

к Положению о порядке проведения государственной экспертизы безопасности генно-инженерных организмов и примерных условиях договоров, заключаемых для ее проведения

ПЕРЕЧЕНЬ ИНФОРМАЦИИ ОБ ОЦЕНКЕ РИСКА ВОЗМОЖНЫХ ВРЕДНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫХ ОРГАНИЗМОВ, ОТНОСЯЩИХСЯ К ВЫСШИМ РАСТЕНИЯМ (ГОЛОСЕМЕННЫМ И ПОКРЫТОСЕМЕННЫМ), НА ЗДОРОВЬЕ ЧЕЛОВЕКА И ОКРУЖАЮЩУЮ СРЕДУ, А ТАКЖЕ О МЕРАХ ПО ПРЕДУПРЕЖДЕНИЮ ТАКОГО РИСКА

Заявитель: ГНУ «Центральный ботанический сад Национальной Академии Наук Беларуси», Республика Беларусь, 220012 г. Минск, ул. Сурганова 2в, (2С Surganova str, Minsk, 20012, Belarus) тел/факс 8(017)284-14-84, e-mail: [office@cbg.org.by](mailto:office@cbg.org.by)

Цель проведения экспертизы: получение разрешения о высвобождении в контролируемых условиях (специально оборудованном полигоне) линии трансгенного клевера, полученной в результате проведения научных исследований.

1. Информация о биологических особенностях реципиентного организма:

1.1. Полное название:

Отел: Покрытосеменные - Magnoliophyta  
Класс: Двудольные - Dicotyledones,  
Семейство: Бобовые – Leguminosae (Fabaceae)  
Род: Клевер - *Trifolium* L.  
Вид: Клевер луговой - *Trifolium pretense* L.  
Сорт: Витебчанин

Клевер луговой — двулетнее, но чаще многолетнее травянистое растение, достигает в высоту 15—55 см. В культуре возделываются растения клевера лугового ди- и тетраплоидных сортов.

Корень у клевера стержневой или стержнемочковатый, сильно разветвляющийся, проникает на глубину до 2 м. Боковые, сильно разветвленные мочковатые корни распределяются в пахотном слое почвы. На корнях клевера большое количество клубеньков, в которых обитают азотфиксирующие клубеньковые бактерии.

Стебель прямостоячий, восходящий, ветвистый, внутри — полый, округлый. Высота стебля на второй год жизни (первый укос) — 80—100 см. Число стеблей, приходящееся на одно растение, — 3—10 и 30—50 при изреженном травостое. Каждый стебель состоит из 8—10 междоузлий размером 10—20 см. Форма куста — прямостоячая, слаборазвалистая, полуразвалистая, развалистая и стелющаяся. Раннеспелые формы бывают прямостоячие и слаборазвалистые, позднеспелые — полуразвалистые и развалистые.

Листья тройчатые, цельнокрайние. Длина черешка у верхних листьев достигает 12 см, у нижних — 20 см. Форма листочков — яйцевидная, эллиптическая, окраска — зеленая, разных оттенков, часто — с серовато-белым треугольным пятном. Прилистники яйцевидные, часто опушенные.

Соцветие — головка округлой или продолговатой формы. Головки расположены на концах стеблей и боковых ветвей. В одной головке в среднем содержится 100—135 цветков. Цветок — маленький, сидячий. Венчик пятилепестковый. Завязь — верхняя,

одногнездная, с двумя зародышами. У основания завязи выделяется нектар. Окраска — от белой до темно-пунцовой, с фиолетовым оттенком.

Плод – боб, обычно односемянный, редко двусемянный. Семена мелкие, яйцевидной, слегка сплюснутой формы, пестрой желтоватой, желто-фиолетовой и фиолетовой окраски

Таблица 1 - Характеристика клевера лугового сорта Витебчанин

Плоидность	Продолжительность и тип развития	Урожайность зеленой массы, ц/га	Урожай семян, ц/га	Содержание сухого в-ва, ц/га	Содержание протеина в сухом в-ве, %
Диплоид (2n=14)	среднеспелый	650	3,0	100	14,3

#### 1.2. информация, касающаяся особенностей размножения:

Клевер луговой размножается семенным путем. Массово цветет в июне — июле, но на пастбищах при постоянном обкусывании период цветения растягивается на весь вегетационный период — с мая до сентября. Соответственно и плоды созревают в разное время. Клевер луговой – энтомофильное растение. Основные опылители шмели (*Bombus sp.*) и медоносные пчелы (*Apis mellifera*). При создании новых форм растения клевера необходимо изолировать друг от друга для предотвращения перекрестного опыления.

#### 1.3. выживаемость в окружающей среде:

Семенная продуктивность у клевера колеблется в разные годы в широких пределах. Не в последнюю очередь ее определяют погодные условия и связанная с ними активность насекомых-опылителей. Часть осыпавшихся семян прорастает на следующий год, но значительная часть их (так называемые “твердые” семена) не прорастают в течение многих лет, но сохраняют жизнеспособность и пополняют почвенный семенной запас. Они способны к прорастанию в течение более 20 лет. За счет них клевер может появляться на каком-либо участке в течение ряда лет даже при полном прекращении поступления в почву свежих семян. В первый год жизни образуется лишь прикорневая розетка, цветonoсные побеги вырастают на второй год. Со второго года в нормальных условиях клевер цветет и плодоносит ежегодно. Срок жизни одной особи клевера лугового в зависимости от условий произрастания колеблется от 2—3 до 10—15, иногда до 25 лет.

#### 1.4. рассеивание:

Клевер луговой размножается семенами. См. раздел 1.3.

#### 1.5. географическое распространение:

Распространен клевер луговой на большой территории Евразии. На протяжении ареала подвержен значительным морфологическим изменениям, отдельные сильно-уклоняющиеся формы описаны как формы, разновидности, подвиды. Давно введен в культуру как кормовое растение, поэтому естественный его ареал в какой-то степени расширился за счет хозяйственной деятельности человека. С XV столетия возделывается в

Западной Европе. Клевер луговой является важнейшей культурой травопольных севооборотов, где занимает в смеси с тимофеевкой обычно три поля из 7—10.

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

Клевер луговой широко распространен на лугах в лесной и степной зонах, а также в лесном и субальпийском поясах гор. Он обычен также на полянах, опушках, среди кустарников, в придорожных полосах. Предпочитает местообитания с умеренным водным режимом и нейтральной реакцией среды. Не выносит длительного (свыше 15 дней) затопления талыми водами и застоя воды. Отрицательно реагирует на засоление, а также ухудшение почвенной аэрации вследствие уплотнения почвы, заболачивания, развития сплошного мохового покрова и т. п. Хорошо развивается лишь в условиях достаточной освещенности, при затенении выпадает из травостоя.

Входит в состав многих луговых ассоциаций в которых вместе с клевером луговым доминируют другие бобовые (клеверы розовый, ползучий, горошек мышиный, чина луговая), мезофитные злаки (овсяница луговая, лисохвост луговой, мятлик луговой, тимофеевка луговая, полевица белая, пырей ползучий и др.), а также разнотравье (колокольчик скученный, герань луговая, тысячелистник обыкновенный, виды щавеля и др.). Для таких ассоциаций весьма характерна флюктуационная изменчивость, т. е. смена доминантов в разные годы. Сильно подвержен флюктуации и клевер луговой: годы с его ясно выраженным преобладанием в травостое (“клеверные” годы) чередуются с сезонами, когда это растение почти исчезает; бывают, естественно, и промежуточные состояния.

В культуре клевер луговой малотребователен к теплу. Семена прорастают при 2-3°C. Оптимальная температура для роста и развития – 18-20°C. В начале зимы клевер первого года жизни в фазе прикорневой розетки хорошо переносит температуру до -15°C. Морозостойкость во время зимы со второго на третий год жизни обычно ниже, чем в год посева. Наименьшая морозостойкость отмечается весной. Клевер луговой – влаголюбивое растение, однако не переносит избытка влаги в почве, а при застое воды на поле погибает. Клевер - растение длинного дня. Относительно теневынослив, поэтому его можно подсевать под покров различных культур. Клевер луговой хорошо растет на дерново-подзолистых, серых лесных, черноземных почвах. Он не переносит кислых и сильно засоленных почв.

Вредители клевера. *Клеверные долгоносики* - распространены повсюду, где культивируют клевер. Клеверные долгоносики повреждают листья, бутоны, цветки. Одна личинка уничтожает до 11 завязей. Клеверные долгоносики снижают урожай семян на 20-30% и более. *Клубеньковые долгоносики* рано весной объедают края листьев, иногда уничтожают точку роста. Личинки уничтожают клубеньки и выедают в корнях углубления. *Люцерновый клоп (Adelphocoris lineolatus)*, - вредитель люцерны, эспарцета, донника, клевера, сахарной свёклы, хлопчатника и др. растений. Люцерновый клоп высасывает соки из молодых побегов, почек, бутонов, цветков и плодов. Цветочные почки желтеют, бутоны и цветки осыпаются.

Болезни клевера. Клевер луговой поражается различными болезнями. Наиболее распространены следующие: *Антракноз* – болезнь, поражающая листья, стебли, головки, семена. На этих органах появляются вдавленные коричнево-бурые пятна. Впоследствии отдельные органы засыхают и переламываются. Высокая степень поражения растений приводит к снижению урожая сена до 50% и семян – до 60%. *Аскохитоз* – поражает прежде всего листья, затем стебли и семена. На листьях образуются крупные пятна охряно-серого цвета. Болезнь ухудшает качество сена и снижает урожай примерно на 20%. *Рак клевера* вызывает гибель растений. У погибших растений надземная часть легко отделяется от корневой шейки. *Ржавчина* поражает листья и стебли. При сильной степени поражения урожай сухого вещества снижается на 80%. *Мучнистая роса клевера*

вызывается грибом *Erysiphe communis* Grev f. *trifolii* Rabh. Болезнь появляется на клевере в середине лета в виде белого и серо-белого поверхностного налета, чаще на верхней стороне листьев и черешках, а также чашечках. Пораженные листья желтеют, засыхают и опадают. *Цветочная плесень клевера*. Болезнь вызывается грибом *Botrytis anthophila* A. Bond. Гриб заражает цветки клевера. Попадая на рыльце, споры прорастают, гифы проникают в завязь, из которой развивается больное семя. Гриб сохраняется под его кожурой. Зараженные семена мелкие и щуплые, развивают больные растения с диффузным мицелием, проникающим до плодоносящих органов. Источником инфекции являются больные семена и мицелий, перезимовывающий в корнях. Вновь отрастающие весной стебли таких растений несут инфекцию. Гриб поражает только культурный и дикорастущий красный клевер.

Сорные растения (конкуренты) в посевах клевера лугового: ромашка душистая или ромашка безъязычковая (*Matricaria discoidea* DC); выюнок полевой (*Convolvulus arvensis* L.); Овсяг обыкновенный (*Avena fatua* L.) и др.

Симбионты клевера посевного. Клевер луговой находится в симбиозе с клубеньковыми бактериями вида *Rhizobium trifolii*. Данные бактерии относятся к группе азотфиксирующих бактерий. Эти микроорганизмы поселяются в особых образованиях на корнях – клубеньках, фиксируют атмосферный азот и переводят его в легко доступные для усвоения растением формы. Они поглощают из воздуха от 100 до 400 кг азота в расчёте на 1 га, оставляя в почве 50–70 кг. Данный вид бактерий является важным звеном в процессе обогащения почвы азотом.

1.7. потенциально значимое взаимодействие с организмами, отличными от растений, в экосистемах, характерных для обычного произрастания, включая информацию о токсичности для людей, животных или других организмов.

Клевер луговой (красный) — одна из главных бобовых кормовых культур в полевых севооборотах Беларуси. Благодаря своей питательной ценности клевер луговой используется в качестве кормовой культуры несколькими способами. Прежде всего, клевер является “прирожденным” пастбищным растением: он многолетний, его корневая система глубоко проникает в почву (до 1 м), он нормально переживает уплотнение поверхностного слоя почвы и устойчив к вытаптыванию. Кроме того клевер скашивают на зеленый корм скоту, на сено, иногда на силос в сочетании с другими растительными компонентами. В 1кг хорошо приготовленного клеверного сена содержится 0,55 корм. ед и 70г сырого белка. В условиях естественного плодородия почв Беларуси клевер луговой обеспечивает сбор 2-3т сена/га. Использование клевера в агротехнических целях оправдано не только благодаря способности его корневой системы накапливать азот, но и за счет содержания в зеленой надземной части растения большого количества белка, сахаров, крахмала и микроэлементов. В пчеловодстве используется как медонос.

Так же клевер луговой (красный) очень широко известен как лекарственное растение. Лекарственным сырьем служат надземная часть, соцветия, листья, реже корни. Надземная часть и листья содержат углеводы (растворимые сахара, их изомеры и производные, крахмал), витамины (К, Е, группы В, каротин, фолиевая и фолиновая кислоты), дубильные вещества, флавоноиды (флавонолы и изофлавоны), птерокатпаны, хиноны, стероиды, сапонины, воска, липиды, стерины и их эфиры, кумарины, куместролы. В цветках содержатся ароматические, фенольные и азотсодержащие соединения, эфирное масло, фенолкарбоновые кислоты: салициловая, кумаровая; дубильные вещества, флавоноиды: изо-рамнетин, трифолин, пектолинарин, биоханин, пратол, производные кверцетина и кемпферола; антоцианы, высшие алифатические углеводороды и спирты, высшие жирные кислоты. Клевер красный рекомендован для улучшения состояния сердечно-сосудистой системы, при нарушениях обмена жиров и холестерина.

## 2. Информация о биологических особенностях организма донора:

### 2.1. полное название:

Домен: *Bacteria*  
Тип: *Cyanobacteria*  
Порядок: *Chroococcales*  
Семейство: *Merismopediaceae*  
Род: *Synechocystis*  
Вид: *Synechocystis sp.*  
Штамм: PCC6803

### 2.2. происхождение организмов доноров:

Впервые чистая культура этого организма была выделена из пресной озерной воды и депонирована в коллекции цианобактерий Института Пастера (Франция) в 1968 году.

### 2.3. биологические характеристики организма донора:

*Synechocystis sp.* PCC 6803 – одноклеточная неазотфиксирующая цианобактерия. Диаметр клеток – 1мкм. Обитает в пресной воде. *Synechocystis sp.* PCC6803 является одним из наиболее изученных видов цианобактерий, так как она может расти как автотрофно или гетеротрофно при отсутствии света. Лучше всего растет в температурном диапазоне от 32 до 38 градусов по Цельсию. Этот одноклеточный организм повсеместно используется в качестве модельного объекта для изучения стрессовых воздействий, поскольку характеризуется высокими скоростями роста в широком спектре условий, а также обладает способностью к генетической трансформации путем двойной гомологичной рекомбинации. Кроме того, известна полная нуклеотидная последовательность генома *Synechocystis*. Полное описание штамма в CyanoBase (<http://genome.microbedb.jp/cyanobase/Synechocystis>).

К сегодняшнему дню накоплено достаточно много знаний относительно ответа *Synechocystis* на холодовое воздействие. Клетки *Synechocystis* испытывают состояние холодового шока, если температура окружающей среды снижается по крайней мере на 6 градусов относительно температуры, к которой были адаптированы клетки. При этом индуцируется экспрессия ряда генов: десатураз жирных кислот (ЖК), РНК-связывающих белков, РНК-хеликаз, рибосомных белков, протеаз и др. Известно, что часть этих генов экспрессируется под контролем гистидин-киназы Hik33, являющейся сенсором низкой температуры у *Synechocystis*. Другая часть генов регулируется изменением степени сверхспирализации молекул ДНК *Synechocystis*. Упомянутые регуляторные механизмы играют основную роль в формировании ответа на холодовой стресс. Снижение температуры окружающей среды в первую очередь сказывается на клеточных мембранах, поскольку жидкокристаллическое состояние липидов при этом сменяется кристаллическим. В этом случае основной стратегией адаптации к действию пониженных температур представляется повышение степени ненасыщенности остатков ЖК в составе мембран. Известно, что инактивация генов десатураз ЖК *desA* и *desD*, отвечающих за синтез полиненасыщенных ЖК в липидах мембран, приводила к снижению текучести мембран у двойного мутанта *desA<sup>-</sup>/desD<sup>-</sup>* и соответственно к гибели при пониженных температурах. В наших исследованиях использовали модификацию смыслового гена *desA*, кодирующего Δ12-десатуразу.

### 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 сегментов, использованных для создания генетической конструкции, необходимых для ее переноса и функционирования в реципиентном организме

Для получения трансгенных растений клевера лугового был использован вектор pBISN1-IN-desA-licBM3 с целевым геном *desA*, кодирующим  $\Delta 12$ -десатуразу из *Synechocystis* sp. PCC 6803. Десатуразы - ферменты, отвечающие за образование двойных (C=C) связей в цепях жирных кислот (ЖК) и, следовательно, за изменение физических свойств биологических мембран. Целевой ген *desA* имеет транскрипционно-трансляционное слияние с последовательностью репортерного гена *licBM3*, кодирующего  $\beta$ -1,3-1,4-эндоглюконазу (термостабильную лихеназу) из *Clostridium thermocellum*. (гибридный ген). *LicBM3* - каталитический модуль нативной лихеназы, сохраняет основные свойства (активность и термостабильность) нативного фермента, имеет меньшую молекулярную массу (25 кДа) и более высокий уровень экспрессии. В использованной генно-инженерной конструкции гибридный ген *desA-licBM3* находится под контролем сильного конститутивного промотора 35S РНК вируса мозаики цветной капусты (CaMV). В качестве селективного гена в конструкции присутствует ген *nptII*, кодирующий неомицинофосфотрансферазу, обеспечивающую устойчивость к антибиотику канамицину.

Подробная информация о получении векторной конструкции представлена в публикации R. Maali A., I.V. Goldenkova-Pavlova, V.P. Pchelkin, V.D. Tsydendambaev, D.A. Los , A.M. Nosov Acyl-lipid  $\Delta 12$ -desaturase of the cyanobacterium increases the unsaturation degree in transgenic potato (*Solanum tuberosum* L.) // BIOLOGIJA. 2007. Vol. 53. No. 2. P. 4–7 и автореферате диссертации Шимшилашвили Х.Р. Изучение экспрессии генов, вовлеченных в модификацию жирных кислот, на экспериментальных моделях (Автореф... дис. канд. биол. наук. – М.: ИОГен РАН, 2010г. - 26 с.).

Схема области Т-ДНК экспрессионного вектора pBISN1-IN-*desA-licBM3* показана на рисунке (рисунок 1). Корректность сборки экспрессионных векторов была подтверждена рестрикционным анализом. Корректность клонирования гибридного гена *desA-licBM3* была подтверждена секвенированием (Evrogen, РФ). Полученный вектор был перенесен в *Agrobacterium tumefaciens* штамм C58C1 [pGV3850], которым были трансформированы растения клевера лугового сорта Витебчанин.

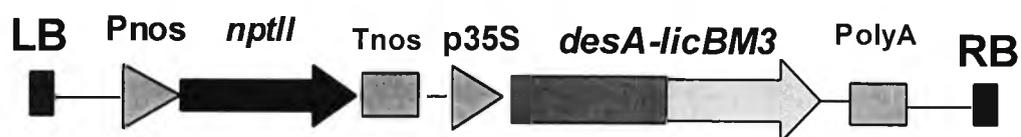


Рисунок 1 - Схема области Т-ДНК экспрессионного вектора pBISN1-IN-*desA-licBM3*

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

При агробактериальной трансформации вектор полностью не переносится в организм-реципиент. Переносимая Т-ДНК экспрессионного вектора встраивается в хромосомную ДНК растения-хозяина. Вставка Т-ДНК стабильна.



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

После рекомбинации коинтегративный вектор pBISN1-IN-desA-licBM3 становится частью неонкогенной Ti-плазмиды в клетках *Agrobacterium tumefaciens*. Такая конструкция активна только в клетках *A. tumefaciens*.

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

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

Мы работали с уже готовым штаммом *Agrobacterium tumefaciens* C58 des12licB (получен на основе штамма C58C1 [pGV3850]), несущим рекомбинантную Ti-плазмиду с T-ДНК экспрессионного вектора pBISN1-IN-desA-licBM3. Данный штамм был любезно предоставлен д.б.н., доцентом И.В.Голденковой-Павловой (группа геномики растений ИОГен РАН, РФ).

Единичную колонию агробактерий пересевали в 4 мл среды LB[177], содержащей 100 мг/л канамицина. Культивирование проводили в течение суток на качалке (220 об/мин) при 28<sup>0</sup> С. Ночную культуру переносили в колбу с 50 мл среды LB, содержащей 100 мг/л канамицина, 100мкМ ацетосирингона, и подращивали на качалке при тех же условиях в течение суток. Агробактерии осаждали центрифугированием при 5000 об/мин в течение 10 минут и ресуспендировали в 50 мл МС. Повторное осаждение и ресуспендирование агробактерий проводили при тех же условиях. Суспензию агробактерий разводили до OD<sub>550</sub> = 0,6.

В качестве эксплантов для агробактериальной трансформации были взяты семядольные листья 7-дневных проростков клевера лугового сорта Витебчанин. Инокуляцию эксплантов агробактериальным штаммом проводили в среде В5, содержащей 100 мкМ ацетосирингона и 10 г/л глюкозы, в течение 30 минут. Кокультивировали в темноте при 24<sup>0</sup>С в течение трех суток на КЛМ4, содержащей 4 мг/л БАП и 0,1 мг/л α-НУК. Культивирование проводили на аналогичной среде для индукции морфогенеза содержащей 500 мг/л цефотаксима, в люминостане при температуре 22<sup>0</sup>С, освещенности 3 клк и 16-ти часовом фотопериоде. После 3 недель культивирования экспланты переносили на среду с более низким содержанием БАП (2 мг/л).

Уже в первом пассаже у клевера наблюдали инициацию морфогенеза. Во всех вариантах наблюдалась инициация каллусогенеза у основания черешка семядольного листа. Хотя в следующем пассаже частота каллусогенеза возрастала, на многих эксплантах каллусная ткань начинала темнеть и некротировать. Если в первом пассаже частота не превышала 14,2%, то в последующем пассаже этот показатель был приблизительно около 30%. Такая высокая частота некрозов объясняется негативным влиянием агробактериальной трансформации на развитие эксплантов. Полученные регенеранты культивировали на селективных средах с добавлением антибиотика канамицина. При концентрации селективного агента 20 мг/л наблюдали побеление и гибель части регенерантов. Повышение концентрации канамицина до 50 мг/л увеличивало число погибших регенерантов. В дальнейший отбор трансгенных вариантов пошли укоренившиеся *in vitro* растения, трансгенность которых была подтверждена методами ПЦР анализа. Выявление биологического эффекта трансгенов (устойчивость к пониженным температурам и фитопатогенам) будет выявлена в дальнейших исследованиях.

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 клевера лугового и экспрессия в нем бактериального гена *desA*, кодирующим  $\Delta 12$ -десатуразу цианобактерий. Экспрессия целевого гена *desA* в трансгенных растениях клевера увеличивает их толерантность к длительному воздействию пониженных положительных температур, устойчивость к грибным патогенам и поранению. Заявляемая трансгенная линия клевера лугового содержит, по сравнению с исходным сортом, вставки чужеродной ДНК, представляющие из себя генетический материал из следующих организмов: *Agrobacterium tumefaciens* C58C1, *Escherichia coli*, вирус мозаики цветной капусты, *Synechocystis sp.* PCC 6803, *Clostridium thermocellum* (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 клевера лугового с генами

№ п/п	Генетический элемент	Происхождение	Функция
1	2	3	4
1	Pnos – промотор гена нопалинсинтетазы	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Обеспечивает экспрессию селективного гена
2	<i>nptII</i>	<i>Escherichia coli</i>	Селективный ген, кодирующий неоминифосфотрансферазу II; необходим для отбора трансформантов
3	Tnos	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Обеспечивает завершение транскрипции селективного гена
4	P35S- промотор 35S РНК CaMV	Вирус мозаики цветной капусты (Cauliflower mosaic virus – CaMV)	Обеспечивает конститутивную экспрессию целевого и репортерного гена.
5	<i>desA</i>	<i>Synechocystis sp.</i> PCC 6803	Целевой ген, кодирующий $\Delta 12$ -десатуразу цианобактерий
6	<i>licBM3</i>	<i>Clostridium thermocellum</i>	Репортерный ген, кодирующий $\beta$ -1,3-1,4-эндоглюконазу – термостабильную лихеназу.
7	poly A (ORF25) – последовательность поли (А)-хвоста мРНК	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Терминация транскрипции целевого и репортерного генов.
8	LB – левый край	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Встраивание Т-ДНК
9	RB – правый край	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Встраивание Т-ДНК

Полное секвенирование гибридного гена *desA-licBM3* для сравнения с исходными последовательностями генов из *Synechocystis sp.* PCC 6803 и *Clostridium thermocellum* будет произведено в процессе дальнейших исследований.

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.

Выявление неизвестных последовательностей в генетической вставке будет производиться в процессе дальнейших исследований.

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

Комплексный ПЦР-анализ позволил подтвердить присутствие в геноме всех первичных трансформантов клевера лугового сорта Витебчанин последовательностей перенесенных селективного (*nptII*), репортерного (*licBM3*) и целевого (*desA*) трансгенов, а также показать отсутствие в исследуемых образцах геномной ДНК агробактериальной контаминации. Методом мультиплексной ПЦР установлено, что в заявляемой трансгенной линии клевера лугового целевой и репортерный гены интегрированы в геном растения. Данный метод разработан в группе геномики растений ИОГен РАН и заключается в использовании в одной ПЦР реакции нескольких пар праймеров с целью обнаружения последовательностей нескольких генов одновременно (Berdichevets, I.N. Multiplex PCR assay for detection of recombinant genes encoding fatty acid desaturases fused with lichenase reporter protein in GM plants / I.N. Berdichevets [et al.] // Anal. Bioanal. Chem. - 2010. - Vol. 397. - P. 2289-2293).

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

Проведен первичный анализ трансгенных растений. Стабильность инкорпорации привнесенной ДНК в геном реципиентного организма будет выявлена в дальнейшей работе.

4.6. количество копий трансгенов.

Количество копий трансгенов будет выявлено в дальнейшей работе.

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

Обнаружение и идентификация селективного (*nptII*), репортерного (*licBM3*) и целевого (*desA*) генов проводились методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Этот метод 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.

Полимеразную цепную реакцию проводили в объеме 25 мкл на пробу. Реакционная смесь содержала: 50 mM KCl; 20 mM трис-HCl (pH 9,0); 0,1 % тритон-X 100; 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM каждого dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 0,02 нМ каждого праймера; 100-150 нг геномной ДНК клевера лугового и 1 ед. акт. Таq-полимеразы («Силекс», Россия). ПЦР-

анализ растений-регенерантов, отобранных на селективной среде с канамицином, проводили с использованием праймеров, специфических к нуклеотидной последовательности селективного гена *nptII*, репортерного гена *licB* термостабильной лихеназы, целевого гена  $\Delta 12$ -десатуразы *desA*, а также к последовательности гена *virE* *Agrobacterium tumefaciens* используемого в работе штамма C58C1. Последовательности праймеров, а также размеры амплифицируемых продуктов приведены в работе Berdichevets с соавторами (Berdichevets, I.N. Multiplex PCR assay for detection of recombinant genes encoding fatty acid desaturases fused with lichenase reporter protein in GM plants / I.N. Berdichevets [et al.] // Anal. Bioanal. Chem. - 2010. - Vol. 397. - P. 2289-2293). ПЦР проводили в амплификаторе Diad Thermal Cycler («Bio-Rad», США) при следующих условиях: 94°C – 4 мин; 94°C – 1 мин, 61°C – 1 мин, 72°C – 1 мин 30 сек (35 циклов), заключительная элонгация: 72°C – 5 мин. Продукты амплификации анализировали методом электрофореза в 1,5-2 % агарозном геле в трис-ацетатном буфере.

#### 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 клевера лугового отличается от реципиентного организма по наличию в геноме гена *desA*, кодирующим  $\Delta 12$ -десатуразу цианобактерий. Экспрессия целевого гена *desA* в трансгенных растениях клевера увеличивает их толерантность к длительному воздействию пониженных положительных температур, устойчивость к грибным патогенам и поранению. Каких-либо морфологических видоизменений у трансгенной линии не наблюдается.

5.2. генетическая стабильность генно-инженерных организмов.

Получены трансформанты поколения T<sub>0</sub>, которые характеризуются наличием трансгена в хромосомной ДНК. Генетическая стабильность растений заявляемой трансгенной линии будет выявлена в ходе анализа последующих поколений.

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

Степень и уровень экспрессии трансгена будет проводиться 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.

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

Использование генетических вставок, отвечающих за синтез ферментов, обеспечивающих устойчивость к длительному действию пониженных температур у растений сравнительно новый метод. Особенно касательно гена *desA*, кодирующего  $\Delta 12$ -десатуразу из *Synechocystis* sp. PCC 6803. Десатуразы - ферменты, отвечающие за образование двойных (C=C) связей в цепях жирных кислот (ЖК) и, следовательно, за изменение физических свойств биологических мембран. В частности показано, что

снижение температуры окружающей среды в первую очередь сказывается на клеточных мембранах, поскольку жидкокристаллическое состояние липидов при этом сменяется кристаллическим (Hazel *et al.*, 1995). По литературным данным известно, что гетерологичная ацил-липидная десатураза эффективно экспрессируется в трансформантах растений, стимулирует биосинтез мембранных липидов и повышает уровень ненасыщенных ЖК, что коррелирует с увеличением устойчивости трансформантов к пониженным температурам и фитопатогенам.

Репортерный ген *licBM3* кодирует каталитический модуль нативной лихеназы ( $\beta$ -1,3-1,4-глюканазу), сохраняет основные свойства (активность и термостабильность) нативного фермента, имеет меньшую молекулярную массу (25 кДа) и более высокий уровень экспрессии. Глюканызы (ламинариназы) относятся к ключевым ферментам метаболизма углеводов. Они расщепляют гликозидные связи в  $\beta$ -1,3-глюканах. Эти ферменты широко распространены в различных организмах, от археобактерий до эукариот, и участвуют во многих физиологических процессах. В частности, глюканызы бактерий принимают участие в деградации полисахаридов, которые используются бактериями в качестве источника энергии. В растениях  $\beta$ -1,3-1,4-эндоглюканызы способны индуцировать экспрессию генов PR-1 и PBZ1, которые в свою очередь обеспечивают устойчивость к грибным патогенам.

Растения клевера лугового, экспрессирующие  $\Delta$ 12-десатуразу цианобактерий получены впервые. Ранее другими исследователями получены растения картофеля (*Solanum tuberosum*), экспрессирующие десатуразу из цианобактерий (R. Maali A., I.V. Goldenkova-Pavlova, V.P. Pchelkin, V.D. Tsydendambaev, D.A. Los, A.M. Nosov Acyl-lipid  $\Delta$ 12-desaturase of the cyanobacterium increases the unsaturation degree in transgenic potato (*Solanum tuberosum* L.) // BIOLOGIJA. 2007. Vol. 53. No. 2. P. 4–7). Эффективность трансформации картофеля подтверждена рядом тестов как на активность лихеназы (кодируется репортерным геном *licBM3*) так и анализом состава и соотношения насыщенных и ненасыщенных ЖК в трансгенных и контрольных растениях. Активность и свойства протеинов, кодируемых конструкцией с гибридным геном *desA-licBM3* в трансгенных растениях клевера лугового сорта Витебчанин будут изучены в дальнейших исследованиях.

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

Трансген *desA-licBM3* экспрессируется во всех частях трансгенных растений, поскольку находится под контролем промотора 35S CaMV, который является универсальным, достаточно сильным и функционально активным в растительных клетках.

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

В работе использовался Клевер луговой (*Trifolium pratense*) сорта Витебчанин, созданный в РУП «Научно - практический центр НАН Беларуси по земледелию». Ранее растения этого сорта клевера не использовались для получения каких либо 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.

Сиквенс нуклеотидной последовательности, и последующий анализ аминокислотной последовательности продуктов экспрессии трансгенных вставок заявляемой линии клевера на наличие возможных аналогов изучаемых генов, относящихся к аллергенам или токсинам будет проведен в дальнейшем исследовании.

5.8. предлагаемые методы обнаружения и идентификации генно-инженерных организмов, их точность, чувствительность и надежность.

Для выявления и идентификации трансгенных растений наиболее надёжным, точным и чувствительным методом является применение ПЦР- анализа ДНК растений с использованием ДНК-праймеров к генам *licBM3* и *desA*.

*6. Информация о потенциальной принимающей среде:*

6.1. местоположение участка, где будет осуществляться высвобождение (область, район, населенный пункт, принадлежность земельного участка землевладельцу или землепользователю с его полным наименованием);

Высвобождение будет осуществляться на специальном полигоне («опытное поле для проведения испытаний непатогенных генно-инженерных организмов при их первом высвобождении в окружающую среду» – зарегистрировано в минском городском комитете природных ресурсов и охраны окружающей среды в 2010 году), располагающемся на территории ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси», (г.Минск, ул. Сурганова,2В, Первомайский район).

6.2. близость к заповедникам, заказникам и другим природоохранным объектам и территориям.

В районе расположения полигона и поблизости каких-либо природоохранных объектов и территорий нет.

6.3. описание участка: размер и обработанность, климатическая, геологическая и почвоведческая характеристика, флора и фауна;

Площадь опытного поля составляет 0,65 га территории, изолированной от хозяйственных и индивидуальных посевов и насаждений, с пространственной изоляцией 100 м и естественной ветрозащитной полосой. Участок изолирован: с юга - в 12 м кирпичная ограда, отделяющая территорию сада от улицы, с севера – тополевая аллея и лесопарк, с востока – в 30 метрах от участка огороженный хозяйственный комплекс (склады, гаражи для с/х машин), с запада – 100 м ветрозащитная полоса с посадкой ивы. На территории опытного поля расположены: лабораторное здание карантинного питомника, оранжерея карантинного питомника, участок открытого грунта (0,5 га), санитарная яма, фумигационная камера, помещение для прикопа древесных и кустарниковых пород, досмотровое и разборочное помещение, фитопатологическая лаборатория, фитогельмитологическая и энтомологическая лаборатория, площадка для очистки техники.

Климатический район: умеренно теплый, влажный. Типы почвы: дерново-подзолисто-болотные (дерново-подзолисто-глееватые супесчаные почвы, развивающиеся на супесях связанных, подстилаемых песками разнородными; дерново-подзолистые глееватые супесчаные почвы с близкой грунтовой водой, развивающиеся на супесях связанных, пылевато-песчаных, подстилаемых песками разнородными) и дерново-болотные (дерново-глееватые супесчаные почвы развиваются на супесях связанных, пылевато-песчаных, подстилаемых песками разнородными). На участке открытого грунта верхний слой почвы насыпной. Система севооборота не применяется. Участок разбит на делянки, на которых предусмотрено выращивание монокультур. На территории, прилегающей к участку обитает 295 видов диких животных, 34 из которых относятся к классу позвоночных животных, 261 – к классу беспозвоночных. Среди беспозвоночных по числу видов доминирует класс насекомые – 201 вид. Наиболее многочисленными являются отряды жесткокрылые, бабочки, двукрылые и полужесткокрылые (85, 49, 17 и

14 видов, соответственно). Так же на прилегающей к полю территории зафиксировано 828 видов дикорастущих растений, относящихся к 98 семействам. Среди них наиболее широко представлены семейства Rosaceae (139 видов), Asteraceae (79 видов), Lamiaceae (56 видов), Fabaceae (41 вид).

6.4. сравнение мест естественного обитания реципиентных организмов с предполагаемым местом высвобождения генно-инженерных организмов.

Участок земли для испытаний существенно не отличается от среды обитания культивируемого на территории Республики Беларусь клевера лугового.

6.5. методы вмешательства в природу участка (методы культивации, ирригации и т.п.).

Подготовка участка для посадки и технология выращивания заявляемой трансгенной линии клевера ничем не отличаются от обычной подготовки почвы - вспашка трактором, боронование, борьба с сорняками. В случае необходимости участок может поливаться, поскольку на экспериментальном поле имеется водопроводная сеть.

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/

Изучение основных биологических свойств трансгенной линии клевера лугового с геном *desA*. по сравнению с реципиентными растениями клевера будет производиться в дальнейших исследованиях. Продолжительность и тип развития, урожайность зеленой массы, содержание протеина в сухом веществе и другие показатели, определяющие общую продуктивность растений, будут изучаться в полевых условиях при высвобождении трансгенной линии в окружающую среду по отношению к контрольным растениям сорта Витебчанин.

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 клевера, могут оказывать влияние климатические условия в период вегетации, состав почвы, способы её обработки, вносимые удобрения, а так же наличие скрытых источников фитопатогенной инфекции. Поскольку клевер является перекрестноопыляемым растением, следовательно, требуется искусственная и естественная изоляция от ближайших посадок клевера, а также от пчеловодческих пасек. В нашем случае и искусственная изоляция соцветий и посадок трансгенного клевера на период полевых испытаний.

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

Конкурентное преимущество растений клевера лугового заявляемой трансгенной линии с бактериальным геном *desA* в отличие растений исходного сорта Витебчанин состоит в способности трансгенных растений проявлять повышенную устойчивость к низким температурам (при «возвратных» заморозках) и ряду грибных фитопатогенов, в то время как интактные реципиентные растения будут сильнее поражаться грибными инфекциями и погибать при возможном понижении температуры в начале вегетационного сезона.

7.4. вероятность проявления у генно-инженерных организмов в потенциальной принимающей среде нежелательных свойств, признаков;

Вероятность проявления нежелательных свойств и признаков у трансформантов клевера несущественная.

7.5. вероятность резкого увеличения численности популяции генно-инженерных организмов в потенциальной принимающей среде;

Клевер - 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 генно-инженерными организмами, вероятность переноса трансгенов от генно-инженерных организмов к таким организмам;

Клевер относится к семейству бобовых и является преимущественно перекрестноопыляемым растением. В перекрестном опылении участвуют насекомые-опылители. В случае клевера, это исключительно пчелы (*Apis mellifera*) и шмели (*Bombus sp.*). Другие виды насекомых-опылителей не способны к опылению клевера. Для исключения перекрестного опыления будет производиться удаление соцветий до момента роспуска, при получении семенного материала искусственная изоляция соцветий и всего растения, а также территориальная изоляция от ближайших пасек. 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 клевера 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 клевера.

7.7. -7.8 идентификация и описание организмов-мишеней продуктов трансгенов; предполагаемый механизм и результат взаимодействия генно-инженерных организмов с организмами-мишенями;

Организмов-мишеней продукта трансгена в данном случае не существует. Ген *desA* кодирует фермент – десатуразу, которая является одним из компонентов системы синтеза мембранных липидов в клетках. Гетерологичная ацил-липидная десатураза эффективно экспрессируется в трансформантах растений, стимулирует биосинтез мембранных липидов и повышает уровень ненасыщенных ЖК, что коррелирует с увеличением устойчивости трансформантов к пониженным температурам и фитопатогенам (Шимшилашвили Х.Р. Изучение экспрессии генов, вовлеченных в модификацию жирных кислот, на экспериментальных моделях // Автореф... дис. канд. биол. наук. – М.: ИОГен РАН, 2010г. - 26 с.). Таким образом работа генного продукта осуществляется в клетках того же трансгенного растения.

7.9. идентификация и описание организмов, не являющихся мишенями продуктов трансгенов, которые могут быть подвержены влиянию генно-инженерных организмов;

См. раздел 7.7, 7.8.

7.10. другие потенциально возможные взаимодействия генно-инженерных организмов с окружающей средой;

Каких-либо других специфических потенциально возможных взаимодействий трансгенных растений с окружающей средой не предполагается.

7.11. информация, касающаяся предполагаемого вида использования генно-инженерных организмов, включая новый или измененный вид использования по сравнению с организмом реципиентом.

Созданная трансгенная линия клевера отличается от реципиентного клевера лугового наличием в геноме гибридного гена *desA-licBM3*, кодирующего измененный фермент  $\Delta 12$ -десатуразу цианобактерий, который обуславливает устойчивость растений к длительному воздействию низких температур и фитопатогенам и  $\beta$ -1,3-1,4-глюканазу, которая способна индуцировать экспрессию генов PR-1 и PBZ1, которые в свою очередь обеспечивают устойчивость к грибным патогенам, а так же ген *nptII*, обеспечивающего устойчивость к антибиотику канамицину. По всем другим биологическим свойствам и признакам трансформанты не отличаются от реципиентного клевера, следовательно, трансгенный клевер может использоваться также как обычный клевер для кормовых целей.

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

8.1. информация о высвобождении генно-инженерных организмов: описание процесса предполагаемого высвобождения генно-инженерных организмов, цели высвобождения; предполагаемые сроки начала и окончания высвобождения и календарный план экспериментов, связанных с высвобождением, включая количество и продолжительность экспериментов; предполагаемое количество высвобождаемых генно-инженерных организмов, количество генно-инженерных организмов на единицу площади участка; расстояние от участка до посадок растений диких и культурных родственных видов, способных к гибридизации с генно-инженерными организмами; информация о наличии и результатах предыдущих высвобождений генно-инженерных организмов в окружающую среду.

Целью посадки созданной трансгенной линии клевера лугового на специальном полигоне является получение растений, стабильно наследующих признаки устойчивости к пониженным температурам, а так же к ряду грибных фитопатогенов.

Для посадки растений участок будет вспахан и заборонован. Посадка будет производиться вручную рядами. Расстояние между рядами - 0,7 м, между растениями в ряду - 0,35 м. Будет высажена одна трансгенная линия. Растения для посадки будут размножены и укоренены *in vitro* с последующей адаптацией в изолированных боксах в условиях лаборатории. Высадка укорененных трансгенных линий в открытый грунт будет осуществляться в оптимальные для посадки клевера сроки, т.е. в начале мая 2018 года. Так как вблизи участка произрастают дикие родственные виды, способные к гибридизации с трансгенным клевером, исследуемые трансгены будут изолированы от опылителей с помощью специальной сетки с мелкой ячейкой, препятствующей проникновению шмелей и пчел. Высвобождение генно-инженерных организмов клевера лугового в окружающую среду предполагается провести впервые в Республике Беларусь.

8.2. методы мониторинга: методы наблюдения за генно-инженерными организмами, а также мониторинга их возможных взаимодействий с потенциально уязвимыми элементами окружающей среды; специфичность, то есть возможность идентифицировать

генно-инженерные организмы, отличить их от реципиентных организмов, а также чувствительность и надежность методов мониторинга генно-инженерных организмов; методы выявления переноса трансгенов другим организмам; продолжительность и частота мониторинга.

В течение и по окончании вегетационного периода будут проводиться анализы по выявлению трансгена в растениях, стабильности инкорпорации трансгена в геноме растений, определение устойчивости к пониженным температурам и грибным фитопатогенам (с помощью специальных тестов). Передача трансгенов другим организмам может выявляться только в результате анализа геномной ДНК методом ПЦР. Такой анализ будет проведен на контрольных растениях, выращиваемых на полигоне.

8.3. контроль высвобождения генно-инженерных организмов: меры, которые предполагается использовать для предотвращения рассеивания пыльцы, семян генно-инженерных организмов; методы и процедуры, направленные на охрану территории высвобождения от вторжения посторонних лиц; методы и процедуры, предохраняющие территорию от нежелательного посещения другими организмами.

Для предотвращения рассеивания пыльцы и семян будет применена искусственная изоляция соцветий, а также использованы заграждения из специальной сетки против проникновения насекомых. Кроме того, в конце вегетационного периода вся надземная часть растений, после сбора семян, будет срезаться и уничтожаться путём захоронения в могильнике (специально вырытой яме), находящемся на территории полигона. Трансгенные растения будут высаживаться на специальном полигоне, огороженном оградой – металлической сеткой. Ворота закрываются замком, а ключ будет находиться на посту охраны ЦБС НАН Беларуси. Территория полигона находится под круглосуточным контролем камер слежения и звуковой сигнализации. Таким образом, территория полигона будет охраняться от проникновения животных и посторонних лиц.

8.4. очистка территории: процедура обработки участка по завершении высвобождения; методы удаления генно-инженерных организмов по завершении экспериментов.

По завершении вегетационного периода вся надземная часть и корневая система растений будут захоранивать в специально оборудованной яме. Семенной материал будет тщательно собран, подвергнут сортировке, упакован и перенесен на хранение в лабораторные условия для использования в дальнейших исследованиях. Участок будет вспахан и заборонован.

8.5. план действий в чрезвычайных ситуациях, связанных с непредвиденным распространением генно-инженерных организмов: методы и процедуры контроля генно-инженерных организмов в случае непредвиденного распространения; методы утилизации или оздоровления растений, животных и т.д., которые оказались подвергнуты воздействию генно-инженерных организмов в ходе или после их непредвиденного распространения; планы защиты здоровья человека и охраны окружающей среды в случае обнаружения нежелательных воздействий генно-инженерных организмов.

Использование специального закрытого полигона для выращивания и испытания трансгенных растений с соответствующей системой безопасности, а также биологические особенности выращивания и размножения исследуемой трансгенной линии клевера не предполагают непредвиденного распространения трансформантов. В случае, если все-таки произойдет несанкционированный вынос растений 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

Директор ЦБС НАН Беларуси, чл.-корр.

«  » \_\_\_\_\_ 2016г.



В.В. Титок