

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель директора ГНУ «Институт генетики
и цитологии НАН Беларуси» по научной и
технической работе, к.б.н.



_____ Е.В. Гузенко

«24» июля 2017 г.

**Заключение государственной экспертизы биобезопасности генно-
инженерных организмов**

1. Общие положения

Эксперт - ГНУ «Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси»

Заказчик – ГНУ «Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси»

Исполнитель – Министерство природных ресурсов и охраны окружающей среды Республики Беларусь

Цель экспертизы – получение разрешения на высвобождение в контролируемых условиях (специально оборудованном опытном поле) линии трансгенного клевера, полученной в результате проведения научных исследований.

Объект экспертизы – линия трансгенного клевера с бактериальным геном *desA*.

Основание для проведения экспертизы – договор № 10 от 21 апреля 2017 г.

Экспертом, на основании представленной Заказчиком информации об оценке риска возможных вредных воздействий генно-инженерных организмов на здоровье человека и окружающую среду, а также о мерах по предупреждению такого риска, оформленную в соответствии с Приложением 2 к «Положению о порядке проведения государственной экспертизы безопасности генно-инженерных организмов и примерных условиях договоров, заключаемых для ее проведения», представленных в соответствии с Постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 8.09.2006 №1160 «Об утверждении положений о порядке проведения государственной экспертизы безопасности генно-инженерных организмов и примерных условиях договоров, заключаемых для ее проведения, и выдачи разрешений на высвобождение непатогенных генно-инженерных организмов в окружающую среду для проведения испытаний» [1], проведена экспертиза биобезопасности объекта, заявленного Заказчиком, при первом высвобождении в окружающую среду для проведения ограниченных испытаний в условиях опытного поля, соответствующего требованиям биобезопасности. Экспертиза проведена в соответствии с данными «Инструкции о порядке проведения оценки риска возможных вредных воздействий генно-инженерных организмов на здоровье человека» [2], методических рекомендаций [3, 4], данных Механизма посредничества по биобезопасности ВСН [5], данных ISAAA (Международной службы по сбору агробιοтехнологических разработок) [6].

2. Методология проведения оценки рисков трансгенной линии рапса.

Оценка рисков трансгенной линии клевера со встроенным геном *desA*, кодирующим $\Delta 12$ - десатуразу цианобактерий, репортерным геном *licBM3* и селективным геном *nptII*, проводилась на основании данных Заказчика об оценке риска возможных вредных воздействий генно-инженерных организмов на здоровье человека и окружающую среду, а также о мерах по предупреждению такого риска (далее Досье) в соответствии с Приложением 2 к «Положению о порядке проведения государственной экспертизы безопасности генно-инженерных организмов и примерных условиях договоров, заключаемых для ее проведения» [1].

Выявление потенциальных рисков, связанных с высвобождением трансгенной линии клевера проводилось в контексте рисков, вызываемых немодифицированным реципиентом (клевер луговой – *Trifolium pratense* L., сорт Витебчанин). При оценке потенциальных рисков принималась во внимание цель высвобождения – экспериментальные исследования в условиях специально оборудованного для проведения испытаний поля [7], масштаб высвобождения (ограниченные полевые испытания), принимающая среда первого высвобождения и потенциальная принимающая среда последующих высвобождений.

Методология оценки риска [3,4] включала:

Этап 1. Выявление любых новых генотипических и фенотипических характеристик, связанных с генетически модифицированным растением (ГМР), которые могут оказать неблагоприятное воздействие на биологическое разнообразие в вероятной потенциальной принимающей среде, с учетом рисков для здоровья человека.

Этап 2. Оценка степени вероятности фактического возникновения таких неблагоприятных последствий с учетом интенсивности и характера воздействия ГМР на вероятную потенциальную принимающую среду.

Этап 3. Оценка последствий в том случае, если такое неблагоприятное воздействие действительно будет иметь место.

Этапы 2 и 3 проведены одновременно.

Этап 4. Оценка совокупного риска, вызываемого ГМР, на основе оценки вероятности возникновения и последствий каждого выявленного неблагоприятного воздействия.

Этап 5. Вынесение рекомендации относительно того, являются ли риски приемлемыми или регулируемыми, включая, если это необходимо, определение стратегий для регулирования таких рисков.

Этап 1. Выдвигались гипотезы в отношении потенциальных рисков анализируемого ГМР, научно-достоверные сценарии реализации рисков, а также определялись пути дифференциации риска и вредного воздействия. С целью установления, какие новые характеристики ГМР могут стать причиной неблагоприятного воздействия при взаимодействии с вероятной потенциальной принимающей средой (установление экологического риска) и какие новые характеристики могут представлять риск для здоровья человека, была проанализирована информация, представленная в Досье, касающаяся особенностей вектора, встраиваемых последовательностей, особенностей организма-реципиента (сорт Витебчанин) и ГМР, проведен сравнительный анализ генотипических и фенотипических характеристик ГМР и организма-реципиента, особенностей потенциальных принимающих сред и информации, касающейся предполагаемого вида использования ГМР.

При выявлении потенциальных экологических рисков особое внимание было уделено следующим особенностям трансгенной линии клевера, потенциальной принимающей среды и взаимодействия трансгенной линии с потенциальной принимающей средой, которые могут привести к возникновению такого риска:

- особенности трансгенной линии по сравнению с реципиентным организмом (сорт Витебчанин), которые могут оказывать влияние на

выживаемость, размножение и распространение в потенциальной принимающей среде;

- известные и прогнозируемые условия потенциальной принимающей среды, которые могут оказывать влияние на выживаемость, размножение, рассеивание трансгенной линии;

- способность к переносу генетической информации: наличие в потенциальной принимающей среде диких или культурных родственных видов, способных к гибридизации с ГМР, вероятность переноса трансгенов от линии к таким организмам;

- идентификация и описание организмов-мишеней (организмов, на которых направлено действие) продуктов трансгенов линии;

- идентификация и описание организмов, не являющихся мишенями продуктов трансгенов, которые могут быть подвержены влиянию трансгенной линии;

- идентификация и описание потенциальных неблагоприятных эффектов, которые может оказать анализируемая трансгенная линия по сравнению с контрольным реципиентным организмом (сортом Витебчанин) на здоровье человека.

Этапы 2, 3. Оценена вероятность возникновения каждого неблагоприятного последствия и оценены последствия, в том случае если такое неблагоприятное воздействие наступит.

Вероятность возникновения неблагоприятного последствия оценивалась качественно с использованием следующих терминов: **«высоко вероятно»**, **«вероятно»**, **«маловероятно»** и **«весьма маловероятно»**.

Оценка последствий неблагоприятного воздействия была выражена качественно с использованием следующих терминов: **«существенное»**, **«среднее»**, **«незначительное»** или **«маргинальное»**.

Этап 4. Дана качественная оценка совокупного риска, вызываемого ГМР [3, 4]. Оценка совокупного риска дана с использованием следующих терминов **«высокий»**, **«средний»**, **«неопасный»**, **«минимальный»** или

«неопределенный» (вследствие отсутствия ясности относительно уровня риска или недостаточности знаний).

Этап 5. Определены рекомендации относительно того, являются ли риски приемлемыми или регулируемыми, а также даны рекомендации относительно стратегий для регулирования таких рисков.

Оценка рисков для здоровья человека проводилась по установленным в Республике Беларусь инструкциям [2].

3. Этап 1. Выявление любых новых генотипических и фенотипических характеристик, связанных с ГМР, которые могут оказать неблагоприятное воздействие на биологическое разнообразие в вероятной потенциальной принимающей среде, с учетом рисков для здоровья человека.

Информация, имеющая существенное отношение к оценке риска.

3.1. Характеристика организма – реципиента. Система опыления. Векторы переноса пыльцы. Способность к переопылению различных форм клевера. Размножение клевера. Сорный потенциал.

Клевер луговой (*Trifolium pratense* L.) - это ценное кормовое растение, способное без применения азотных удобрений давать дешёвые высокобелковые корма для животноводства (содержание протеина в сухом веществе - 15,17%). Является важнейшей культурой травопольных севооборотов, где занимает в смеси с тимофеевкой луговой три поля из 7-10. Двулетнее, но чаще многолетнее травянистое растение. 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. Число стеблей на одно растение - 3-10 и 30-50 при изреженном травостое. Каждый стебель состоит из 8-10 междоузлий размером 10-20 см. Соцветие - головка, расположенная на концах стеблей и боковых ветвей. В одной головке в среднем содержится 100-135 цветков. Плод - боб, обычно односемянный, редко двусемянный. Семена мелкие.

Клевер – перекрестный опылитель. Барьеров для скрещивания между растущими рядом различными формами нет. Клевер луговой опыляется насекомыми. Основные опылители - шмели и медоносные пчелы.

Размножается семенным путем. Массово цветет в июне - июле, но на пастбищах, при постоянном обкусывании животными, период цветения растягивается на весь вегетационный период – с мая по сентябрь, что определяет созревание плодов в разное время.

Семенная продуктивность колеблется в разные годы в широких пределах и зависит от погодных условий и активности насекомых-опылителей. Сорт Витебчанин – среднеспелый. Обеспечивает за вегетационный период два-три укоса. Сбор сухого вещества достигает 11 т/га. Сбор семян 120 – 300 кг/га.

Часть осыпавшихся семян прорастает на следующий год, но значительная часть семян не прорастает в течение многих лет, сохраняет жизнеспособность и пополняет банк семян в почве. Семена способны к прорастанию в течение более 20 лет. Срок жизни одной особи клевера лугового в зависимости от условий произрастания колеблется от 2-3 до 10-15, иногда до 25 лет. Таким образом, клевер луговой является растением с высоким сорным потенциалом.

3.2. Способность гибридизации с дикими родственными видами.

Клевер луговой произрастает на всей территории Европы, растет на среднеувлажнённых лугах, лесных полянах, вдоль полей и дорог как дикорастущее растение, на лугах выращивается как культурное растение. В связи с тем, что клевер произрастает повсеместно как дикорастущее растение, является перекрестноопыляемым растением и обладает высоким сорным потенциалом, он относится к растениям повышенного уровня риска миграции трансгена в природные популяции [8].

3.3. Характер генетической модификации. Метод, использованный для переноса генетической конструкции.

Цель генетической модификации – включение в геном реципиентного организма (клевер, сорт Витебчанин) и активность в нем гена *desA*, кодирующего Δ 12- десатуразу цианобактерий.

Полученная разработчиками трансгенная линия клевера содержит вставку чужеродной ДНК, которая включает в себя следующий генетический материал:

1. Целевой ген *desA*, выделенный из генома цианобактерий (*Synechocystis* sp. PCC 6803), обеспечивающий устойчивость к длительному действию пониженных температур и фитопатогенам.

2. Репортерный ген *licBM3*, кодирующий β -1,3-1,4-глюканазу – ключевой фермент метаболизма углеводов, полученный от бактерии *Clostridium thermocellum*. Последовательность гена *licBM3* слита с последовательностью целевого гена. Репортерная система, основанная на использовании гена *licB*, позволяет осуществлять быстрый отбор трансгенных организмов, определять уровни экспрессии гибридных генов и молекулярные массы белковых продуктов гибридных генов.

3. Селективный ген *nptII* *Escherichia coli*, кодирующий неомицинофосфотрансферазу II, встроенный для отбора трансгенных форм на селективных средах.

3. PCaMV35S - 35S промотор вируса мозаики цветной капусты, обеспечивающий конститутивную экспрессию целевого и репортерного генов.

4. Pnos - промотор гена нопалинсинтазы *Agrobacterium tumefaciens*, обеспечивающий конститутивную экспрессию селективного гена.

5. Tnos – терминатор гена нопалинсинтазы из *Agrobacterium tumefaciens*, обеспечивающий завершение транскрипции селективного гена.

6. Последовательность poly A (ORF25) из *Agrobacterium tumefaciens*, обеспечивающую завершение транскрипции целевого и репортерного генов.

7. Правую границу T-области плазмиды *Agrobacterium tumefaciens*, обеспечивающую встраивание ДНК.

8. Левую границу T-области плазмиды *Agrobacterium. tumefaciens*, обеспечивающую встраивание ДНК.

Организмы – доноры встраиваемых нуклеотидных последовательностей не являются опасными для здоровья человека (по классификации ВОЗ).

Метод переноса генетической конструкции – агробактериальная трансформация.

Обнаружение и идентификация встроенного целевого и селективного генов проводилась Заявителем методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

3.4. Способность переноса T-ДНК в другие организмы.

Перенос T-ДНК из генома трансгенного клевера в другие растения возможен в процессе переопыления с сортами клевера и дикими родственными видами растений.

3.5. Молекулярные характеристики генетически модифицированного организма, относящиеся к модификации.

Промотор 35S вируса мозаики цветной капусты и промотор гена нопалинсинтазы обеспечивают конститутивную экспрессию целевого и селективного генов соответственно.

Ген термостабильной лихеназы транзигентно и стабильно экспрессируется в клетках бактерий, цианобактерий, дрожжей, растений и млекопитающих с образованием активного и термостабильного фермента, а уровень экспрессии бактериального гена лихеназы зависит от регуляторного элемента, контролирующего его экспрессию. При этом активность термостабильной лихеназы может быть определена простыми, быстрыми,

чувствительными качественными и количественными методами, которые не требуют дорогостоящего оборудования и реактивов.

Заявителем подтверждено наличие последовательностей селективного, целевого и репортерного генов в геноме трансформированных растений поколений T₀. Также было выявлено отсутствие агробактериальной контаминации. Заявителем указано, что стабильность инкорпорации, количество копий встроенной последовательности и уровни экспрессии будут выявлены в дальнейшей работе.

3.6. Характеристика генетически модифицированного организма.

Представленная Заявителем трансгенная линия отличается от исходного сорта Витебчанин по следующим генам/ последовательностям ДНК, привнесенным в его геном в процессе агробактериальной трансформации: целевому гену *desA*, обеспечивающему устойчивость к длительному действию пониженных температур и фитопатогенам, репортерному гену *licBM3*, слитому в одну конструкцию с целевым геном, селективному гену *nptII*, встроенному для отбора трансгенных форм на селективных средах, содержащих антибиотики-аминогликозиды, такие как каномицин и неомицин.

Растения клевера лугового, экспрессирующие Δ 12- десатуразу цианобактерий, получены впервые. Ранее другими исследователями получены растения табака и картофеля. По литературным данным известно, что Δ 12- десатураза эффективно экспрессируется в трансформантах растений, стимулирует биосинтез мембранных липидов и повышает уровень ненасыщенных жирных кислот, что коррелирует с увеличением устойчивости трансформантов к пониженным температурам и фитопатогенам.

Ген *licBM3*, кодирующий β -1,3-1,4-эндоглюканазу, – ключевой фермент метаболизма углеводов. Ген транзигентно и стабильно экспрессируется в клетках бактерий, цианобактерий, дрожжей, растений и

млекопитающих с образованием активного и термостабильного фермента, а уровень экспрессии гена зависит от регуляторного элемента, контролирующего его экспрессию. Репортерная система, основанная на использовании гена *licB*, позволяет осуществлять быстрый отбор трансгенных организмов, определять уровни экспрессии гибридных генов и молекулярные массы белковых продуктов гибридных генов. Кроме того, в растениях β -1,3-1,4-эндоглюконазы способны индуцировать экспрессию генов PR-1 и PBZ1, которые в свою очередь обеспечивают устойчивость к грибным патогенам.

Морфологических изменений у трансгенных растений поколения T₀ по сравнению с контрольным сортом Ветразь Заявителем не выявлено.

Поскольку целевой, репортерный и селективный гены находятся под контролем конститутивных промоторов, следовательно, продукты генов должны синтезироваться во всех частях трансформированных растений.

Заявителем указано, что сравнение аминокислотных последовательностей заявляемой линии с помощью специализированных баз данных продуктов целевого и репортерного генов для установления гомологичности аминокислотной последовательности белка-продукта трансгена с известными последовательностями токсинов и аллергенов будет проведено в дальнейших исследованиях.

3.7. Цель высвобождения.

Цель высвобождения – получение растений, стабильно наследующих признаки устойчивости к пониженным температурам, а так же к ряду грибных фитопатогенов и их экологическая оценка.

В течение и по окончании вегетационных периодов будет проводиться анализ по выявлению трансгенов в растениях, определению стабильности их инкорпорации в геноме, определению устойчивости к пониженным температурам и грибным патогенам, оценка передачи трансгенов контрольным организмам методом ПЦР.

3.8. Условия принимающей среды.

По данным Досье высвобождение будет осуществляться на опытном поле, соответствующем требованиям безопасности, расположенном на территории ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси» (г. Минск, ул. Сурганова, 2В, Первомайский район). В районе расположения опытного поля и поблизости каких-либо природоохранных объектов и территорий нет. 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. 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). Также 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). Участок земли для испытаний существенно не отличается от среды обитания культивируемого на территории Республики Беларусь клевера лугового.

3.9. Методы мониторинга.

Для исключения перекрестного опыления с родственными видами будет производиться удаление соцветий до момента их роспуска, при получении семенного материала – искусственная изоляция соцветий и всего растения, также будет использовано заграждение из специальной сетки против проникновения насекомых и территориальная изоляция от ближайших пастбищ. Мониторинг переноса трансгенов будет производиться методом мультиплекс-ПЦР [9].

3.10. Предполагаемый вид использования ГМР.

Созданная трансгенная линия клевера отличается от реципиентного клевера лугового наличием в геноме гибридного гена *desA-licBM3*, что обуславливает устойчивость растений к длительному воздействию низких температур и фитопатогенам и устойчивость к грибным патогенам, а так же ген *nptIII*, обеспечивающий устойчивость к антибиотику канамицину. По всем другим биологическим свойствам и признакам трансформанты не отличаются от реципиентного клевера, и Заявитель предполагает, что трансгенный клевер может использоваться также как обычный клевер для кормовых целей.

4. Этап 2. Оценка степени вероятности фактического возникновения неблагоприятных последствий, с учетом интенсивности и характера воздействия ГМР на вероятную потенциальную принимающую среду. Этап 3. Оценка последствий в том случае, если такое неблагоприятное воздействие действительно будет иметь место.

4.1. Оценка экологического риска.

4.1.1. Гипотеза. Миграция и последующая интрогрессия трансгенов в дикие популяции в результате вертикального (обмен генетической информацией между организмами, принадлежащими к одному виду растений) переноса генов. Появление новых, более агрессивных

сорняков в результате генетической модификации и/или переноса трансгенов, способствующих повышению агрессивности вида, диким родственным видам.

Оценка экологического риска проводилась, учитывая данные п. 3, на основании листа контрольных вопросов по [4] (приложение 1).

На основании листа контрольных вопросов вероятность миграции трансгена к диким родственным видам оценивается как «вероятно».

Поскольку вероятность миграции трансгена установлена, Заявителю рекомендуется при выпуске трансгенной линии в окружающую среду для проведения ограниченных полевых испытаний на специально оборудованном поле проведение 3-х летних экспериментов на замещение популяций в условии опытного поля по схеме, представленной в методических рекомендациях [4]. Во время полевого эксперимента рекомендовано проведение оценки частоты переопыления и интрогрессии целевого и селективного генов в дикие родственные виды, завязываемости гибридов, их выживаемости, формирования «банка семян». В случае проведения экспериментальных исследований в условиях опытного поля без изоляции соцветий должен проводиться мониторинг возможности переноса встроенной последовательности диким родственным видам на близлежащих к полю территориях методом ПЦР к целевому и селективному генам. Параллельно могут быть проведены экспериментальные исследования в лабораторных условиях на возможность перезимовки семян.

Поскольку цель высвобождения трансгенной формы клевера – испытания в условиях опытного поля, соответствующего требованиям безопасности [7], получение семенного потомства по данным Заявителя будет проходить с удалением соцветий до момента их роспуска, искусственной изоляцией соцветий и всего растения, будет обеспечена территориальная изоляция от ближайших пасек, возможность распространения семян, их потерь и перезимовки, переопыления с дикорастущими видами и завязываемости семян - **средняя**.

В качестве очистки территории Заявителем указано, что по завершении вегетационного периода вся наземная часть и корневая система растений будет захораниваться в яме.

С учетом вышеуказанного, при высвобождении **в условиях опытного поля** вероятность риска миграции и последующей интрогрессии встроенной последовательности в дикие популяции в результате вертикального переноса генов оценивается как **вероятно**, а последствия в случае реализации риска – **среднее**.

4.1.2. Гипотеза. Вероятность передачи трансгенов культурным сортам клевера и последствия такой передачи.

Клевер – перекрестный опылитель. Факторы, влияющие на частоту переопыления, указаны в п. 3. При совместном выращивании трансгенного и нетрансгенного клевера вероятность передачи трансгенов культурным сортам оценивается, как **вероятно** либо **высоковероятно** (в зависимости от генотипа растений и факторов окружающей среды, наличия поблизости ульев и активности насекомых-опылителей: пчел и шмелей).

При совместном возделывании с другими сортами клевера, например, при совместном проведении испытаний на территории опытного поля либо на селекционных станциях в случае одобрения нового сорта, вероятность оценивается, как **высоковероятно**. Если не предусмотрено условиями эксперимента, следует избегать совместного выращивания отдельных трансгенных линий клевера на территории одного опытного поля либо совместного выращивания с другими формами клевера в условиях селекционного питомника. При сортоиспытании и коммерческом возделывании необходима изоляция трансгенных и нетрансгенных культур, расстояние изоляции зависит от масштабов возделывания культур и наличия ульев с насекомыми-опылителями на прилегающих территориях. Рекомендованное расстояние 150-200 м.

При этом вероятность передачи трансгенов как культурным сортам, так и дикорастущим видам будет увеличиваться высокая вероятность сохранения банка семян в почве и прорастания трансгенных растений через продолжительный промежуток времени (до 20 лет), разные сроки цветения, образования пыльцы и семян.

Заявителем в Досье указано, что высвобождение трансгенной линии в условиях опытного поля будет проходить с искусственной изоляцией соцветий. При таком выращивании вероятность переопыления при возделывании на территории опытного поля оценивается, как – **вероятно**. Оценка последствия – **среднее**.

Заявителю рекомендуется проведение исследований в лабораторных условиях по установлению способности к переходу семян в состояние вторичного покоя и перезимовки, которые могут проводиться параллельно с испытаниями в условиях опытного поля на получаемых поколениях.

В случае дальнейшего коммерческого выращивания трансгенной линии на возможность передачи встроенной последовательности другим выращиваемым на прилегающих полях формам клевера будет влиять изоляция посевов трансгенного и нетрансгенного клевера, отсутствие ульев на территории выращивания трансгенного клевера и прилегающих территориях, мероприятия, проводимые перед посадкой новых форм клевера на этом же поле, направленные на уничтожение «банка семян» и самосевных растений, смена культур в севообороте, мониторинговые исследования при смене трансгенной культуры нетрансгенной в условиях одного поля для гарантии отсутствия засорения семенного материала.

При этом необходимо отметить, что существует высокий риск переопыления с другими сортами клевера при совместном возделывании культур на полях либо недостаточной удаленности сортов либо гибридов друг от друга, а также высокий риск переопыления с дикорастущими видами.

4.1.3. Гипотеза. Сокращение биологического (генетического) разнообразия в результате изменения естественных биоценозов, вытеснения местных сортов.

Клевер растет как культурное и дикорастущее растение повсеместно - на среднеувлажнённых лугах, лесных полянах, вдоль полей и дорог и обладает свойствами сорного растения, является перекрестным опылителем, производит большое количество мелких семян, которые способны формировать банк семян и прорасти через 20 лет. Трансгенная линия содержит гибридный ген *desA-licBM3*, который, по литературным данным, обуславливает устойчивость растений к длительному воздействию низких температур и фитопатогенам и устойчивость к грибным патогенам, что может повышать преимущество трансгенной линии по сравнению с нетрансгенной при ее случайном выбросе в окружающую среду и влиять на сокращение биологического разнообразия в результате вытеснения местных сортов. Вероятность оценивается как **высоковероятно**.

Вероятность риска при выращивании на территории опытного поля: **вероятно**, оценка последствий: **среднее**.

4.1.4. Гипотеза. Воздействие продукта трансгенов на организмы, не являющиеся мишенью их заданного действия.

Заявляемая трансгенная линия несет по сравнению с не модифицированным сортом Ветразь гибридный ген *desA-licBM3*, что обуславливает устойчивость растений к длительному воздействию низких температур, фитопатогенам и устойчивость к грибным патогенам, а также ген *nptII*, обеспечивающий устойчивость к антибиотику канамицин. Устойчивость к пониженным температурам и патогенам обусловлена тем, что фермент ацил-липидная десатураза, кодируемая геном *desA*, стимулирует биосинтез мембранных липидов и повышает уровень ненасыщенных жирных кислот [10]. Фермент лихеназа, кодируемая геном *licBM3*, является ключевым ферментом метаболизма углеводов, участвуют во многих

физиологических процессах, в том числе, способна индуцировать экспрессию генов PR-1 и PBZ1, определяющих устойчивость к грибным патогенам. Таким образом, регуляторное действие ферментов не направлено на организмы-мишени, организмов-немишеней трансгенной линии нет.

Оценка вероятности воздействия на организмы мишени и организмы не мишени – **маловероятно**, оценка последствия – **незначительное**.

На основании данных оценки вероятности отдельных возможных экологических рисков, суммарный экологический риск при выращивании трансгенной линии клевера со встроенной гибридной последовательностью *desA-licBM3* оценен, как средний. В случае проведения экспериментальных исследований без искусственной изоляции соцветий рекомендуемый метод регулирования – мониторинг с использованием ПЦР к последовательностям гибридного и селективного генов.

4.2. Оценка риска здоровью человека.

Гипотеза. Трансгенная линия клевера при использовании в пищу оказывает токсическое и аллергенное влияние на организм человека.

Заявителем указано, что будет проведена оценка потенциальной аллергенности и токсичности с использованием специализированных поисковых систем для поиска возможной гомологии продуктов встроенных последовательностей генов с известными аллергенами и токсинами.

Ранее разрабатывались трансгенные растения, несущие ген *nptII*. После прохождения экологической экспертизы и оценки рисков здоровью человека такие растения были одобрены для выпуска на рынок [5, 6].

В случае высвобождения нового сорта на основе заявляемой трансгенной линии клевера, необходимо тщательное изучение потенциальной аллергенности и токсичности по установленным в Республике Беларусь стандартам [2]. Необходимо будет определить копийность встроенных генов и уровень экспрессии гибридного гена.

Поскольку линия будет высвобождаться на территории опытного поля, соответствующего требованиям биобезопасности, и заявитель предлагает меры для изоляции, вероятность наступления неблагоприятного воздействия оценивается, как маловероятно. Оценка последствия – незначительное, общий риск – неопасный.

Перед выпуском в окружающую среду без искусственной изоляции соцветий либо на рынок нового сорта необходимо провести сравнение трансгенных растений с нетрансгенным аналогом (сортом Ветразь) по ключевым питательным веществам и ингибиторам метаболизма для установления следующего: не происходит ли превышение их содержания у трансгенного сорта по сравнению с немодифицированным контролем (сорт Ветразь). Необходимо обязательно подтвердить стабильность вставки, число копий и безопасные уровни накопления конечного продукта гибридного гена в трансгенных растениях. Необходимо провести аллергологические и токсикологические тесты по установленным в Республике Беларусь Инструкциям [2]. В случае выращивания таких растений необходимо соблюдение достаточных изолирующих расстояний до посадок других сортов или гибридов клевера и мероприятия по недопущению формирования банка семян в почве для того, чтобы не произошло переопыление и засорение культурных сортов клевера и дикорастущих видов.

4. Этап 5. Оценка совокупного риска, вызываемого ГМР, на основе оценки вероятности возникновения и последствий каждого выявленного неблагоприятного воздействия. Вынесение рекомендации относительно того, являются ли риски приемлемыми или регулируемыми, включая, если это необходимо, определение стратегий для регулирования таких рисков.

Суммарный экологический риск и риск для здоровья человека при выращивании для исследований заявленной трансгенной линии клевера на территории опытного поля, соответствующего требованиям

безопасности [7], оценивается как **средний.** Рекомендуемый метод регулирования при испытаниях в условиях опытного поля, соответствующего требованиям безопасности – искусственная изоляция соцветий, использование специальных сеток, ограничивающих проникновение пчел и шмелей на территорию опытного поля. При оценке без искусственной изоляции соцветий необходимо использовать мониторинг (метод ПЦР к гибридным и селективным генам). Заявителю дан ряд рекомендаций по проведению оценки экологического риска и риска здоровью человека при анализе последующих поколений (п. 4.1.1, 4.1.2, 4.2). Даны рекомендации в случае возможного коммерческого выращивания (п. 4.1.2, 4.2).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. В результате проведенной государственной экспертизы безопасности трансгенной линии клевера со встроенными последовательностями гена *desA*, обеспечивающего устойчивость к длительному действию пониженных температур и фитопатогенам, репортерного гена *licBM3*, слитого в одну конструкцию с целевым геном, селективного гена *nptII*, обеспечивающего устойчивость к антибиотикам-аминогликозидам, выводы которой основываются на результате анализа данных Досье, представленных Заявителем (ГНУ «Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси»), Эксперт считает, что риск высвобождения заявляемой трансгенной линии клевера в окружающую среду для проведения испытаний на территории опытного поля, соответствующего требованиям безопасности к опытным полям и другим объектам, предназначенным для проведения испытаний непатогенных генно-инженерных организмов [7], является **средним**.

2. Заявителем разработаны меры изоляции и мониторинга при выращивании трансгенной линии на территории опытного поля, меры по регулированию рисков, меры очистки территории опытного поля по окончании вегетационного периода, являющиеся эффективными для преодоления долгосрочного неблагоприятного воздействия.

ВЫВОДЫ О ДОПУСТИМОСТИ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ТРАНСГЕННОЙ ЛИНИИ КЛЕВЕРА И РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Заявляемая трансгенная линия клевера со встроенной гибридной последовательностью *desA-licBM3* и геном *nptII* может быть высвобождена в окружающую среду для проведения испытаний на территории опытного поля, соответствующего требованиям безопасности, при условии искусственной изоляции соцветий, удаленности ульев от территории

опытного поля на расстоянии 150-200 м, использовании специальной сетки, препятствующей проникновению насекомых-опылителей на территорию опытного поля.

2. Экспертом даются рекомендации о том, что необходимо проведение экологических экспериментов в условиях опытного поля по оценке переноса гибридной последовательности *desA-licBM3* и селективного гена *nptII* культурным сортам клевера и диким родственным видам, а также проведение лабораторных исследований на способность к переходу семян в состояние вторичного покоя и возможность перезимовки, которые могут проводиться параллельно с полевыми испытаниями. Кроме того, при проведении экспериментальных исследований в условиях опытного поля должен проводиться мониторинг возможности передачи гибридного гена *desA-licBM3* и селективного гена *nptII* диким родственным видам на прилегающих к опытному полю территориях.

3. В случае выпуска на рынок нового сорта на основе трансгенной линии клевера должна быть определена копийность целевого и селективного генов и уровни их экспрессии в заявляемом сорте, проведена медико-биологическая экспертиза по установленным в Республике Беларусь стандартам [2].

4. В случае широкомасштабного выпуска нового сорта, созданного с использованием заявляемой линии, в окружающую среду необходима разработка процедур выращивания, что обусловлено высоким сорным потенциалом клевера и вероятностью передачи трансгена культурным сортам и диким родственным видам, а также разработка процедур регулирования риска сохранения «банка семян» и появления самосевных растений.

Список литературы

1. Постановление Совета Министров Республики Беларусь «Об утверждении Положений о порядке проведения государственной экспертизы безопасности генно-инженерных организмов и примерных условиях договоров, заключаемых для ее проведения, и выдачи разрешений на высвобождение непатогенных генно-инженерных организмов в окружающую среду для проведения испытаний» от 8 сентября 2006 г. № 1160 // Национальный реестр правовых актов Республики Беларусь. – 2006 – № 151. – Рег. № 5/22922.
2. Порядок проведения оценки риска возможных вредных воздействий генно-инженерных организмов на здоровье человека: Инструкция по применению / В.Г.Цыганков [и др.] // Утверждена Министерством здравоохранения Республики Беларусь 25 августа 2006. – Регистрационный №076-0806. – Минск, 2006. – 15 с.
3. Руководство по оценке рисков в отношении живых измененных организмов» // Электронный ресурс. Режим доступа: <http://www.cbd.int/doc/meetings/bs/mop-06/official/mop-06-13-add1-ru.pdf>.
4. Мозгова Г.В. Оценка рисков воздействия ГМО на сохранение и устойчивое использование биологического разнообразия, с учетом рисков для здоровья человека: методические рекомендации. Мн: Право и экономика, 2014, 58с.
5. Механизм посредничества по биобезопасности. – Режим доступа: <http://bch.cbd.int/>.
6. Международная служба по сбору агробιοтехнологических разработок. - Режим доступа: <http://www.isaaa.org/>.
7. Постановления Министерства природных ресурсов и охраны окружающей среды Республики Беларусь «О требованиях безопасности к опытным полям и другим объектам, предназначенным для проведения испытаний непатогенных генно-инженерных организмов при их первом высвобождении в окружающую среду» от 29 августа 2006 г. №56 //

Национальный реестр правовых актов Республики Беларусь. – 2006. – № 151.
– Рег. № 8/14993.

8. Биотехнология. Биобезопасность. Биоэтика / А. П. Ермишин [и др.].
– Минск: Тэхналогія, 2005. – 430 с. [Электронный ресурс] / Национальный
координационный центр биобезопасности. – 2005. – Режим доступа:
[http://biosafety.org.by/sites/default/files/downloads/Publications/BioTech-Saf-
Eth\).pdf](http://biosafety.org.by/sites/default/files/downloads/Publications/BioTech-Saf-Eth).pdf).

9. Multiplex PCR assay for detection of recombinant genes for detection
fatty acid desaturases fused with lichenase reporter protein in GM plants /
Berdichevets I.N. [et al.] // Anal. Bioanal. Chem. – 2010. –Vol. 397. – P. 2289-
2293.

10. Комахин Р.А. Термостабильная лихеназа *Clostridium thermocellum*
для фундаментальных и прикладных исследований... дисс. на соискание
ученой степени кандидата биологических наук, 2005. -133 с. / Научная
библиотека диссертаций и авторефератов
[http://www.dissercat.com/content/termostabilnaya-likhenaza-clostridium-
thermocellum-dlya-fundamentalnykh-i-prikladnykh-issled#ixzz4mhmYnnDW](http://www.dissercat.com/content/termostabilnaya-likhenaza-clostridium-thermocellum-dlya-fundamentalnykh-i-prikladnykh-issled#ixzz4mhmYnnDW).

Директор Института генетики и цитологии
НАН Беларуси,
к.б.н., доцент

 В.А. Лемеш

Руководитель НКЦБ, к.б.н.

 Г.В. Мозгова

Оценка миграции и последующей интрогрессии трансгенов в дикорастущие популяции в результате вертикального (обмен генетической информацией между организмами, принадлежащими к одному виду растений) переноса генов. Появление новых, более агрессивных сорняков в результате генетической модификации и/или переноса трансгенов, способствующих повышению агрессивности вида, диким родственным видам.

Оценка вероятности миграции трансгена (могут ли образовываться жизнеспособные фертильные гибриды от скрещивания трансгенной культуры с ее диким или сорным сородичем).

А) Является ли основным типом размножения половой тип?

- Да - переход к вопросу Б.

Б) Является ли трансгенная культура перекрестноопыляемой или частично перекрестноопыляемой?

- Да - переход к вопросу В.

В) Имеет ли ГМР родственные виды в регионе высвобождения (в агросреде и природной среде)?

- Да - переход к вопросу Г,

Г) Может ли скрещиваться с родственным видом в принципе и ведет ли скрещивание к образованию фертильного потомства (возможна ли миграция генов между популяциями трансгенной культуры и родственного вида)?

- Да - переходим к вопросу Д.

Д) Является ли время цветения культурного (ГМР) и родственных видов совпадающим или близким по времени (с учетом срока жизнеспособности пыльцы и количества образующейся фертильной пыльцы)?

- Информация недостаточна - переход к вопросу Е.

Е) Используют ли культурный вид (ГМР) и родственный вид одинаковую систему опыления (ветер, насекомые)?

- Да - переход к вопросу Ж.

Ж) Могут ли культурный вид (ГМР) и его родственные виды перекрестно опыляться в природе и формировать семена, способные к последующему размножению в природных (полевых) условиях?

- Да или информация недостаточна.