

Подано заявление
на проведение государственной экспертизы
безопасности генно-инженерных организмов

Заявитель УО «Белорусский государственный университет»
220030 г. Минск, пр-т Независимости, 4, тел./факс: (+375 17) 226-59-40,
e-mail: bsu@bsu.by

Цель проведения экспертизы – получение разрешения об
высвобождении в контролируемых условиях (специально оборудованном
полигоне) линии трансгенного рапса, полученной в результате проведения
научных исследований.

1. *Информация о биологических особенностях реципиентного
организма:*

1.1. *Полное название:*

Отдел - *Magnoliophyta*

Класс - *Dicotyledones*

Порядок - *Capparales*

Семейство - *Brassicaceae*

Род - *Brassica*

Вид - *Napus*

Сорт - Прамень

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

Таблица1 Морфологические признаки ярового рапса

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

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

1.2. информация, касающаяся особенностей размножения:

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

1.3. выживаемость в окружающей среде:

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

1.4. рассеивание:

Рапс размножается семенами. См. раздел 1.3.

1.5. географическое распространение:

Возделывается рапс с 16 века в Англии. С 1836 года известен на Западной Украине. Рапс *Brassica napus* L. var. *oleifera* DC. возделывается более чем в 50 странах мира, основные посевные площади сосредоточены в Китае, Канаде, Индии, Германии, Франции.

Мировой сбор семян этой культуры в 2013 году составил более 62,5 млн. тонн (FAO), по количеству производимого растительного масла рапсу принадлежит третье место в мире после сои и хлопчатника.

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

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

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

Одной из важных проблем культивирования рапса, как и многих других с./х. культур, является зарастание его сорняками.

В условиях Республики Беларусь наибольшую опасность для растений рапса представляют такие заболевания как черная пятнистость, или альтернариоз, серая и белая гнили, а также фомоз.

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

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

Продукты, жмых и шрот, получаемые из семян рапса после экстракции масла, используются как богатый белком корм для животных в натуральном виде и для приготовления комбикормов.

Растения рапса широко используются также в виде зеленой массы для скармливания всем с./х. животным.

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

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

2. Информация о биологических особенностях донора:

2.1. полное название:

Домен: Бактерии

Тип: Протеобактерии

Класс: Гамма-протеобактерии

Порядок: *Enterobacteriales*

Семейство: *Enterobacteriaceae*

Род: *Dickeya*

Вид: *dadantii*

Штамм: ENA49

2.2 происхождение организма-донора:

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

2.3 биологические характеристики организма-донора:

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

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

3. Биологические особенности вектора:

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

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

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

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

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

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

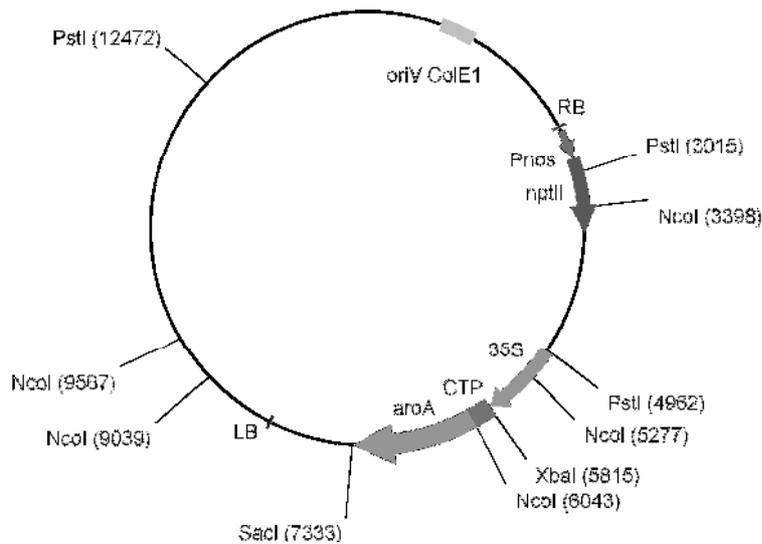


Рисунок 1 – Генетическая карта бинарного вектора с геном *aroA* для агробактериальной трансформации растений

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

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

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

Векторная ДНК активна только в клетках *Agrobacterium tumefaciens*.

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

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

Сконструированный вектор был введен при помощи электропорации в штамм *Agrobacterium tumefaciens* GV3101. Для проведения процедуры получали электрокомпетентные клетки. Ночную культуру бактерий разводили в соотношении 1:25 свежим LB-бульоном и культивировали в условиях аэрации (180 об/мин) при 28 °С (до достижения культурой оптической плотности ОП₆₀₀ = 0,4-0,6. Культуру клеток переносили в центрифужные пробирки и охлаждали на ледяной бане в течение 15 мин.

Клетки осаждали центрифугированием (3 мин, 6000 об/мин, 0- 4 °С). Осадок бактерий ресуспендировали в половине исходного объема дистиллированной воды, охлажденной до 0- 4 °С, клетки осаждали центрифугированием (3 мин, 6000 об/мин, 0- 4 °С). Процедуру отмывания клеток повторяли дважды, в каждом последующем случае вдвое уменьшая объем воды. Клетки ресуспендировали в примерно равном объеме осадка количестве охлажденной воды (0-4 °С) и немедленно приступали к электропорации на приборе Multipurpose Electroporation System (Hibrid Cellject Pro, Великобритания). При работе использовали электропорационные кюветы с расстоянием между электродами 1 или 2 мм. К суспензии компетентных клеток в объеме 20 мкл (при использовании 1 мм кюветы) или 40 мкл (при использовании 2 мм кюветы) добавляли раствор ДНК в дистиллированной воде, перемешивали. Смесь вносили в предварительно охлажденную (0 - 4 °С) кювету, которую помещали в электропоратор и подавали импульс тока с соответствующим кювете напряжением - 2500 В для 2 мм кюветы и 1700 В для 1 мм кюветы (параметры конденсатора – 25 мкФ, шунтирующий резистор 200 Ом). После подачи импульса кювету извлекали и добавляли к клеткам 1 мл LB-бульона, содержащего 0,2 % глюкозу. Клетки инкубировали в течение часа при соответствующей температуре, после чего высевали на селективные среды.

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

Проросткам наносили поранения двух типов: порез лезвием в область семядольного узла глубиной 2-3 мм, а также прокол металлической иглой диаметром 150 микрон в область семядольного узла (2-3 поперечных прокола) и в область апикальной меристемы (2-3 вертикальных прокола в район схождения петиолей) глубиной 1-2 мм в зависимости от размеров проростка. Поранение иглой проводили под увеличительным стеклом диаметром 160 мм и 4-х кратным увеличением. Затем пораненное растение опускали семядольными листочками на 1-15 минут в агробактериальную суспензию. После агробактеризации проростков их подсушивали на фильтровальной бумаге, отмывали в воде и высаживали в растильню с искусственной ионообменной почвой «Биона 112» по 45-50 штук в растильню. Агробактеризованные проростки выдерживали сутки в темноте, в термостате при 28 °С, после чего их культивировали в световой комнате в

контролируемых условиях (24 °С, Д/Н=16/8 часов) для послераневой адаптации. Через 7-10 дней растения высаживали в сосуды с почвой и продолжали культивировать в теплице. В сосуд высаживали по 50-52 растения. Отбор трансгенных вариантов, а также выявление биологического эффекта трансгенов проводили путем опрыскивания 0,1 % раствором глифосатсодержащего гербицида «Шквал». Первая обработка осуществлялась в фазе 4-5 настоящих листьев, последующие две - с интервалом 10-15 дней.

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

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

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

В результате секвенирования установлена полная нуклеотидная последовательность гена *aroA* штамма *D. dadantii* ENA49, которая отличается от таковой, имеющейся в базе данных, штамма *D. dadantii* 3937 (GenBank:NC_014500) (рис. 2).

ATGGAGGAATCCCTGACCCTACAACCGATTTCATTGATTAACGGCACGATCAATCTGCCGGGTTCCAAAAGTGTTCCTCAA 80
 C
 M E E S L T L Q P I S L I N G T I N L P G S K S V S N
 Q
 CCGTGCGTTGTTGCTGGCGGCATTGGCAAGAGGCACCACTCGCTGACCAACCTGCTGGACAGCGACGATGTCCGTCATA 160
 R A L L L A A L A R G T T R L T N L L D S D D V R H
 TGCTCAATGCGCTGAGCGCGCTGGGTGTTGAATATCGCTGTGCGACAGCCGACAGAGTGGCAAATCGTCGGGGTGGGG 240
 M L N A L S A L G V E Y R L S D S R T E C E I V G V G
 G
 GCGCATTAACGGCGTCTACGCCGTTGGAACGTGTTTTAGGGAATGCCGGGACGGCGATGCGCCCGCTGGCCGCCGCGCT 320
 G A L T A S T P L E L F L G N A G T A M R P L A A A L
 TGCCCTGACTGATGGCGATATCGTGTGACCGGCGAACCGGTATGAAAGAACGTCCGATTGGTCATCTGGTGGATGCGT 400
 C L T D G D I V L T G E P R M K E R P I G H L V D A
 H
 TGCGGCAGGGGGCGCGCGTATCGACTATCTGGAGCAGGAAAATTATCCGCCGTTGCGCCTGCAAGGGGGCTTTACAGGT 480
 L R Q G G A R I D Y L E Q E N Y P P L R L Q G G F T G
 GGAGATATCAGTGTAGACGGTTCGGTATCCAGCCAGTTTCTCACTGCGCTGCTAATGACGGCGCCGCTGGCTGTGCAGGA 560
 G D I S V D G S V S S Q F L T A L L M T A P L A V Q D
 D
 TACGCGCATCAGCATTAAAGCGATCTGGTTTCCAAACCTTATATCGACATCACCTGCATATGATGAAACCTTCGGCA 640
 T R I S I K G D L V S K P Y I D I T L H M M E T F G
 TCACGGTGATCAATAACGATTACCAGACTTTCGTGGTGC CGGTAATCAGCATTATCAGTCGCTGGGCACTATCTGGTG 720
 I T V I N N D Y Q T F V V A G N Q H Y Q S P G H Y L V
 GAGGGCGACGCTCGTCCGCATCTTATTTCTGGCGGACGGCTATTCCGGGGGGGACGGTACGTGTGACCGCGTCGG 800
 E G D A S S A S Y F L A A A A I R G G T V R V T G V G
 G
 CCGCATAGCGTGCAGGGCGATAACCGTTTCGCCGACGTGCTGGAGAAAATGGGCGCGGAGATCCGCTGGGGTGACGACT 880
 T
 R H S V Q G D I R F A D V L E K M G A E I R W G D D
 R
 ATATCGAATGTCAGCGCGTAATCTCCACGCCATCGATATGGACATGAACCATATCCCCGACGCGGCAATGACCATCGCC 960
 Y I E C Q R G N L H A I D M D M N H I P D A A M T I A
 A
 ACTGCCGCGCTGTTGCGGAAGGTGGGACGACGACGCTGCGTAACATCTATAACTGGCGCGTAAAGAAACCGATCGTCT 1040
 T A A L F A E G G T T T L R N I Y N W R V K E T D R L
 A
 R
 GGCAGCTATGGCGACGGAAGTGCGAAGGTGCGGCCGAGGTGGAAGAAGGGTATGATTACATCCGATTACGCCGCCAA 1120
 A A M A T E L R K V G A E V E E G Y D Y I R I T P P
 H
 CGCAGCTGAAAGCCGCTGAAATCGGCACTTACAATGACCACCGTATGGCGATGTGCTTCTCGCTGGTGGCGTTGTCTGAC 1200
 T Q L K A A E I G T Y N D H R M A M C F S L V A L S D
 ACGCCGGTACCATCTCGACCCTAAATGTACCGCCAAAACGTTCCCGGATTACTTCCTGCAACTGGAGCGTCTGAGTCA 1280
 T P V T I L D P K C T A K T F P D Y F L Q L E R L S Q
 GCACGGCTGA 1300
 H G *

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Методом ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) геномной ДНК трансгенных растений установлено, что в заявляемой трансгенной линии целевой ген интегрирован в хромосому.

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 встроенного целевого гена *aroA* проводились методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Этот метод характеризуется 100 % специфичностью (отсутствие перекрестных реакций с неспецифическими ДНК при концентрации до 1×10^6 геномных эквивалентов /мл) и высокой чувствительностью (не менее 1×10^4 геномных эквивалентов/мл). С использованием специфических праймеров выявляется наличие конкретной последовательности нуклеиновой кислоты.

Объем смеси для амплификации одного образца составлял 25 мкл; состав реагентов: 100-200 нг ДНК, 2,5 мкл 10X буфера с NH_4SO_4 фирмы «Fermentas», 2,5 мкл 10 ммоль/л смеси нуклеотидов (dNTP) «Fermentas», 2 мкл 25 ммоль/л MgCl_2 «Fermentas», 2,5 мкл 2 пмоль/мкл каждого из праймеров, 0,2 мкл 0,5 единиц Taq ДНК-полимеразы «Fermentas», 10,7 мкл H_2O . Для идентификации присутствия гена *aroA* использовали пару праймеров, амплифицирующих фрагмент размером 654 п.н. ПЦР проводили в амплификаторе «BioRad» с использованием следующего режима термоциклирования: денатурация – 94 °C 5 мин; 40 циклов: 94 °C 15 с, 62 °C 15 с, 72 °C 50 с; ренатурация – 72 °C 4 мин; 4 °C – до изъятия проб.

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

5.1. *описание генетических признаков или фенотипических характеристик, в особенности новых признаков и характеристик, которые стали проявляться или перестали проявляться у генно-инженерных организмов по сравнению с реципиентным организмом:*

В генетическом отношении заявляемая трансгенная линия отличается от реципиентного организма по наличию в геноме гена *aroA* бактерий штамма *Dickeya dadantii* ENA49, который кодирует фермент 5-енол-пирувилшикимат-3-фосфат синтазу. Экспрессия данного гена приводит к синтезу в растительном организме бактериального фермента, который обладает высокой каталитической активностью, участвуя в предпоследней реакции шикиматного пути синтеза ароматических аминокислот, и низкой

толерантностью к гербициду глифосату, что обуславливает устойчивость трансгенных растений рапса к гербициду.

Каких-либо морфологических видоизменений у трансгенной линии не наблюдается.

5.2. генетическая стабильность генно-инженерных организмов:

Получены трансформанты поколения T₀, которые характеризуются наличием трансгена в хромосомной ДНК и его экспрессией. 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 [6].

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

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

Мишенью действия гербицида глифосата является растительный фермент 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат синтаза (EPSPS). Данный фермент, кодируемый в ядре, но локализованный в хлоропластах растений, катализирует предпоследнюю реакцию шикиматного пути и необходим для синтеза ароматических аминокислот [7]. EPSPS катализирует перенос енолпирувильного остатка с фосфоенолпирувата (PEP) на 5-гидроксильный остаток шикимат-3-фосфата (S3P), при этом образуется 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат (EPSP) и неорганический фосфат (Pi) [1, 2]. Экспрессия бактериального мутантного трансгена *aroA* в растениях обеспечивает их резистентность к гербициду.

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

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

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

На основании данных о нуклеотидной и соответствующей аминокислотной последовательности продуктов экспрессии трансгенных вставок заявляемой линии рапса проведен поиск возможных аналогов изучаемых генов, относящихся к аллергенам или токсинам. В результате анализа, проведенного с помощью поисковых систем Allermatch и PepBank, не выявлено сходство с известными аллергенными белками продуктов экспрессии как целевого, так и селективного гена.

Таким образом, в результате проведенных исследований по первичной оценке биобезопасности трансгенных форм рапса показано, что молекулярно-генетические характеристики продуктов встроенных генов определяют их как не представляющие опасности для здоровья человека и животных.

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

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

6. Информация о потенциальной принимающей среде:

6.1. местоположение участка, где будет осуществляться высвобождение:

Высвобождение будет осуществляться на специально подготовленном участке (далее – полигоне) на Биологической опытной станции Института генетики и цитологии НАН Беларуси, расположенной в Академгородке Академии наук (г. Минск, ул. Ф. Скорины, 34, 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:*

Участок площадью 2200 кв. м расположен на территории опытного поля Биологической опытной станции Института генетики и цитологии НАН Беларуси. Почва дерново-подзолистая супесчаная, подстилаемая песком, плодородная, окультуренная. Участок огорожен забором (сетка-рабица) высотой 200 см, имеет запираемые ворота. Участок оборудован камерами слежения и находится под визуальным контролем вахтера Биологической опытной станции. Рядом с участком расположен домик для персонала и хранения инструментов.

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

Место предполагаемого высвобождения заявляемой трансгенной линии рапса представляет собой отведённый участок земли на экспериментальном поле ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси», на котором выращиваются пшеница, ячмень, подсолнечник и картофель. Таким образом, участок земли для испытаний существенно не отличается от среды обитания культивируемого в республике рапса.

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

Подготовка участка для посадки и технология выращивания заявляемой трансгенной линии рапса 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:*

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

Интенсивность цветения, число завязываемых стручков на центральной кисти, масса 1000 семян и другие морфометрические показатели, определяющие общую продуктивность растений, будут изучаться в полевых условиях при высвобождении трансгенной линии в окружающую среду по отношению к контрольным растениям сорта Прамень.

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

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

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

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

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

Вероятность проявления нежелательных свойств и признаков у трансформантов рапса несущественная.

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

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

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

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

Рапс относится к семейству крестоцветных и является факультативным самоопылителем. Доля перекрестного опыления у ярового рапса составляет 2-5%, у озимой формы – до 30%. В перекрестном опылении участвуют насекомые-опылители, в частности, пчелы (*Apis mellifera*) и шмели (*Bombus* sp.). Для исключения доли перекрестного опыления производится искусственная изоляция центральной кисти или всего растения, а также территориальная изоляция – 2,5 км до ближайших посевов рапса.

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

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

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

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

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

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

См. раздел 7.7, 7.8.

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

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

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

Созданная трансгенная линия рапса отличается от реципиентного рапса наличием в геноме мутантного гена *aroA* бактерий *Dickeya dadantii*, кодирующего измененный фермент 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат синтазу, который обуславливает устойчивость растений к гербициду глифосату, и гена *nptII*, обеспечивающего устойчивость к антибиотику канамицину. По всем другим биологическим свойствам и признакам трансформанты не отличаются от реципиентного рапса, следовательно, трансгенный рапс может использоваться также как обычный рапс для пищевых и кормовых целей.

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

8.1. *информация о высвобождении генно-инженерных организмов*

Целью посадки созданной трансгенной линии рапса на специальном полигоне является получение растений, стабильно наследующих признак резистентности к действию гербицида глифосата.

Для посадки растений участок будет вспахан и заборонован как обычно. Посадка будет производиться вручную рядами. Расстояние между рядами - 0,7 м, между растениями в ряду - 0,35 м. Через 7 дней после посадки будет проведено довсходовое культивирование растений. Будет высажена одна трансгенная линия. Посадка будет осуществляться в оптимальные для посадки рапса сроки, т.е. в начале мая 2015 года.

Поблизости от участка никаких диких и культурных родственных видов, способных к гибридизации с трансгенным рапсом, нет.

Высвобождение генно-инженерных организмов в окружающую среду предполагается произвести впервые в Республике Беларусь.

8.2. *методы мониторинга*

В течение и по окончании вегетационного периода будут проводиться анализы по выявлению трансгена в растениях, стабильности инкорпорации трансгена в геноме растений, определение предельно допустимых концентраций глифосатсодержащих гербицидов, применяемых для обработки трансформантов.

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 ГИО:

Для предотвращения рассеивания пыльцы и семян будет применена искусственная изоляция соцветий, а также территориальная изоляция в виде 2,5 км от ближайших посевов рапса. 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 Биологической опытной станции. Территория полигона будет находиться под круглосуточным контролем камер слежения и звуковой сигнализации. Таким образом, территория полигона будет охраняться от проникновения животных и посторонних лиц.

8.4. очистка территории:

По завершении вегетационного периода вся надземная часть и корневая система растений будут захораниваться в 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 ГИО.

Использование специального закрытого полигона для выращивания и испытания трансгенных растений с соответствующей системой безопасности, а также биологические особенности выращивания и размножения рапса не предполагают непредвиденного распространения трансформантов. В случае, если все-таки произойдет несанкционированный вынос семян трансгенной линии посторонними лицами, это не должно иметь неблагоприятных последствий, так как имеющиеся данные указывают на безопасность заявляемой трансгенной линии для здоровья человека и окружающей среды.