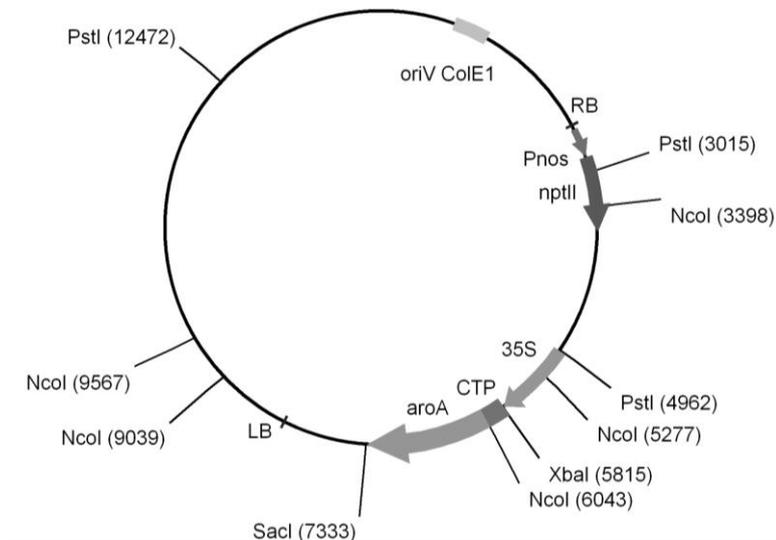


Рисунок 1 – Генетическая карта бинарного вектора с геном *aroA* для агробактериальной трансформации растений

3.3. частота мобилизации (способность приобретения мобильности) встроеного вектора или переноса в другие организмы;

Вектор не встраивается в хромосомную ДНК. Инсерция тДНК является стабильной.

3.4. факторы, которые могут влиять на способность вектора адаптироваться в других организмах-хозяевах.

Векторная ДНК активна только в клетках *Agrobacterium tumefaciens*.

4. Информация, относящаяся к характеру генно-инженерной модификации:

4.1. Методы, использованные при создании, переносе трансгенной конструкции и отборе трансгенных организмов:

Сконструированный вектор был введен при помощи электропорации в штамм *Agrobacterium tumefaciens* GV3101. Для проведения процедуры получали электрокомпетентные клетки. Ночную культуру бактерий разводили в соотношении 1:25 свежим LB-бульоном и культивировали в условиях аэрации (180 об/мин) при 28 °С (до достижения культурой оптической плотности  $OP_{600} = 0,4-0,6$ ). Культуру клеток переносили в центрифужные пробирки и охлаждали на ледяной бане в течение 15 мин. Клетки осаждали центрифугированием (3 мин, 6000 об/мин, 0- 4 °С). Осадок бактерий ресуспендировали в половине исходного объема дистиллированной воды, охлажденной до 0-4 °С, клетки осаждали центрифугированием (3 мин, 6000 об/мин, 0-4 °С). Процедуру отмывания клеток повторяли дважды, в каждом последующем случае вдвое уменьшая объем воды. Клетки ресуспендировали в примерно равном объеме осадка количестве

охлажденной воды (0-4 °С) и немедленно приступали к электропорации на приборе Multipurpose Electroporation System (Hibraid Cellject Pro, Великобритания). При работе использовали электропорационные кюветы с расстоянием между электродами 1 или 2 мм. К суспензии компетентных клеток в объеме 20 мкл (при использовании 1 мм кюветы) или 40 мкл (при использовании 2 мм кюветы) добавляли раствор ДНК в дистиллированной воде, перемешивали. Смесь вносили в предварительно охлажденную (0-4 °С) кювету, которую помещали в электропоратор и подавали импульс тока с соответствующим кювете напряжением – 2500 В для 2 мм кюветы и 1700 В для 1 мм кюветы (параметры конденсатора – 25 мкФ, шунтирующий резистор 200 Ом). После подачи импульса кювету извлекали и добавляли к клеткам 1 мл LB-бульона, содержащего 0,2 % глюкозу. Клетки инкубировали в течение часа при соответствующей температуре, после чего высевали на селективные среды.

Агробактериальную трансформацию растений рапса проводили методом *in planta*. Для получения реципиентных для трансформации растений семена протравливали в 8 % растворе фунгицида-протравителя «Кинто Дуо» в течение 5 минут, полностью погружая их в раствор. После стекания протравителя семена проращивали в растильнях с водой на фильтровальной бумаге в термостате при 26-28 °С. После появления корешков их культивировали 5-7 дней на свету до высоты проростков 35-50 мм и частично-полного раскрытия семядольных листочков. Полученные проростки являлись материалом для агробактериальной трансформации методом *in planta*. Ночную культуру агробактерий готовили согласно протоколу [3]. Трансформацию проростков проводили по модифицированному методу [4].

Проросткам наносили поранения двух типов: порез лезвием в область семядольного узла глубиной 2-3 мм, а также прокол металлической иглой диаметром 150 микрон в область семядольного узла (2-3 поперечных прокола) и в область апикальной меристемы (2-3 вертикальных прокола в район схождения петиолей) глубиной 1-2 мм в зависимости от размеров проростка. Поранение иглой проводили под увеличительным стеклом диаметром 160 мм и 4-х кратным увеличением. Затем пораненное растение опускали семядольными листочками на 1-15 минут в агробактериальную суспензию. После агробактеризации проростков их подсушивали на фильтровальной бумаге, отмывали в воде и высаживали в растильню с искусственной ионообменной почвой «Биона 112» по 45-50 штук в растильню. Агробактеризованные проростки выдерживали сутки в темноте, в термостате при 28 °С, после чего их культивировали в световой комнате в контролируемых условиях (24 °С, Д/Н=16/8 часов) для послераневой адаптации. Через 7-10 дней растения высаживали в сосуды с почвой и продолжали культивировать в теплице. В сосуд высаживали по 50-52 растения. Отбор трансгенных вариантов, а также выявление биологического эффекта трансгенов проводили путем опрыскивания 0,1 % раствором глифосатсодержащего гербицида «Шквал». Первая обработка

осуществлялась в фазе 4-5 настоящих листьев, последующие две – с интервалом 10-15 дней.

4.2. описание встроенного в геном (плазмон) реципиентного организма фрагмента ДНК (размер и источник, то есть название донорного организма(ов) и предполагаемая функция каждого составного элемента или района встроенной ДНК, включая регуляторные и другие элементы, влияющие на функционирование трансгенов), структура (сиквенс) и функциональное соответствие встроенного фрагмента ДНК, присутствие в нем известных потенциально опасных последовательностей;

Цель генетической модификации – включение в геном растений рапса и экспрессия в нем бактериального гена *aroA*, детерминирующего синтез фермента 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат синтазы, резистентного к глифосату.

Использованная конструкция pZH485 содержит кДНК гена *aroA* бактерий *Dickeya dadantii* ENA49 длиной 1300 п.н.

В результате секвенирования установлена полная нуклеотидная последовательность гена *aroA* штамма *D. dadantii* ENA49, которая отличается от таковой, имеющейся в базе данных, штамма *D. dadantii* 3937 (GenBank:NC\_014500) (рис. 2).

ATGGAGGAATCCCTGACCCTACAACCGATTTCATTGATTAACGGCACGATCAATCTGCCGGGTTCAAAAGTGTTCCAA 80  
 C  
 M E E S L T L Q P I S L I N G T I N L P G S K S V S N  
 Q  
 CCGTGCGTTGTTGCTGGCGGCATTTGGCAAGAGGCACCACTCGCTGACCAACCTGCTGGACAGCGACGATGTCCGTCATA 160  
 R A L L L A A L A R G T T R L T N L L D S D D V R H  
 TGCTCAATGCGCTGAGCGCGCTGGGTGTTGAATATCGCTGTGCGACAGCCGACAGAGTGGCAAATCGTGGGGTGGGG 240  
 M L N A L S A L G V E Y R L S D S R T E C E I V G V G  
 G  
 GCGCATTAACGGCGTCTACGCCGTTGGAACGTTTTTTAGGGAATGCCGGGACGGCGATGCCCGCTGGCCGCCGCGCT 320  
 G A L T A S T P L E L F L G N A G T A M R P L A A A L  
 GTGCCTGACTGATGGCGATATCGTGTGACCGGCGAACCGGTATGAAAGAACGTCGGATTGGTCATCTGGTGGATGCGT 400  
 C L T D G D I V L T G E P R M K E R P I G H L V D A  
 H  
 TGCGGCAGGGGGCGCGGTATCGACTATCTGGAGCAGGAAAATTATCCGCCGTTGCGCCTGCAAGGGGGCTTTACAGGT 480  
 L R Q G G A R I D Y L E Q E N Y P P L R L Q G G F T G  
 GGAGATATCAGTGTAGACGGTTCGGTATCCAGCCAGTTTCTCACTGCGCTGCTAATGACGGCGCCGCTGGCTGTGCAGGA 560  
 G D I S V D G S V S S Q F L T A L L M T A P L A V Q D  
 D  
 TACGCGCATCAGCATTAAGCGATCTGGTTTCCAAACCTTATATCGACATCACCTGCATATGATGAAACCTTCGGCA 640  
 T R I S I K G D L V S K P Y I D I T L H M M E T F G  
 TCACGGTGATCAATAACGATTACCAGACTTTCGTGGTCGCCGTAATCAGCATTATCAGTCGCTGGGCACTATCTGGTG 720  
 I T V I N N D Y Q T F V V A G N Q H Y Q S P G H Y L V  
 GAGGGCGACGCTCGTCCGCATCTTATTTTCTGGCGCAGCGGTATTCGGGGGGGACGGTACGTGTGACCGGCGTCGG 800  
 E G D A S S A S Y F L A A A A I R G G T V R V T G V G  
 G  
 CCGCCATAGCGTGCAGGGCGATATCCGTTTCGCCGACGTGCTGGAGAAAATGGGCGCGGAGATCCGCTGGGGTGACGACT 880  
 T  
 R H S V Q G D I R F A D V L E K M G A E I R W G D D  
 R  
 ATATCGAATGTGAGCGCGTAATCTCCACGCCATCGATATGGACATGAACCATATCCCCGACGCGGCAATGACCATCGCC 960  
 Y I E C Q R G N L H A I D M D M N H I P D A A M T I A  
 A  
 ACTGCCGCGCTGTTTCCGAAGGTGGGACGACGACGCTGCGTAACATCTATAACTGGCGCGTAAAGAAACCGATCGTCT 1040  
 T A A L F A E G G T T T L R N I Y N W R V K E T D R L  
 A  
 R  
 GGCAGCTATGGCGACGGAACCTGCGCAAGGTGCGCGCCGAGGTGGAAGAAGGGTATGATTACATCCGCATTACGCCGCCAA 1120  
 A A M A T E L R K V G A E V E E G Y D Y I R I T P P  
 H  
 CGCAGCTGAAAGCCGCTGAAATCGGCACTTACAATGACCACCGTATGGCGATGTGCTTCTCGCTGGTGGCGTTGTCTGAC 1200  
 T Q L K A A E I G T Y N D H R M A M C F S L V A L S D  
 ACGCCGGTCACCATTCTCGACCCTAAATGTACCGCCAAAACGTTCCCGGATTAATCCTGCAACTGGAGCGTCTGAGTCA 1280  
 T P V T I L D P K C T A K T F P D Y F L Q L E R L S Q  
 GCACGGCTGA 1300  
 H G \*

Рисунок 2 – Последовательность гена *aroA* штамма *D. dadantii* ENA49. Отличия от нуклеотидной (и соответствующей аминокислотной) последовательности гена *aroA* штамма *D. dadantii* 3937 указаны подстрочно.

Как видно из рисунка 2, большинство нуклеотидных замен являются незначащими (не меняется кодируемая аминокислота), это такие замены как: CAG на CAC (гистидин), GAG на CGA (глутамин), GAC на GAT (аспарат), GAG на CAG (глицин), GAT на GAG (гистидин), четыре замены CGC на CGT (аргинин), GCG на GCA (аланин). Также были обнаружены замены в трех кодонах, которые приводят к изменению аминокислотной последовательности: GTG на GGG (валин на глицин), TAT на CAT (тирозин на гистидин) и GAG на GCG (глутамат на глутамин).

Заявляемая трансгенная линия рапса содержит, по сравнению с исходным сортом, вставки чужеродной ДНК, представляющие собой генетический материал следующих организмов: *Dickeya dadantii* ENA49, *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, *Nicotiana tabacum* L., *Escherichia coli*, вирус мозаики цветной капусты (таблица 2). Все перечисленные организмы не являются опасными для здоровья человека (по классификации ВОЗ).

Таблица 2 – Генетические элементы, входящие в состав трансгенных вставок у линии рапса с генами *aroA* и *nptII*

№ п/п	Генетический элемент	Происхождение	Функция
1	2	3	4
1.	<i>aroA</i>	<i>Dickeya dadantii</i>	Целевой ген, кодирующий фермент 5-енол-пирувилшикимат-3-фосфат синтазу
2.	Pnos - промотор гена нопалинсинтазы	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Обеспечивает экспрессию селективного гена
3.	<i>nptII</i>	<i>Escherichia coli</i>	Селективный ген, кодирующий неомицинфосфотрансферазу II; необходим для отбора трансформантов
4.	PCaMV35S - промотор 35S РНК вируса мозаики цветной капусты	Вирус мозаики цветной капусты	Обеспечивает конститутивную экспрессию целевого гена
5.	Tnos – терминатор гена нопалинсинтазы	<i>A. tumefaciens</i>	Обеспечивает завершение транскрипции целевого гена

1	2	3	4
6.	СТР	<i>Nicotiana tabacum</i> L.	Фрагмент, кодирующий сигнал транспорта продукта целевого гена в хлоропласт
7.	RB правый край	<i>A. tumefaciens</i>	Встраивание ДНК
8.	RL левый край	<i>A. tumefaciens</i>	Встраивание ДНК

В заявляемой трансгенной линии рапса была использована система экспрессии целевого гена *aroA* с конститутивным промотором 35S из вируса мозаики цветной капусты и терминальной последовательностью гена нопалинсинтазы *A. tumefaciens*. 35S-промотор вируса мозаики цветной капусты (CaMV) является одним из наиболее часто используемых для обеспечения экспрессии встраиваемых генов в двудольных растениях. Это конститутивный промотор, ведущий к наработке существенных количеств белка экспрессируемого гена [5].

Генетическая карта вектора, использованного при получении заявляемой трансгенной линии рапса, представлена в разделе 3.

В разделе 4.2 на рисунке 2 представлена нуклеотидная последовательность целевого гена.

Таким образом, созданная и встроенная в геном растений рапса генетическая конструкция содержит элементы, выделенные из ДНК организмов, которые не относятся к категории опасных для здоровья человека. По структуре и функциям они соответствуют своему назначению. В интегрированных в геном растений фрагментах ДНК отсутствуют потенциально опасные последовательности.

4.3. наличие во встроенной ДНК каких-либо неизвестных последовательностей и информация о том, в какой степени вставка ограничена ДНК, необходимой для осуществления предполагаемой функции:

Во встроенной ДНК каких-либо неизвестных последовательностей не выявлено. Вставки ДНК содержат только последовательности, содержащиеся в переносимой генетической конструкции, описанные в разделах 3 и 4.

4.4. характеристика сайта модификации реципиентного генома (плазмона), локализация вставки (инкорпорирована в хромосому, хлоропласты, митохондрии или находится в неинтегрированном состоянии):

Методом ПЦР с использованием геномной ДНК, выделенной из трансгенных растений рапса, и двух типов пар праймеров к различным участкам трансгена получены ампликоны ожидаемых размеров, что доказывает инкорпорацию целевого гена в хромосому. Кроме того, с использованием метода ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), праймеров в целевому гену и кДНК трансгенных растений выявлен ПЦР-

продукт, что также подтверждает интеграцию целевого гена в хромосому трансгенных растений рапса.

4.5. *стабильность инкорпорации привнесенной ДНК в геном (плазмон) реципиентного организма:*

Молекулярно-генетический анализ методом ПЦР трансгенных растений рапса в ряду поколений (T<sub>1</sub>-T<sub>6</sub>) подтвердил стабильность инкорпорации привнесенной ДНК в геном растений рапса.

4.6. *количество копий трансгенов:*

С использованием метода инвертированной ПЦР установлено, что количество копий тДНК соответствует трем.

4.7. *описание методики обнаружения и идентификации встроенного фрагмента ДНК, чувствительность, надежность и специфичность этой методики:*

Обнаружение и идентификация встроенного целевого гена *aroA* проводились методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Этот метод характеризуется 100 % специфичностью (отсутствие перекрестных реакций с неспецифическими ДНК при концентрации до 1x10<sup>6</sup> геномных эквивалентов /мл) и высокой чувствительностью (не менее 1x10<sup>4</sup> геномных эквивалентов/мл). С использованием специфических праймеров выявляется наличие конкретной последовательности нуклеиновой кислоты.

Для обнаружения и идентификации встроенного фрагмента ДНК рекомендуется использовать пару праймеров, где прямой олигонуклеотид (ntCTPf) комплементарен области СТР (сигнал транспорта продукта целевого гена в хлоропласт, клонирован из *Nicotiana tabacum*), обратный (EPSPSseq) – внутреннему фрагменту гена *aroA* (*D. dadantii*). Размер ампликона – 750 п.н.

Нуклеотидная последовательность праймеров:

ntCTPf 5'-GTTTCTAGAAAAATGGCACAGATTAGCAGCATG-3',

EPSPSseq 5'-GTAAAACGACGGCCAGTCAGNGTGATGTTCGATATAMGG-3'

Объем смеси для амплификации одного образца составлял 15 мкл: 100-200 нг ДНК, 1,5 мкл 10X ПЦР буфера «Fermentas», 0,3 мкл 10 ммоль/л смеси нуклеотидов (дНТФ) «Fermentas», 2 мкмоль/л каждого из праймеров, 0,075 мкл 5 Ед/мкл Taq ДНК-полимеразы «Fermentas», H<sub>2</sub>O – до 15 мкл.

Амплификацию проводили в амплификаторе «Life Pro» Bioer с использованием следующих профилей: предварительная денатурация - 94 °С 4 мин; денатурация – 94 °С 30 с, отжиг праймеров – 60 °С 30 с, элонгация – 72 °С 1 мин, 40 циклов; ренатурация – 72 °С 7 мин; 4 °С – до изъятия проб.

5. *Информация, относящаяся к биологическим особенностям генно-инженерных организмов:*

5.1. *описание генетических признаков или фенотипических характеристик, в особенности новых признаков и характеристик, которые*

*стали проявляться или перестали проявляться у генно-инженерных организмов по сравнению с реципиентным организмом:*

В генетическом отношении заявляемая трансгенная линия отличается от реципиентного организма по наличию в геноме гена *aroA* бактерий штамма *Dickeya dadantii* ENA49, который кодирует фермент 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат синтазу. Экспрессия данного гена приводит к синтезу в растительном организме бактериального фермента, который обладает высокой каталитической активностью, участвуя в предпоследней реакции шикиматного пути синтеза ароматических аминокислот, и низкой толерантностью к гербициду глифосату, что обуславливает устойчивость трансгенных растений рапса к гербициду. Каких-либо морфологических видоизменений у трансгенной линии не наблюдается.

### *5.2. генетическая стабильность генно-инженерных организмов:*

Молекулярно-генетический анализ методом ПЦР трансгенных растений рапса в ряду поколений (T<sub>1</sub>-T<sub>6</sub>) подтвердил стабильность инкорпорации привнесенной ДНК в геном растений рапса и показал активацию трансгена на уровне транскрипции. Фенотипический анализ трансгенных растений рапса в ряду поколений показал 100%-ную резистентность трансгенных растений рапса к действию глифосат содержащего гербицида.

### *5.3. степень и уровень экспрессии трансгена(ов). Метод оценки экспрессии трансгена, его чувствительность:*

Оценка уровня экспрессии трансгена проводилась с помощью высокочувствительного метода ПЦР в реальном времени. Этот метод включает в себя одновременно детекцию и количественное определение (измерение непосредственно количества копий, либо измерение копий относительно внесенной ДНК или дополнительных калибровочных генов) специфической последовательности ДНК в образце [6]. Согласно проведенным измерениям уровень экспрессии трансгена –  $8,0 \pm 1,0$ .

### *5.4. активность и свойства протеина(ов), кодируемых трансгеном(ами);*

История использования генетических вставок, ответственных за синтез ферментов, обеспечивающих устойчивость к гербицидам (селективные факторы) свидетельствует об их доказанной биологической безопасности.

Мишенью действия гербицида глифосата является растительный фермент 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат синтаза (EPSPS). Данный фермент, кодируемый в ядре, но локализованный в хлоропластах растений, катализирует предпоследнюю реакцию шикиматного пути и необходим для синтеза ароматических аминокислот [7]. EPSPS катализирует перенос енолпирувильного остатка с фосфоенолпирувата (PEP) на 5-гидроксильный остаток шикимат-3-фосфата (S3P), при этом образуется 5-

енолпирувилшикимат-3-фосфат (EPSP) и неорганический фосфат (Pi) [1, 2]. Экспрессия бактериального мутантного трансгена *aroA* в растениях обеспечивает их резистентность к гербициду.

*5.5 части растения, в которых трансгены экспрессируются (корни, листья, пыльца и т.д.):*

Трансген *aroA*, находящийся под контролем универсального, достаточно сильного и функционально активного в растительных клетках промотора 35S CaMV, экспрессируется в листьях и стеблях трансгенных растений.

*5.6. история прежних генно-инженерных модификаций генно-инженерных организмов:*

В работе использовался сорт ярового рапса Прамень, созданный в РУП «Научно - практический центр НАН Беларуси по земледелию»; авторы: Я. Пилюк, О. Пикун, А. Залесский, Н. Лабановская, В. Позняк, В. Радовня. Ранее растения этого сорта рапса не использовались для получения устойчивых к глифосату генно-инженерных вариантов.

*5.7. характеристика генно-инженерных организмов в связи с безопасностью для здоровья человека: токсические или аллергенные эффекты генно-инженерных организмов и/или продуктов, полученных из генно-инженерных организмов:*

На основании данных об аминокислотной последовательности продукта экспрессии целевого гена заявляемой трансгенной линии рапса проведена оценка потенциальной аллергенности белка с использованием поисковых систем Allermatch и PepBank.

Как показал анализ, проведенный с использованием базы данных Allermatch, сходство с известными аллергенными белками продукта экспрессии целевого гена отсутствует

(<https://www.dropbox.com/s/ibpznqrvsmup4aj/Screenshot%202015-04-02%2012.16.45.png?dl=0>).

Safari File Edit View History Bookmarks Develop Window Help  
 allermatch.org  
 Allermatch: Allermatch Peptide Database - Blast Search Failed to open page



Home  
 Search  
 Databases  
 Publication  
 Introduction  
 Example  
 About us  
 Feedback  
 Disclaimer  
 Copyright  
 Thanks  
 References

## 80 Amino acid sliding Window

Database : UniProt and WHO-IUIS

Hit No	Db Id	Allermatch Id	Best hit identity	No of hits	% of hits	Full identity	External link	Species Name	Detailed Information
*1	*2	*3	*4	*5	*6	*7	*8	*9	*10

Analyzed 425 windows

- Number of the hit, best hit comes first
- Allermatch Database:
  - AL : Both UniProt and WHO-IUIS
  - SP : UniProt
  - WA : WHO-IUIS Allergen list
  - WI : WHO-IUIS Isoallergen list
- Allergen id
- Identity of the best hit (percent identical amino acids in the aligned 80-amino acids sliding window)
- The number of hits the input sequence had with this allergen
- The percentage of windows analysed for this input sequence hitting this allergen
- Results of a fasta alignment of the complete input sequence against this database sequence. The first number is the percentage of identity. The second number is the length of sequence over which fasta aligned
- External database accession id linking to this database, the superscript ids indicate which database this is:
  - S : UniProt
  - N : NCBI (GenPept)
  - P : PIR
- Species name of the allergen
- Links to access with specific details on this database sequence, the complete fasta alignment and the part of the input sequence aligned to the database sequence

В результате анализа, проведенного с помощью базы данных PepBank, был получен показатель «E value» 8.8, который является несущественным (<https://www.dropbox.com/s/ps5r8e2t76r6nqq/Screenshot%202015-04-02%2012.17.03.png?dl=0>). Он означает, что в использованной базе данных ожидается 8.8 последовательностей с таким уровнем совпадения со случайной неродственной последовательностью.

Safari File Edit View History Bookmarks Develop Window Help

pepbank.mgh.harvard.edu

Allermatch: Allermatch Peptide Database - Blast Search Failed to open page

**Reference for compositional score matrix adjustment:**  
 Altschul, Stephen F., John C. Wootton, E. Michael Gertz, Richa Agarwala, Aleksandr Morqulis, Alejandro A. Schäffer, and Yi-Kuo Yu (2005) "Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices", FEBS J. 272:5101-5109.

Query= aroA\_CTP\_Dda  
 (504 letters)

Database: 21,672 sequences; 201,572 total letters

Searching.....done

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
46697 KIGAKIKWGAKIKIGAKI; Pubmed:12899626;	<u>21</u>	8.8
29364 VKLTMEPVTLIEGXAXI; F420-non-reducing hydrogenase subunit A...	<u>19</u>	24
50199 PANIKWGD; Pubmed:2660788;	<u>18</u>	57
48701 CLQDGVVRV; Pubmed:1664247;	<u>18</u>	61
43760 GRHDIIVASPPFPQDEQRQ; Hydroxyproline-rich systemin precurs...	<u>18</u>	62
29067 KELLADAGDILLNGGXYYIV; Trypsin inhibitor A chain (Fragment)...	<u>18</u>	68
18220 VLGGGSALLRSIPA; Pubmed:16488478;	<u>17</u>	85

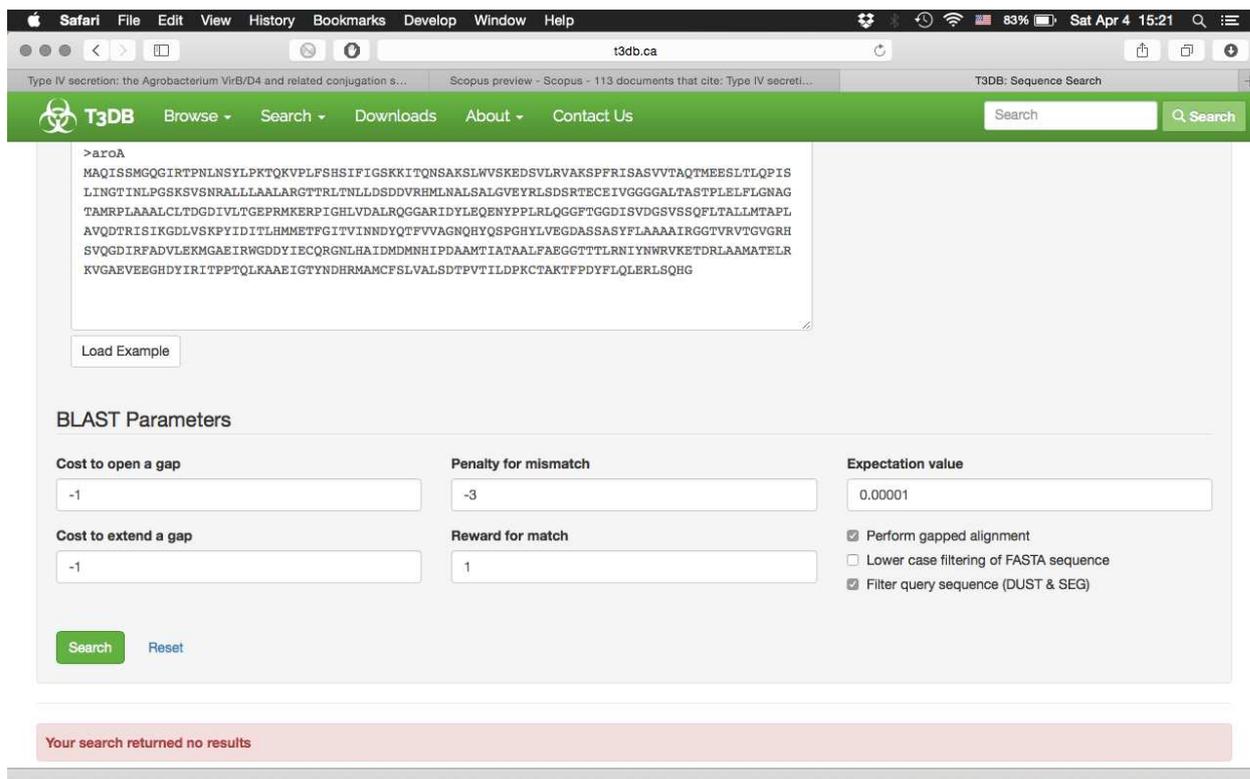
>46697 KIGAKIKWGAKIKIGAKI; Pubmed:12899626;  
 Length = 18

Score = 20.8 bits (42), Expect = 8.8, Method: Composition-based stats.  
 Identities = 6/9 (66%), Positives = 9/9 (100%)

Query: 358 KMGAEIRWG 366  
 K+GA+I+WG  
 Sbjct: 1 KIGAKIKWG 9

>29364 VKLTMEPVTLIEGXAXI; F420-non-reducing hydrogenase subunit A  
 (EC 1.12.99.-) (Methyl viologen-reducing hydrogenase  
 subunit alpha) (MVH subunit A) (Fragment)  
 (id:MVHA\_METTM) (Gene Symbol:mvhA); UniProt:P60227;

Оценка токсичности продукта экспрессии анализируемой трансгенной вставки проводилась с использованием специализированной базы данных [Toxin, Toxin Target Database \(T3DB\)](https://toxins.chara.utah.edu/). Проведенный анализ показал отсутствие гомологии аминокислотной последовательности продукта трансгенной вставки с токсинами белковой природы (<https://www.dropbox.com/s/ugrohu9llf3i7fk/Screenshot%202015-04-04%2015.21.47.png?dl=0>).



Безопасность трансгенных растений рапса для здоровья человека и животных также была подтверждена в опытах на лабораторных животных (крысах), проведенных в лаборатории модуляции функций организма в государственном научном учреждении «Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси». В результате проведенного исследования острой токсичности семян рапса трансгенной линии было сделано заключение, что они относятся к V классу «Практически нетоксично» согласно классификации степеней токсичности Организации экономического содействия и развития (ОЭСД) (отчет по договору 10X/2018 от 25.05.2018 г.).

Таким образом, в результате проведенных исследований как по первичной оценке биобезопасности трансгенной линии рапса, так и согласно данным исследования острой токсичности семян рапса *in vivo* установлено, что молекулярно-генетические характеристики продуктов встроенных генов определяют их как не представляющие опасности для здоровья человека и животных.

*5.8. предлагаемые методы обнаружения и идентификации ГИО, их точность, чувствительность, надежность:*

Для выявления и идентификации трансгенных растений наиболее надёжным, точным и чувствительным методом является применение ПЦР-анализа ДНК растений с использованием праймеров к трансгену. Метод ПЦР характеризуется 100 % специфичностью (отсутствие перекрестных реакций с неспецифическими ДНК при концентрации до  $1 \times 10^6$  геномных эквивалентов /мл) и высокой чувствительностью (не менее  $1 \times 10^4$  геномных

эквивалентов/мл). С использованием специфических праймеров выявляется наличие конкретной последовательности нуклеиновой кислоты.

Для обнаружения и идентификации встроенного фрагмента ДНК рекомендуется использовать пару праймеров, где прямой олигонуклеотид (ntCTPf) комплементарен области СТР (сигнал транспорта продукта целевого гена в хлоропласт, клонирован из *Nicotiana tabacum*), обратный (EPSPSseq) – внутреннему фрагменту гена *aroA* (*D. dadantii*). Размер ампликона – 750 п.н.

Нуклеотидная последовательность праймеров:

ntCTPf 5'-GTTTCTAGAAAAATGGCACAGATTAGCAGCATG-3',

EPSPSseq 5'-GTA AACGACGGCCAGTCAGNGTGATGTTCGATATAMGG-3'

Объем смеси для амплификации одного образца составлял 15 мкл: 100-200 нг ДНК, 1,5 мкл 10X ПЦР буфера «Fermentas», 0,3 мкл 10 ммоль/л смеси нуклеотидов (дНТФ) «Fermentas», 2 мкмоль/л каждого из праймеров, 0,075 мкл 5 Ед/мкл Taq ДНК-полимеразы «Fermentas», H<sub>2</sub>O – до 15 мкл.

Режим амплификации: предварительная денатурация - 94 °С 4 мин; денатурация – 94 °С 30 с, отжиг праймеров – 60 °С 30 с, элонгация – 72 °С 1 мин., 40 циклов; ренатурация – 72 °С 7 мин.; 4 °С – до изъятия проб.

#### *б. Информация о потенциальной принимающей среде:*

*б.1. местоположение участка, где будет осуществляться высвобождение:*

Республиканское унитарное предприятие «Шипяны-АСК»

Минская обл., Смолевичский р-н, д. Алесино, ул. Школьная, д.2

*б.2. близость к заповедникам, заказникам и другим природоохранным объектам и территориям:*

Ближайшие заказники и заповедники: Биологический заказник Пекалинский – 10 км от участка; Березинский Биосферный заповедник – 60 км от участка.

*б.3. описание участка: размер и обработанность, климатическая, геологическая и почвоведческая характеристика, флора и фауна:*

Площадь участка – 20 га. Пашня – ежегодная отвальная вспашка. Почва участка дерново-подзолистая, средний суглинок с содержанием гумуса 2,1 мг/ кг почвы, кислотность участка – рН 6,26, содержание фосфора – 176 мг, калия – 220 мг. В данном севообороте выращиваются следующие культуры: рапс, пшеница, тритикале, ячмень, кукуруза. Обитают птицы и животные, характерные для средней полосы Республики Беларусь. Уникальных и редких представителей флоры и фауны нет.

*б.4. сравнение мест естественного обитания реципиентных организмов с предполагаемым местом высвобождения генно-инженерных организмов:*

Участок земли для выращивания трансгенного рапса существенно не отличается от среды обитания культивируемого в Республике Беларусь рапса.

*6.5. методы вмешательства в природу участка (методы культивации, ирригации и пр.)*

На участке применяются следующие виды обработки почвы: отвальная вспашка на глубину 20-22 см., безотвальная обработка (чизелевание, дискование) на глубину 16-20 см, культивация на глубину 12-14 см, вносятся органические и минеральные удобрения, применяются средства защиты растений (гербициды, фунгициды, инсектициды). Ирригация не проводится.

*7. Информация о взаимодействии генно-инженерных организмов с окружающей средой:*

*7.1. биологические особенности генно-инженерных организмов (по сравнению с интактными реципиентными организмами), которые могут оказывать влияние на выживаемость, размножение и распространение в потенциальной принимающей среде:*

Трансгенная линия рапса с геном *aroA* по биологическим свойствам ничем не отличается от реципиентных растений рапса. Поэтому какого-то специфического воздействия принимающей среды на выживаемость, размножение и распространение трансгенной линии рапса не предполагается. Положительное свойство трансформантов – устойчивость к гербициду глифосату будет способствовать повышению выживаемости трансгенного рапса на стадии всходов по сравнению с исходным сортом при их обработке гербицидом.

В течение двухлетнего (2016-2017 гг.) культивирования трансгенного рапса на опытном поле Биологической опытной станции ГНУ «Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси», соответствующем требованиям биобезопасности, каких-либо морфологических видоизменений не наблюдалось.

Яровой рапс – холодостойкая культура. Семена могут прорасти при температуре 2–3 °С, а молодые растения хорошо развиваются при 10–16 °С [9]. Всходы ярового рапса выдерживают весной заморозки до минус 4–5 °С, при появлении настоящих листьев морозостойкость посевов возрастает до минус 5–6 °С. При более низких температурах наблюдается полная гибель посевов [10].

Нами была проведена оценка морозоустойчивости трансгенного рапса методом прямого промораживания [11]. Для эксперимента использовали проростки трансгенного рапса до появления настоящих листьев (300 растений). В качестве контроля использовали 100 проростков исходного нетрансгенного сорта Прамень в той же фазе роста. Растения промораживали 24 часа при температуре минус 5 °С. После оттаивания установлена полная гибель растений из опытной и контрольной групп, что указывает на

отсутствие преимущества по признаку морозоустойчивости трансгенных растений рапса.

*7.2. известные и прогнозируемые условия потенциальной принимающей среды, которые могут оказывать влияние на выживаемость, размножение, рассеивание генно-инженерных организмов:*

На выживаемость и урожайность трансгенной линии, также как и реципиентного рапса, могут оказывать влияние климатические условия в период вегетации, состав почвы, способы её обработки, вносимые удобрения. Поскольку рапс является факультативным самоопылителем (перекрестное опыление у ярой формы составляет 2-5 %, у озимой – до 30 %), следовательно, требуется естественная изоляция в виде 2,5 км зоны от ближайших посевов рапса, близкородственных видов, а также от пчеловодческих пасек.

*7.3. конкурентное преимущество генно-инженерных организмов (по сравнению с интактными реципиентными организмами):*

Конкурентное преимущество растений рапса заявляемой трансгенной линии с бактериальным геном *aroA* в отличие растений исходного сорта Прамень состоит в способности трансгенных растений проявлять полевую устойчивость к рабочим концентрациям гербицида глифосата, в то время как интактные реципиентные растения будут погибать в результате такой обработки вследствие ингибирования ключевого фермента шикиматного пути синтеза ароматических аминокислот.

*7.4. вероятность проявления у ГИО в потенциальной принимающей среде нежелательных свойств, признаков:*

Вероятность проявления нежелательных свойств и признаков у трансгенных растений рапса несущественная.

*7.5. вероятность резкого увеличения численности популяции ГИО в потенциальной принимающей среде:*

Рапс – культурное растение, которое размножается семенами, следовательно, требуется контроль и своевременная уборка урожая.

Заявляемая трансгенная линия не обладает свойствами, которые позволили бы ей, в отличие от исходного сорта, резко увеличить численность в окружающей среде.

*7.6. способность к переносу генетической информации: наличие в потенциальной принимающей среде диких или культурных родственных видов, способных к гибридизации с ГИО, вероятность переноса трансгенов от ГИО к таким видам:*

Рапс относится к семейству крестоцветных и является факультативным самоопылителем. Доля перекрестного опыления у ярового рапса составляет 2-5 %, у озимой формы – до 30 %. В перекрестном опылении участвуют

насекомые-опылители, в частности, пчелы (*Apis mellifera*) и шмели (*Bombus* sp.). Для исключения доли перекрестного опыления производится территориальная изоляция – 2,5 км до ближайших посевов рапса и близкородственных видов растений. К близкородственным видам рапса относятся сурепица *Brassica campestris*, горчица сарептская *Brassica juncea* и горчица черная *Brassica nigra*. Возникновение межвидовых и межродовых гибридов F1 возможно, однако эти гибриды – аллотриплоиды, и, поэтому, практически бесплодны при скрещивании между собой и дикорастущими крестоцветными.

При использовании шмелей в качестве насекомых-опылителей для повышения урожайности сельскохозяйственных растений-перекрестников рекомендуемое максимальное расстояние размещения ульев от поля, например, клевера, составляет 150 метров. Таким образом, размещение посадок трансгенного рапса от нетрансгенного на расстоянии, превышающем 150-200 метров, может рассматриваться достаточным изолирующим фактором для предотвращения переноса пыльцы и, соответственно, переноса чужеродного генетического материала к немодифицированным растениям рапса.

#### 7.7. идентификация и описание организмов-мишеней продуктов трансгенов:

Организмов-мишеней продукта трансгена в данном случае не существует. Мишенью или субстратом для продукта встраиваемого гена является химическое соединение. В частности, ген *aroA* кодирует фермент шикиматного пути синтеза ароматических аминокислот - 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат синтазу. Фермент катализирует перенос енолпирувильного остатка с фосфоенолпирувата на 5-гидроксильный остаток шикимат-3-фосфата, при этом образуется 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат и неорганический фосфат [1, 2].

#### 7.8. предполагаемый механизм и результат взаимодействия ГИО с организмами-мишенями:

У заявляемой трансгенной линии рапса отсутствуют организмы-мишени. Трансгенные растения, синтезирующие фермент 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат синтазу бактерий *Dickeya dadantii* в количестве, достаточном для замены ингибированного гербицидом растительного фермента, характеризуются устойчивостью к глифосату, т.е. при обработке им не погибают.

#### 7.9. идентификация и описание организмов, не являющихся мишенями продуктов трансгенов, которые могут быть подвержены влиянию ГИО:

См. раздел 7.7, 7.8.

#### 7.10. другие потенциально возможные взаимодействия ГИО с окружающей средой:

При двухлетнем (2016-2017 гг.) высвобождении трансгенной линии рапса на опытном поле Биологической опытной станции ГНУ «Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси» были проведены обследования флоры и фауны на территории и в окрестностях участка в течение вегетационного периода.

При обследовании территории опытного поля и прилегающих к нему территорий не обнаружены дикорастущие представители рода *Brassica* L., к которому относится рапс. Не изменялся и видовой состав всего семейства Крестоцветные на исследуемой территории. По-прежнему в нем насчитывалось 10 видов. Из них, как в непосредственной близости, так и в самих посевах рапса, обнаружены: *Berteroa incana* (L.) DC., *Capsella bursa-pastoris* (L.) Medik., *Rorippa palustris* (L.) Bess. и *Thlaspi arvense* L.

Культура рапса сама по себе способствует очищению полей от сорняков из-за быстрого развития фитомассы. Однако на начальных стадиях вегетации и в фазе созревания семян посева довольно активно подвергается засорению сорняками. Поэтому, в целях сокращения численности сорняков в посевах, рекомендуется проводить ранневесеннюю предпосевную вспашку или боронование, что приведет к сокращению многих сорняков, в первую очередь яровых, зимующих и озимых их форм.

После созревания и уборки культуры рапса необходимо проводить периодическую вспашку, что позволит существенно истощить почвенный банк семян сорных растений на возделываемом участке. Кроме того, в целях предупреждения попадания зачатков сорных растений из близлежащих агроценозов, рекомендуется проведение периодической послеуборочной вспашки соседних агроценозов.

Для снижения засоренности агроценозов сорняками необходимо их регулярное механическое удаление в краевой зоне полей и на участках в непосредственной близости к ограждениям, поскольку именно здесь многие сорняки успешно проходят весь вегетационный период и дают большое количество жизнеспособных семян. Эти места являются своего рода рассадниками и центрами пополнения почвенного банка семян сорных растений. Необходимо также проводить ранневесеннее боронование участков и позднюю вспашку, что приведет к сокращению численности многих сорняков, в первую очередь зимующих и озимых их форм.

При обследовании фауны на территории и в окрестностях участка в посевах рапса были отмечены следы жизнедеятельности полевок (род *Microtus*), разгрызающих его стручки. Следовательно, целесообразным является приблизительно за неделю до начала вызревания семян подавлять численность полевок вокруг плантаций ГМО культур мышеловками и раскладыванием отравленных приманок. Принимая во внимание способность многих мышевидных грызунов перемещаться на зимовку в жилые постройки, следует усилить борьбу с данными животными в зданиях, находящихся поблизости.

Также при проведении полевых испытаний трансгенного рапса было выявлено высокое видовое богатство насекомых на некоторых участках с

цветущей растительностью, прилегающих к опытному полю, например, вдоль ЛЭП, что определяет целесообразность проведения неоднократных кошений в течение года территорий, примыкающих к участку.

*7.11. информация, касающаяся предполагаемого вида использования ГИО, включая новый измененный вид по сравнению с организмом-реципиентом:*

Созданная трансгенная линия рапса отличается от реципиентного рапса наличием в геноме мутантного гена *aroA* бактерий *Dickeya dadantii*, кодирующего измененный фермент 5-енолпирувилшिकимат-3-фосфат синтазу, который обуславливает устойчивость растений к гербициду глифосату, и гена *nptII*, обеспечивающего устойчивость к антибиотику канамицину. Обработка посевов трансгенного рапса глифосат содержащими гербицидами обеспечит его конкурентное преимущество по сравнению с сорной растительностью, что приведет к повышению урожайности культуры.

Трансгенные растения рапса (семенной материал) будут использованы в технических целях в качестве биотоплива.

*8. Информация об осуществлении высвобождения генно-инженерных организмов в окружающую среду, о мониторинге, контроле, очистке территорий и действиях при непредвиденных обстоятельствах в ходе высвобождения и проведения испытаний:*

*8.1. информация о высвобождении генно-инженерных организмов*

Целью посадки трансгенной линии рапса на участке, указанном в п. 6.1, является получение семенного материала для использования его в технических целях.

Участок, на котором будет проводиться культивирование трансгенного рапса, должен быть обозначен специальной табличкой во избежание незаконного проникновения посторонних лиц. В целях сокращения численности сорняков в посевах, рекомендуется проводить ранневесеннюю предпосевную вспашку или боронование, что приведет к сокращению многих сорняков, в первую очередь яровых, зимующих и озимых их форм. После созревания, сбора семян и уборки культуры рапса необходимо проводить периодическую вспашку, что позволит существенно истощить почвенный банк семян сорных растений на возделываемом участке.

Посев и культивирование ярового трансгенного рапса на маслосемена будет проводиться согласно организационно-технологическим нормативам возделывания кормовых и технических культур [12].

### *8.2. методы мониторинга*

Культивирование трансгенного рапса будет проводиться согласно организационно-технологическим нормативам возделывания ярового рапса на маслосемена.

### *8.3. контроль высвобождения ГИО:*

Для предотвращения рассеивания пыльцы и семян будет применена территориальная изоляция в виде 2,5 км от ближайших посевов рапса и близкородственных видов.

Трансгенные растения будут высаживаться на участке, обозначенном специальной табличкой для предотвращения проникновения посторонних лиц.

### *8.4. очистка территории:*

По завершении вегетационного периода семенной материал будет тщательно собран, подвергнут сортировке, упакован и перенесен на хранение в зернохранилище. Участок будет вспахан и заборонован.

### *8.5. план действий в чрезвычайных ситуациях, связанных с непредвиденным распространением ГИО.*

В случае, если произойдет несанкционированный вынос семян трансгенной линии посторонними лицами, это не должно иметь неблагоприятных последствий, так как имеющиеся данные указывают на безопасность заявляемой трансгенной линии для здоровья человека и окружающей среды.

## Литература

- 1 Steinruken C., Amrhein N. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimate acid-3-phosphate synthase // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1980. – Vol. 94. – P.1207-1212.
- 2 Kahrizi A., Salmanian A., Afshari A., Moieni A., Mousavi A. Simultaneous substitution of Gly96 to Ala and Ala183 to Thr in 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene of *E. coli* (k12) and transformation of rapeseed (*Brassica napus* L.) in order to make tolerance to glyphosate // *Plant. Cell. Rep.* – 2007. – Vol. 26. – P. 95-104.
- 3 Bhalla P. L., Singh M. B. Agrobacterium-mediated transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea* // *Nature Protocols.* – 2008. – Vol.3. – P. 181-189.
- 4 Kojima M., Shioiri H., Nogawa M., Nozue M., Matsumoto D., Wada A., Saiki Y., Kiguchi K. In planta transformation of kenaf plants (*Hibiscus cannabinus* var. aokawa No. 3) by *Agrobacterium tumefaciens* // *J Biosci Bioeng.* – 2004. – Vol. 98. – P. 136-139.
- 5 Ермишин А.П., Подлиских В.Г, Воронкова Е.В., Аношенко Б.Ю., Зарьков В.М./ под ред. А.П.Ермишина. Биотехнология. Биобезопасность. Биоэтика. Минск «Тэхналогія» 2005. 379 с.
- 6 VanGuilder H. D., Vrana K. E., Freeman W. M. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis // *Biotechniques* – 2008. - Vol 44. P. - 619–626.
- 7 Funke T., Han H., Healy-Fried M., Fischer M., Schönbrunn E. Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops // *PNAS.* – 2006. – Vol. 103. – P. 13010-13015.
- 8 Продовольственная безопасность – составная часть национальной безопасности Республики Беларусь и ключевое условие устойчивого развития государства. Перспективы развития продовольственного комплекса страны. Материал подготовлен информационно-аналитическим центром при Администрации Президента Республики Беларусь на основе сведений Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь, Национальной академии наук Беларуси.
- 9 Растениеводство. Масличные и эфирномасличные культуры: пособие / О. С. Ключкова, О. Б. Соломко. – Горки: БГСХА, 2015. – 92 с.
- 10 Диагностика повреждения посевов рапса заморозками по визуальным признакам. Данные лаборатория крестоцветных культур, НПЦ «НАН Беларуси по земледелию». (<https://mshp.gov.by/information/materials/zem/agriculture/fa5532e93d4bbedf.html>)
- 11 Методы определения устойчивости растений: курс лекций / сост. Ю.П.Федулов – Краснодар : КубГАУ, 2015. – 39 с.
- 12 Организационно-технологические нормативы возделывания кормовых и технических культур – Сборник отраслевых регламентов. Под общей редакцией академика В.Г.Гусакова, д.с.-х. наук Ф.И.Привалова. Национальная академия наук Беларуси РУП «Научно-практический центр по земледелию Национальной академии наук Беларуси по земледелию». Минск, «Беларуская навука», 2012. – 471 с.