

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель директора Института генетики
и цитологии НАН Беларуси, к.б.н



Е.А. Сычева

(М.П.)

2017 г.

Заключение государственной экспертизы биобезопасности генно-инженерных организмов

1. Общие положения

Эксперт – Государственное научное учреждение «Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси»

Заказчик – Государственное научное учреждение «Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси»

Исполнитель – Министерство природных ресурсов и охраны окружающей среды Республики Беларусь

Цель экспертизы – получение разрешения на высвобождение непатогенных генно-инженерных организмов (трансгенных форм картофеля) в окружающую среду для испытаний.

Объект экспертизы – трансгенные формы картофеля со встроенными генами антимикробных пептидов цекропин-мелиттинового типа

Основание для проведения экспертизы – договор № 8 от 24 марта 2017 г.

Исполнителем, на основании представленной Заказчиком информации об оценке риска о возможных вредных воздействиях 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»), руководствуясь 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], методических рекомендаций [2, 3], консенсусного документа Организации экономического сотрудничества и развития по биологии рода *Solanum* [4], руководства и данных Механизма посредничества по биобезопасности ВСН [5, 6], проведена экспертиза биобезопасности при первом высвобождении в окружающую среду для проведения испытаний заявленного Заказчиком объекта экспертизы.

2. Методология проведения оценки рисков трансгенных форм картофеля со встроенными генами антимикробных пептидов цекропин-мелиттинового типа

Проведение оценки рисков трансгенных форм картофеля со встроенными генами антимикробных пептидов цекропин-мелиттинового типа проводилось 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 трансгенных форм картофеля проводилось в контексте рисков, вызываемых немодифицированным реципиентом (картофелем *Solanum tuberosum*). При этом принимался во внимание масштаб высвобождения (ограниченные полевые испытания) принимающая среда первого высвобождения, и вероятные потенциальные принимающие среды, в которых планируется высвобождение.

Методология оценки риска включала:

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

Этап 2. Оценка степени вероятности фактического возникновения таких неблагоприятных последствий с учетом интенсивности и характера воздействия ГМО 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 ГМО, на основе оценки вероятности возникновения и последствий выявленного неблагоприятного воздействия.

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

На первом этапе выдвигались гипотезы в отношении потенциальных рисков ГМО, научно-достоверные сценарии реализации рисков, а также определялись пути дифференциации риска и вредного воздействия. С целью

установления, какие новые характеристики ГМО 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. Информация касается особенностей вектора, встраиваемых последовательностей, особенностей организма-реципиента (*Solanum tuberosum*), ГМО. Проведен сравнительный анализ генотипических и фенотипических характеристик ГМО и организма-реципиента (*Solanum tuberosum*), особенностей потенциальных принимающих сред и информации, касающейся предполагаемого вида использования ГМО.

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

- особенности ГМО (по сравнению с реципиентными организмами), 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 ГМО;
- способность к переносу генетической информации: наличие в потенциальной принимающей среде диких или культурных родственных видов, способных к гибридизации с ГМО, вероятность переноса трансгенов от ГМО к таким организмам;
- идентификация и описание организмов-мишеней (организмов, на которых направлено действие) продуктов трансгенов ГМО;
- идентификация и описание организмов, не являющихся мишенями продуктов трансгенов, которые могут быть подвержены влиянию генно-инженерных организмов.

На 2 и 3 этапах оценки рисков 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»**.

На 4 этапе была дана качественная оценка совокупного риска, вызываемого ГМО. Оценка совокупного риска дана с использованием следующих терминов **«высокий»**, **«средний»**, **«низкий»**, **«незначительный»** или **«неопределенный»** (вследствие отсутствия ясности относительно уровня риска или недостаточности знаний).

На 5 этапе были 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. Оценка рисков трансгенных форм картофеля со встроенными генами антимикробных пептидов цекропин-мелиттинового типа

3.1. Информация, имеющая существенное отношение к оценке риска.

3.1.1. Характеристика реципиентного организма.

Картофель *Solanum tuberosum* L., произрастающий на территории Республики Беларусь, является тетраплоидом ($4n=48$).

Размножается вегетативным и половым путем. Относится к растениям-самоопылителям. Однако, возможно переопыление посредством насекомых (в основном, шмелей и пчел).

Для использования в хозяйственной деятельности картофель выращивают в виде клубней. Клубни картофеля после созревания переходят в состояние покоя. Оставшиеся в почве не удаленные с поля во время уборки клубни могут сохраняться и прорасти на следующий год. На выживаемость оказывают влияние температура и степень поражения фитопатогенами.

Семенное размножение ограничено и используется только в селекционной работе. Рассеивание картофеля естественным путем практически не происходит и может осуществляться только при помощи человека. Завязавшиеся семена в процессе уборки картофеля, как правило, уничтожаются вместе с вегетативной массой.

Картофель не является сорным растением. В Республике Беларусь картофель относится к растениям низкого уровня риска миграции трансгена в природные популяции родственных видов растений. Он характеризуется полной половой несовместимостью с другими культивируемыми видами растений и крайне низкой совместимостью с дикими видами картофеля, которые не произрастают в Республике Беларусь и встречаются в естественных условиях в Южной (Перу, Чили, Боливия, Аргентина) и Центральной (Мексика, Гватемала) Америке. На территории Республики Беларусь единственным дикорастущим родственником культурного

картофеля является паслен черный (*Solanum nigrum* L.) – это сорняк, растущий в посадках культурного картофеля. Однако спонтанная гибридизация между *Solanum tuberosum* и *Solanum nigrum* в естественных условиях не происходит и получение межвидовых гибридов возможно только в экспериментальных условиях *in vitro*.

3.1.2. Характер генетической модификации, метод, использованный для переноса генетической конструкции, стабильность вставки.

Цель генетической модификации – включение в геном реципиентных организмов (картофель *Solanum tuberosum* L., сорта Одиссей, Скарб, Ветразь) и активность в них кодирующих последовательностей антимикробных пептидов MsrA1 или СЕМА.

Антимикробные пептиды MsrA1 и СЕМА являются искусственными рекомбинантными молекулами, разработанными методом молекулярного моделирования; включают 8 N-концевых аминокислот цекропина А насекомых, 18 С-концевых аминокислот мелиттина пчел.

Полученные разработчиками генетически-модифицированные формы содержат, по сравнению с исходными сортами, вставку чужеродной ДНК, представляющую собой генетическую конструкцию, которая включает в себя следующий генетический материал:

- Целевые гены: одну из последовательностей ДНК, кодирующую либо антимикробный пептид СЕМА, либо MsrA1, которые определяют антибиотическую активность в отношении широкого спектра фитопатогенных организмов, поражающих растения, включая грамм-положительные и грамм-отрицательные бактерии, а также грибные патогены.
- 35S промотор вируса мозаики цветной капусты (CaMV), обеспечивающий конститутивную экспрессию целевых генов.
- Маркерный ген: ген *nptII*, кодирующий синтез фермента неомицинофосфотрансферазы, и использующийся для селективного отбора трансформированных растений на средах с канамицином.

- Промотор гена нопалин-синтазы, обеспечивающий конститутивную экспрессию маркерного гена.

- Терминальную последовательность гена *polyA* нопалин-синтазы, обеспечивающую завершение транскрипции целевого и маркерного генов.

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

Метод переноса генетической конструкции – агробактериальная трансформация.

Соответствующий фрагмент ДНК, несущий гены пептидов *MsrA1* или СЕМА и *nptII* был выявлен Заявителем у всех клубневых клонов, полученных от трансгенных растений (электрофореграммы представлены Эксперту).

3.1.3. Способность переноса вектора в другие организмы.

Перенос T-области вектора из генома трансгенного картофеля возможен в процессе переопыления с сортами культурного картофеля.

Гены из T-области плазмиды pBI121 могут экспрессироваться в клетках бактерий вследствие возможной сквозной транскрипции с промотора *LacZ* бинарного вектора. Поэтому для получения трансгенной формы картофеля с генами цекропин-мелиттинового типа был использован вектор с переориентированной кассетой экспрессии, что исключает возможность транскрипции целевого гена под контролем бактериального промотера.

T-область свойствами мобильности или переноса в другие организмы не обладает.

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

Формы трансгенных растений, содержащие целевые гены, отобраны на основе анализа нуклеотидных последовательностей методом секвенирования. Показана полная гомология нуклеотидных последовательностей вставки

известным последовательностям генов, содержащихся в международном банке генов.

При оценке клубневого поколения соответствующий фрагмент ДНК (MsrA1 либо СЕМА) был выявлен у всех клубневых клонов, полученных от исходных трансгенных растений, что говорит о стабильности наследования при вегетативном размножении. При оценке семенного поколения T1 также была подтверждена стабильность наследования (данные Досье).

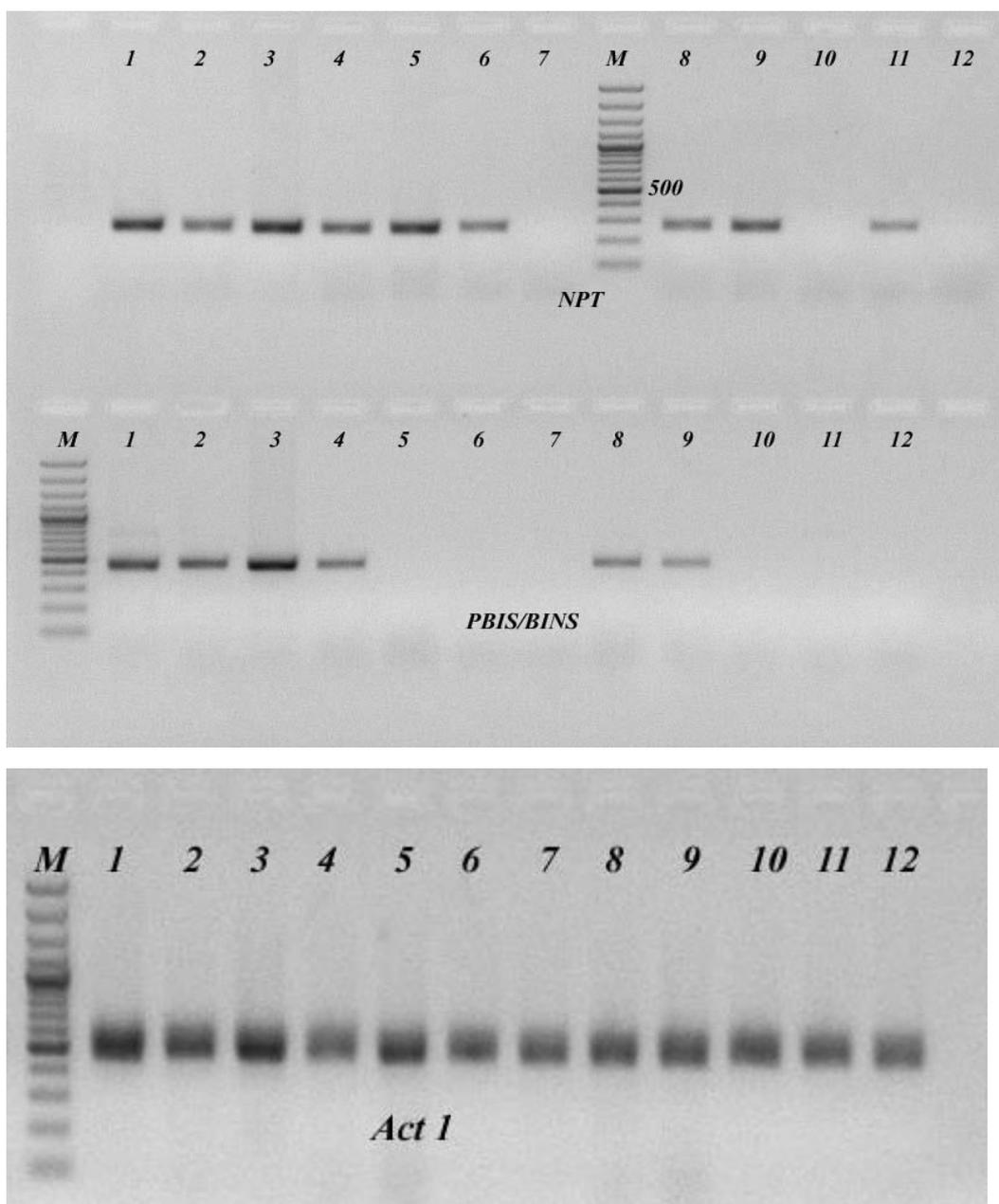
Методом ПЦР в реальном времени установлено, что в заявленных формах количество копий трансгенных вставок варьировало. Корреляции относительного количества трансгенных вставок с относительными уровнями экспрессии заявителем выявлено не было. При оценке семенного поколения T1 характер расщепления по признаку соответствовал встраиванию трансгенной конструкции в одну и более хромосом.

Заявителем указано, что более точное число копий будет определено для перспективных трансгенных линий, отобранных на специальном опытном поле, соответствующем требованиям биобезопасности.

В лаборатории генетической и клеточной инженерии Института генетики и цитологии НАН Беларуси проведена идентификация целевого и селективного генов в предоставленном Заявителем материале (Акт о передаче трансгенных линий картофеля с генами антимикробных пептидов цекропин-мелиттинового типа от 30.03.2017 г.). Качественная ПЦР с использованием пар праймеров NPTS/NPTA, BINS/PBIS, Act1S/Act1A (контроль) и ПЦР в реальном времени с использованием пары праймеров MC2S/MC2A (таблица 1) позволила идентифицировать заявляемые последовательности в материале (рисунок 1, таблица 2).

Таблица 1 – Праймеры, использованные для идентификации встроенных последовательностей ДНК

Наименование праймеров	Нуклеотидная последовательность	Локализация	Температура отжига, °С	Ожидаемый размер ПЦР-продукта, пн
NPT	S 5' – ccttgctcctgccgagaaagtatcc	ген неоминифосфотранс-феразы II из T-области бинарного вектора pBI121	58 или 59	264
	A 5' – cggcaagcaggcatgccatgggtc			
Act1	S 5' – catggattgtcagcaattg	ген актина картофеля (X55749)	49	501
	A 5' – ccacgctcagtgaggatc			
BINS	S 5'– aaacagctatgacatgatt	T-область бинарного вектора pBI121 (AF485783) – вектор на основе плазмиды pBIN19 (PBIN19TD)	55	465 (MsrA1), 450 (CEMA)
PBIS	A 5'– catttcatttgagagaacacg			
MC2	S 5'- gtggaagcttttaagaagattgg	нуклеотидные последовательности цекропин-меллитоновых гибридов MsrA1 и CEMA.	51	76
	A 5'- aagcttaagagcaggaagtcaag			



1 - Ветразь Z, 2 - Одиссей С, 3 - Одиссей С2, 4 - Одиссей С3,
 5 - Одиссей А1, 6 - Одиссей А2, 7 - Одиссей контроль, 8 – Скарб CL 1,
 9 - Скарб CL 2, 10 - Скарб CL 3, 11 – Скарб CN, 12 – Скарб контроль. М –
 маркер молекулярной массы 100 bp Plus (Thermo Fisher Scientific)

Рисунок 1 – Электрофореграмма продуктов амплификации
 индивидуальных трансгенных растений картофеля с праймерами NptS/NptA,
 BINS/PBIS, Act1S/Act1A

Таблица 2 – Оценка наличия встроенных последовательностей у анализируемых форм

№ п/п	Название	NPT	PBIS/BINS	MC 2 (Ct)	Act 1
1	Ветразь Z	+	+	29,21	+
2	Одиссей C1	+	+	27,34	+
3	Одиссей C2	+	+	26,62	+
4	Одиссей C3	+	+	27,22	+
5	Одиссей A1	+	-	25,93	+
6	Одиссей A2	+	-	29,00	+
7	Одиссей контроль	-	-	0,00	+
8	Скарб CL 1	+	+	28,74	+
9	Скарб CL 2	+	+	29,71	+
10	Скарб CL 3	-	-	0,00	+
11	Скарб CN	+	-	0,00	+
12	Скарб контроль	-	-	0,00	+

Формы Ветразь Z, Одиссей C1, C2, C3, Скарб CL1 и CL2 несут искомую конструкцию.

Таким образом, предложенные заявителем методы обнаружения трансгенной вставки, целевого и селективного генов являются достаточно чувствительными для мониторинга трансгенного картофеля. Впоследствии может быть также разработан метод мультиплекс-ПЦР.

3.1.5. Уровни экспрессии трансгенов.

Заявителем показано наличие мРНК транскриптов генов, кодирующих антимикробные пептиды MsrA1, СЕМА, и транскрипции с гена *nptII* для всех заявленных разработанных форм. При этом указано, что количественный анализ экспрессии будет проведен для наиболее перспективных линий, отобранных в процессе полевых ограниченных испытаний.

Заявителем было также показано, что в препаратах суммарного белка вегетативного потомства заявляемых форм присутствуют пептиды размером около 3кДа, что соответствует размерам целевых антимикробных пептидов MsrA1 и СЕМА.

3.1.6. Характеристика генетически модифицированного организма.

Морфологических изменений у трансгенных форм по сравнению с контролем (родительскими сортами) не выявлено.

Представленные разработчиками трансгенные формы отличаются от реципиентного организма по двум генам – целевому (СЕМА либо MsrA1) и селективному (*nptII*), и отличаются от реципиентного растения по двум признакам – устойчивость к фитопатогенным микроорганизмам, которая связана с экспрессией встроенных генов для синтеза антимикробных пептидов цекропин-меллитинового типа, и устойчивость к антибиотику канамицину, которая обусловлена синтезом фермента неомицинтрансфериразы. Активность гена *nptIII* в клетке придает ей также устойчивость к родственным канамицину антибиотикам: неомицину и гинетицину.

Целевые гены находятся под контролем конститутивного промотора, следовательно, антимикробные пептиды должны синтезироваться во всех частях растения.

Разработанные трансгенные растения могут превосходить исходный сорт по конкурентоспособности благодаря устойчивости к фитопатогенным микроорганизмам в силу лучшей выживаемости и урожайности.

3.1.7. Активность и свойства протеинов, кодируемых трансгенами.

Синтетические гибридные пептиды цекропин-мелиттинового типа являются катионными антимикробными пептидами, которые обладают антимикробной активностью (широкий спектр активности в отношении грамотрицательных, грамположительных бактерий и грибных патогенов),

которая может в 100 раз превышать активность природного цекропина А насекомых (литературные данные, представленные в Досье). По литературным данным Досье, в отличие от природного аналога, катионные антимикробные пептиды цекропин-мелиттинового типа селективно действуют на прокариотическую мембрану, отличая ее от эукариотической, то есть не обладают существенной гемолитической активностью в отличие от полноразмерного мелиттина пчел.

3.1.8. Цель высвобождения.

Высвобождение будет происходить на специальном опытном поле Института генетики и цитологии НАН Беларуси, соответствующем требованиям биобезопасности, установленным в Республике Беларусь [7] с целью проведения экологической экспертизы, размножения трансгенных форм картофеля и изучения устойчивости растений к грибным и микробным патогенам, оценки интенсивности цветения, бутонизации, образования семян и урожайности трансгенных форм по сравнению с контрольными сортами картофеля Одиссей, Скарб и Ветразь, отбора перспективных трансгенных линий, определения у данных линий копийности вставки и уровней экспрессии генов.

3.1.9. Потенциальная токсичность и аллергенности.

Оценка проведена Заявителем по установленным Инструкциям [2].

По литературным данным, представленным Заявителем, антимикробные пептиды цекропин-мелиттинового типа легко денатурируют при нагревании, в кислой среде желудка, быстро перевариваются желудочным соком. Пептиды, попадая в чистом виде в кровь, являются безопасными для млекопитающих. Белковый продукт селективного гена *np1II* имеет историю безопасного использования по отношению к здоровью человека и животных.

Поиск Заявителем возможных аналогов MsrA1 и СЕМА, относящихся к аллергенам и токсинам, с использованием баз данных UniProt и WHO-IUIS показал наличие сходства MsrA1 с белком – меллитином пчел и отсутствие аналогов белков токсинов и аллергенов для СЕМА.

Институтом физиологии Национальной академии наук Беларуси были проведены исследования влияния диеты, содержащей трансгенный картофель на эмбриональное и постэмбриональное развитие лабораторных мышей (родители, поколение F1). Исследования проводились на опытной группе, получавшей с рационом ГМ-картофель (30% от рациона), контрольной группе, получавшей с рационом картофель исходных родительских сортов в том же количестве от рациона, интактной группе (самки и их потомство), получавшей обычный рацион без картофеля. В результате исследований не были выявлены достоверные различия в группе, получавшей трансгенный картофель, по сравнению с контрольной и интактной группой.

3.2. Общее описание процедуры оценки рисков и вынесение рекомендаций.

3.2.1. Оценка экологического риска.

3.2.1.1. 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 вероятности миграции трансгенов. Картофель - вегетативно размножаемое культурное растение, не обладающее способностью к выживанию вне культурных биоценозов в климатических условиях Республики Беларусь. Картофель не является сорным растением. Он

характеризуется полной половой несовместимостью с другими культивируемыми видами растений и крайне низкой совместимостью с дикими видами картофеля, которые не произрастают в Республике Беларусь. Дикие сородичи произрастают в странах Центральной и Южной Америки. На территории Республики Беларусь единственным дикорастущим родственным видом культурного картофеля является паслен черный (*Solanum nigrum* L.) – это сорняк, растущий в посадках культурного картофеля. Спонтанная гибридизация между *Solanum tuberosum* и *Solanum nigrum* в естественных условиях не происходит и получение межвидовых гибридов возможно только в экспериментальных условиях *in vitro*. Проведенный в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси эксперимент по опылению кастрированных цветков паслена смесью пыльцы трансгенных линий показал полное отсутствие завязываемости гибридных ягод и семян и согласуется с литературными источниками (данные Заявителя).

Вероятность миграции трансгенов в дикие популяции и появление новых более агрессивных сорняков при возделывании в Республике Беларусь и других странах, кроме указанных выше, в которых произрастают дикие сородичи, - **весьма маловероятно. Оценка последствия** (кроме стран, в которых произрастают дикие сородичи) – **маргинальное.**

3.2.1.2. Вероятность передачи трансгенов культурным сортам картофеля и последствия такой передачи.

Культурный тетраплоидный картофель относят к растениям-самоопылителям. Вместе с тем, возможен перенос трансгена к культурным сортам картофеля при совместном культивировании посредством переопыления насекомыми (шмели, пчелы). На территории опытного поля, соответствующего требованиям безопасности, ульев нет.

Картофель – вегетативно размножаемое растение. Клубни с полей убирают во время сборки урожая. Вместе с тем, оставшиеся в почве клубни могут сохраняться и прорасти на следующий год. На выживаемость влияют климатические факторы и степень заражения нематодами, колорадским

жуком и фитопатогенными микроорганизмами. Возможно также формирование семян, однако, рассеивание картофеля естественным путем практически не происходит.

В конце вегетационного периода выращивания трансгенных растений на специальном опытном поле, соответствующем требованиям безопасности, вся наземная часть растений будет срезаться и уничтожаться путем кремации, а клубни тщательно выбираться и храниться в специальных хранилищах.

Вероятность передачи трансгенов культурным сортам картофеля при возделывании трансгенного картофеля на территории опытного поля, соответствующего требованиям безопасности, – маловероятно. Оценка последствия – незначительное.

При возможном дальнейшем коммерческом выращивании на вероятность передачи трансгена будет влиять степень контроля за полнотой сборки урожая и уничтожение семян вместе с вегетативной массой в процессе уборки. Для предотвращения переноса пыльцы от трансгенного картофеля к нетрансгенному посредством насекомых при дальнейшем коммерческом использовании в качестве изолирующего фактора может применяться его возделывание от нетрансгенного на расстоянии 150-200 м. и отсутствие ульев поблизости от полей, на которых возделывается картофель. В ходе экологической экспертизы рекомендовано провести эксперимент для оценки возможности передачи трансгенной конструкции контрольным немодифицированным сортам картофеля.

3.2.1.3. Гипотеза. Миграция и последующая интрогрессия трансгенов в результате горизонтального (обмен генетической информацией между организмами, принадлежащими к разным видам) переноса генов.

Оценка вероятности горизонтального переноса генов. Возможен перенос генов в геном бактерий. Поскольку гены из T-области плазмиды pVI121 могут экспрессироваться в клетках бактерий вследствие возможной

сквозной транскрипции с промотора *LacZ* бинарного вектора, для получения трансгенной формы картофеля с генами цекропин-мелиттинового типа был использован вектор с переориентированной кассетой экспрессии, что исключает возможность транскрипции целевого (и селективного) генов под контролем бактериального промотора.

Вероятность возникновения неблагоприятного последствия - маловероятно. Оценка последствия – незначительное.

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

Существует неизученная проблема потенциального негативного влияния синтезируемых протеинов цекропин-мелиттинового типа на установление ассоциативных связей между растениями и полезными для них микроорганизмами, в частности, метилотрофными и метанотрофными бактериями. Такое воздействие может быть изучено, поскольку данные микроорганизмы участвуют в развитии растений и формировании устойчивости к абиотическим и биотическим стрессовым факторам.

По литературным данным цекропиновые и мелиттиновые белки могут воздействовать на широкий спектр микроорганизмов, включающих грамм-положительные и грамм-отрицательные бактерии, и грибы (например, *Phytophthora*, *Fuzarium*, *Alternaria*). При этом катионные антимикробные пептиды цекропин-мелиттинового типа селективно действуют на прокариотическую мембрану, отличая ее от эукариотической (исключение составляют грибы – возбудители болезней картофеля, например отдел Оомицеты, Аскомицеты).

Другие организмы-немишени выявлены не были.

Вероятность возникновения неблагоприятного последствия при выращивании на территории опытного поля - маловероятно. Оценка последствия – незначительное.

3.2.1.5. Гипотеза. Появление живых организмов, резистентных или толерантных к продуктам трансгенов.

Следует отметить, что развитие резистентности не является самим по себе риском, вызываемым трансгенным растением. Вместе с тем считаем целесообразным рассмотреть данную гипотезу, поскольку она может определять, целесообразно ли было изначальное создание трансгенного растения.

Отличительные черты катионных антимикробных пептидов, формой которых являются синтезируемые целевыми генами трансгенных растений синтетические пептиды цекропин-мелиттинового типа, являются суммарный положительный заряд и амфифильность, которые обеспечивают нарушение целостности биомембран и лизис клеток. Реализация такого механизма действия существенно уменьшает вероятность появления резистентных штаммов патогенов.

Вероятность возникновения неблагоприятного последствия при выращивании на территории опытного поля, соответствующего требованиям биобезопасности, - маловероятно. **Оценка последствия** – незначительное.

На основании данных оценки вероятности отдельных возможных экологических рисков, суммарный экологический риск при выращивании трансгенных растений, несущих гены цекропин-мелиттинового типа оценен, **как незначительный**. При возможном коммерческом возделывании трансгенного картофеля должны быть применены меры регулирования, указанные в п.3. Также рекомендуется во время полевых испытаний провести оценку всхожести, урожайности, интенсивности цветения, ягодообразования, завязываемости семян трансгенных форм по сравнению с контролем (родительскими сортами), переноса трансгена контрольным формам, совместно выращиваемым на опытном поле, вероятности перезимовки оставленных в почве клубней, семян для оценки их конкурентоспособности и разработки дальнейших мер по регулированию потенциальных рисков в случае последующего коммерческого использования картофеля. В случае

возможного возделывания трансгенного картофеля в странах произрастания диких сородичей уровень суммарного экологического риска и меры его регулирования должны быть пересмотрены.

3.2.2. Оценка риска здоровью человека.

Гипотеза. Трансгенный картофель при использовании в пищу оказывает токсический эффект на здоровье человека и аллергические реакции.

Токсикологическая оценка, проведенная заявителем, соответствует принятым в Республике Беларусь Инструкциям [3]. На первом этапе было определено наличие или отсутствие гомологии новых белков с токсинами белковой природы, а также с белками, обладающими фармакологической или иной биологической активностью. Поиск Заявителем возможных аналогов MsrA1 и СЕМА, относящихся к аллергенам и токсинам, с использованием баз данных UniProt и WHO-IUIS показал наличие сходства MsrA1 с белком – меллитином пчел и отсутствие аналогов белков токсинов и аллергенов для СЕМА. Поскольку белки MsrA1 и СЕМА являются искусственными рекомбинантными молекулами, содержащими 8 N- концевых аминокислот цекропина А насекомых и 18 С-концевых аминокислот мелиттина пчел, то такое сходство было очевидным.

По литературным данным антимикробные пептиды цекропин-меллитинового типа легко денатурируют при нагревании, в кислой среде желудка, быстро перевариваются желудочным соком. Пептиды, попадая в чистом виде в кровь, являются безопасными для млекопитающих и человека (литературные данные Досье). По литературным данным Досье белковый продукт селективного гена *nptIII* имеет историю безопасного использования по отношению к здоровью человека и животных.

Заявителем были проведены исследования влияния диеты, содержащей трансгенный картофель заявляемых форм, на эмбриональное и постэмбриональное развитие, которые не выявили достоверных различий по

сравнению с диетой, содержащей нетрансгенный картофель, и диетой без картофеля.

Вероятность возникновения неблагоприятного последствия при выращивании на территории опытного поля - маловероятно. Оценка последствия – незначительное, общий риск – незначительный.

Общий риск при коммерческом использовании в пищевых целях и кормления животных – неопределенный. Поскольку, несмотря на то что, синтетические катионные антимикробные пептиды в основном избирательно действуют на прокариотическую мембрану, отличая ее от эукариотической, существует вероятность их воздействия на эукариотические организмы. Поскольку заявители предполагают использовать трансгенный картофель для продовольственных и кормовых целей, то в формах трансгенных растений, которые планируется использовать для выпуска в окружающую среду в коммерческих целях, необходимо с помощью соответствующих методов определить копийность встроенных целевых генов, их уровень экспрессии, с помощью статистически подтвержденных данных установить, есть ли зависимость накопления конечного продукта от копийности вставки целевых генов. Также в ходе полевых испытаний необходимо определить характер наследования трансгенов и число копий встроенных генов у потомства. В соответствии с принципом предосторожности, необходимо проведение дальнейших долгосрочных токсикологических исследований по изучению воздействия трансгенного картофеля на эмбриональное и постэмбриональное развитие лабораторных животных, а также проведение аллергологических тестов по установленным в Республике Беларусь Инструкциям [2].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. В результате проведенной государственной экспертизы безопасности трансгенных форм картофеля со встроенными последовательностями генов, кодирующими пептиды цекропин-мелиттинового типа, и геном *npt II*, определяющим устойчивость к антибиотику канамицин, выводы которой основываются на результате анализа данных Досье, представленных Заявителем (Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси), Эксперт считает, что риск высвобождения заявляемых трансгенных форм картофеля 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 низким.

2. Заявителем разработаны меры мониторинга при выращивании трансгенных форм на территории опытного поля, меры по регулированию рисков, меры очистки территории опытного поля по окончании вегетационного периода, являющиеся эффективными для преодоления долгосрочного неблагоприятного воздействия. Экспертом даны рекомендации о том, что по завершении вегетационного периода наземная часть растений должна быть уничтожена путем сжигания в крематоре.

3. Экспертом даны рекомендации о проведении экологических экспериментов в условиях опытного поля, соответствующего требованиям безопасности, которые могут проводиться параллельно с полевыми испытаниями.

4. Представленные Заявителем формы картофеля со встроенными последовательностями генов, кодирующих пептиды цекропин-мелиттинового типа, и геном *npt II*, **могут быть выпущены 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. Метод мониторинга форм – ПЦР к последовательностям целевого и селективного генов.

РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Рекомендуется во время полевых испытаний на опытном поле, соответствующем требованиям безопасности, провести оценку всхожести, урожайности, интенсивности цветения, ягодообразования, завязываемости семян трансгенных форм по сравнению с контролем (родительскими сортами Ветразь, Одиссей, Скарб), переноса трансгена контрольным немодифицированным сортам картофеля (сорта Ветразь, Одиссей, Скарб), совместно выращиваемым на опытном поле, оценить вероятность перезимовки оставленных в почве клубней, семян для оценки их конкурентоспособности и разработки дальнейших мер по регулированию потенциальных рисков в случае последующего коммерческого использования картофеля.

2. В ходе полевых испытаний необходимо определить характер наследования трансгенов и число копий встроенных генов у потомства. Для линий, отобранных на основании анализа трансгенных форм, рекомендовано с помощью соответствующих методов определить копийность встроенных целевых генов, уровень их экспрессии, с помощью статистически подтвержденных данных установить, есть ли зависимость накопления конечного продукта от копийности вставки целевых генов.

3. При возможном дальнейшем коммерческом выращивании на вероятность передачи трансгена будет влиять степень контроля за полнотой сборки урожая и уничтожение семян вместе с вегетативной массой в процессе уборки. Для предотвращения переноса пыльцы от трансгенного картофеля к нетрансгенному посредством насекомых при дальнейшем коммерческом использовании в качестве изолирующего фактора может

применяться его возделывание от нетрансгенного на расстоянии 150-200 м. и отсутствие ульев поблизости от полей, на которых возделывается картофель.

4. В соответствии с принципом предосторожности, необходимо проведение дальнейших долгосрочных токсикологических исследований по изучению воздействия трансгенного картофеля на эмбриональное и постэмбриональное развитие лабораторных животных, а также проведение аллергологических тестов по установленным в Республике Беларусь Инструкциям.

ВЫВОДЫ

1. В результате проведенной государственной экспертизы безопасности заявляемых трансгенных форм картофеля, выводы которой основываются на результате анализа данных Досье, представленных Заявителем, Эксперт считает, что риск высвобождения заявляемых трансгенных форм картофеля 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 низким.

2. Формы трансгенного картофеля Ветразь Z, Одиссей С1, С2, С3, Скарб CL1 и CL2 со встроенными генами цекропин-мелиттинового типа и геном *nptII* могут быть высвобождены для проведения испытаний на территории опытного поля, соответствующего требованиям безопасности к опытным полям и другим объектам, предназначенным для проведения испытаний непатогенных генно-инженерных организмов.

3. Высвобождение растений трансгенного картофеля для проведения испытаний на территории опытного поля может быть проведено без искусственной изоляции растений.

4. По завершении вегетационного периода наземная часть растений должна быть уничтожена путем сжигания в крематоре.

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. 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.
4. Consensus document on the biology of *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* (potato). Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 8. – Режим доступа: <http://www.oecd.org/science/biotrack/46815598.pdf>
5. 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>.
6. Механизм посредничества по биобезопасности. База данных: ЖИО, гены и организмы – Режим доступа: <https://bch.cbd.int/database/organisms/>.
7. Постановления Министерства природных ресурсов и охраны окружающей среды Республики Беларусь «О требованиях безопасности к

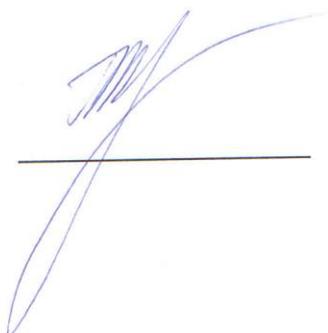
опытным полям и другим объектам, предназначенным для проведения испытаний непатогенных генно-инженерных организмов при их первом высвобождении в окружающую среду» от 29 августа 2006 г. №56 // Национальный реестр правовых актов Республики Беларусь. – 2006. – № 151. – Рег. № 8/14993.

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



Лемеш В.А.

Руководитель Национального
координационного центра
биобезопасности, к.б.н.



Мозгова Г.В.