

УТВЕРЖДАЮ

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



Е.А. Сычева

(М.П.) 29 » апреля 2015 г.

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

### **1. Общие положения**

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

**Заказчик** – ГУО «Белорусский государственный университет»

**Исполнитель** – Министерство природных ресурсов и охраны окружающей среды Республики Беларусь

**Цель экспертизы** – получение разрешения на высвобождение непатогенного генно-инженерного организма (трансгенной линии рапса) в окружающую среду для испытаний в условиях опытного поля, соответствующего требованиям биобезопасности.

**Объект экспертизы** – трансгенная линия рапса со встроенной последовательностью гена *aroA*, обеспечивающей устойчивость к гербициду глифосат.

**Основание для проведения экспертизы** – договор № 4 от 9 марта 2015 г.

Исполнителем, 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 «Руководства по оценке рисков в отношении живых измененных организмов» (Guidance on Risk Assessment of Living Modified Organisms) ВСН (Механизм посредничества по биобезопасности) [2], «Инструкции о порядке проведения оценки риска возможных вредных воздействий генно-инженерных организмов на здоровье человека» Республики Беларусь [3], методических рекомендаций «Оценка рисков воздействия ГМО на сохранение и устойчивое использование биологического разнообразия, с учетом рисков для здоровья человека» [4], консенсусного документа OECD (Организация экономического сотрудничества и развития) по биологии рода *Brassica* [5], данных ВСН [6], данных ISAAA (Международной службы по сбору агроботехнологических разработок) [7].

## **2. Методология проведения оценки рисков трансгенной линии рапса со встроенной последовательностью гена *aroA*.**

Проведение оценки рисков трансгенной линии рапса со встроенной последовательностью гена *aroA*, обеспечивающей устойчивость к гербициду глифосат, 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 трансгенной линии рапса проводилось в контексте рисков, вызываемых немодифицированным реципиентом (рапс *Brassica napus* L., сорт Прамень). При этом принималась во внимание цель высвобождения – экспериментальные исследования в условиях специально оборудованного для проведения испытаний поля [8], масштаб высвобождения (ограниченные полевые испытания), принимающая среда первого высвобождения.

Методология оценки риска [4] 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 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 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.

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, касающаяся особенностей вектора, встраиваемых последовательностей, особенностей организма-реципиента (*Brassica napus L.*), ГМО, проведен сравнительный анализ генотипических и фенотипических характеристик ГМО и организма-реципиента (*Brassica napus L.*), 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 реципиентным организмом (сортом Прамень)), 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 трансгенной линии.

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 генетически модифицированным растением (ГМР). Оценка совокупного риска дана с использованием следующих терминов «высокий», «средний», «неопасный», «минимальный» 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 [3].

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

**3.1. Информация, имеющая существенное отношение к оценке риска.**

Информация пп. 3.2 - 3.5, дается в соответствии с консенсусным документом OECD по биологии рода *Brassica* [5], информация пп. 3.6 - 3.12 дается по данным Досье и баз данных BCH [6] и ISAAA [7].

**3.2. Характеристика организма – реципиента.**

Рапс (*Brassica napus* L.) – культурно возделываемое растение. В кариотипе *B. napus* 38 хромосом ( $n = 19$ , геном AACС). Обычно рапс рассматривается как аллотетраплоид ( $n=10A+9C$ ), то есть организм, возникший в результате межвидовой гибридизации и имеющий два диплоидных набора хромосом. Предположительно рапс возник в результате скрещивания капусты полевой (сурепицы) *Brassica campestris* ( $n = 10$ , геном AA) с капустой огородной *Brassica oleracea* ( $n = 9$ , геном CC) и последующего удвоения числа хромосом. Ортологичные хромосомы несколько отличаются друг от друга, поэтому геном рапса может быть описан формулой  $A1...A10+C1...C9$ . Большинство хозяйственно-ценных признаков контролируются совместно двумя и более генами геномов А- и С- и имеют сложную природу наследования [9].

В качестве реципиента использован сорт ярового рапса белорусской селекции Прамень. Хозяйственно-биологическая характеристика сорта Прамень (данные госсортоиспытания) [10]: сорт среднеранний, содержание эруковой кислоты в масле 0,36%, глюкозинолатов 1,09%. За годы испытания средняя урожайность составила 22,7 ц/га. Максимальная урожайность 31,3 ц/га получена на ГСХУ «Мозырская СС» в 2006 году. Вегетационный период на уровне контрольного сорта. Масса 1000 семян в среднем составляет 3,9 г.

Содержание жира семенах 41,7%. Белка в шроте содержится 23,6%. Сбор белка 5,1 ц/га. Содержание ненасыщенных жирных кислот: олеиновой - 64,2%, линолевой - 18,7%, линоленовой - 8,3%. Устойчив к полеганию.

### **3.3. Система опыления. Векторы переноса пыльцы. Способность к переопылению различных форм рапса.**

Рапс – факультативный самоопылитель. Барьеров для скрещивания между растущими рядом различными формами рапса нет. Частота переопыления – 5-30%. Перенос пыльцы осуществляется ветром, насекомыми (пчелами и шмелями). Ветер приводит к основному оттоку пыльцы с полей, дальность переноса зависит от скорости ветра. Перемещение пыльцы можно экспериментально установить с использованием приборов - пыльцеуловителей, а также с использованием растений-приманок (растения с мужской стерильностью или кастрированные). Использование таких подходов позволяет в дальнейшем установить частоту перекрестного опыления и вероятность переноса гена или последовательности. По данным консенсусного документа OECD, такие исследования были, например, проведены с использованием маркерных генов, определяющих проявление признака «устойчивость к гербицидам».

Были проведены многочисленные эксперименты для установления частоты переопыления между двумя популяциями *B. napus* с использованием различных расстояний между донором пыльцы и реципиентом. Исследования Lavigne et al. (1998) показали, что основная масса пыльцы распространяется менее чем на 10 м от поля рапса; при этом примерно половина пыльцы выпадает на землю в радиусе 3 м. По данным Timmons et al. (1995), Thompson et al. (1999) на расстоянии 360 и 400 м от границы поля количество пыльцы было на 90 и 95% соответственно меньше, чем непосредственно рядом с полем. Результаты моделирования исследований по перемещению пыльцы в совокупности с экспериментальными данными перекрестного опыления показали, что количество переносимой пыльцы резко снижается с расстоянием, однако существует вероятность

перекрестного опыления на дальних дистанциях (Thompson et al., 1999). При этом данные исследований показывают, что на расстоянии 50-100 м от источника пыльцы процент перекрестного опыления был менее 0,5%, 200 м – менее 0,1%. Однако, Thimmons и др. (1995), используя ловушки для пыльцы и кастрированные «растения-приманки» с удаленными пыльниками, сообщают о наличии пыльцы в воздухе на расстоянии до 2,5 км от коммерческих посадок *B. napus*. При этом «растения-приманки» давали семена на этом расстоянии, что указывает на то, что пыльца, находящаяся в воздухе, может успешно оплодотворять растения.

Частота перекрестного опыления, по данным консенсусного документа OECD [5], варьирует в зависимости от близости расположения полей рапса, масштаба возделывания, условий произрастания растений, топографии местности, синхронности цветения донора и реципиента, скорости ветра, активности насекомых-опылителей, используемых генотипов. Высока вероятность переопыления близкорасположенных полей рапса, на одном из которых возделываются гибридные популяции, поскольку до 75% на таком поле могут занимать мужские стерильные линии.

Вклад пчел в распространение пыльцы сильно варьирует в зависимости от области возделывания культуры и условий окружающей среды. При возделывании на больших территориях (более 60 га, например - Канада, Австралия, Индия) основным вектором переноса рассматривается ветер, в Европейских странах, где возделывание рапса не такое экстенсивное, насекомые-опылители многочисленны и играют важную роль в распространении пыльцы, особенно на большие расстояния. С не модифицированным источником пыльцы на расстоянии 500 м от улья пчел и полем с ГМ-растениями, находящемся на расстоянии 80 м от того же улья, Ramsay et al. (1999) выявил перенос нескольких пыльцевых зерен с ГМ-поля на не ГМ-поле. Было сделано предположение, что пыльца долго сохранялась на пчелах либо произошло смешивание пыльцы в улье. В этом же исследовании установлено, что пчелы могут перемещаться на расстояние до

2 км от ульев, указывая на потенциальное перемещение пыльцы на площади 4 км в диаметре вокруг улья. Установленный максимум - 4 км соответствует 4 км максимуму расстояния, на которое может переноситься ветром пыльца (модель переноса ветром Timmons et al., 1996).

В исследованиях Sheffler et al. (1993) при установке ульев по центру участка площадью в 1 га, засаженного нетрансгенными растениями *B. napus* с 9-метровым кругом из трансгенных растений в центре участка, показано, что частота перекрестного опыления составила - от 1,5% на расстоянии 1 м до 0,00033% на расстоянии 47 м. При дальнейшем исследовании на участках земли размером 20X20 м, засаженных трансгенными и нетрансгенными растениями, которые были разделены границами размером 200 и 400 м, представляющими собой участок не засеянной земли, либо участок, засаженный ячменем, Sheffler (1995) определил, что средняя частота гибридизации составляет 0,0156% на расстоянии 200 м и 0,0038% на расстоянии 400 м.

Ряд моделей был предложен для предсказания уровня потока генов между полями рапса [5]. Вместе с тем, следует отметить, что на вероятность переноса генов воздействует целый ряд абиотических и биотических факторов. Кроме того, предложенные модели в основном учитывают такие факторы, как расстояние, на которое происходит перенос пыльцы, и вероятность попадания пыльцы на пестик, не принимая во внимание происходит ли гибридизация и далее интрогрессия трансгена в растение-реципиент. Поэтому модели позволяют произвести только приблизительные вычисления.

#### **3.4. Размножение рапса. Сорный потенциал.**

Размножение рапса происходит семенами. Как известно, семена способны переноситься ветром, водой, птицами, человеком. Расстояние, на которое переносятся семена, зависит от их размера и скорости ветра.

В процессе культивирования и сбора урожая некоторые семена могут попадать в почву, формировать «банк семян», и, оставаясь там до

следующего сезона, начинать прорастать до или после посева последующей культуры. При выращивании культур плохое хозяйство, неравномерность созревания семян, недостаточная устойчивость к растрескиванию стручка может привести к тому, что большое количество семян *V. napus* не будет собрано. На выживаемость и устойчивость семян в растительном покрове значительно влияет окружающая среда, период покоя, а также установившиеся практики земледелия и управления сельскохозяйственными культурами. В местах с плотной посадкой культур это, в частности, может привести к проблемам самосева сорняков в последующих культурах и ухудшению качества семян новых культур рапса, возделываемых на этом же поле. В некоторых случаях самосевные растения могут составлять значительную конкуренцию засеянной культуре и ухудшать качество ее урожая. В таких случаях их необходимо устранять химическим и/или механическим способом. Вместе с тем, всхожесть семян снижается во время хранения, и этот показатель является важным фактором при определении возможности появления самосевных растений в культурах рапса, высаживаемых в последующие годы на данном поле.

Основное регулирование риска сохранения «банка семян» и появления самосевных растений – правильная обработка земель после культивирования, агротехнические мероприятия, направленные на уничтожение «банка семян», удаление самосевок из севооборота, чередование сельскохозяйственных культур в севообороте. Кроме того, целесообразно использовать сорта, не способные переходить к состоянию вторичного покоя, что необходимо экспериментально установить до высева сорта. Также по данным [5] экспериментально установлено, что в том случае, если послеуборочная обработка земель, содержащих пожнивные остатки, откладывается на несколько недель после уборки и контролируется уничтожение самосевок, к 4 году рост самосевок из «банка семян» снижается по меньшей мере на 90%. При нарушении рекомендаций «банк семян» может сохраняться на протяжении ряда лет.

Рапс является культурным растением, но при отсутствии надлежащих мер по уборке и транспортировке может встречаться в одичалом состоянии как сорняк и обладает признаками сорняка [11]. Помимо вышеназванных источников распространения семян, семена могут распространяться за счет потерь при транспортировке сельскохозяйственного оборудования с поля в хранилище или с поля на поле или с грузовиков, перевозящих семена. В странах возделывания рапса, дикорастущий рапс можно встретить среди сельскохозяйственных культур на полях, в садах, на обочинах дорог и пустырях. Экспериментальные исследования установили, что около 1% семян *B. napus* могут сохранять всхожесть в течение 5-10 лет. При этом сохранение «банка семян» происходит на достаточной глубине (10 см). В Канаде Veskie et al. (2010) выявил небольшую популяцию растений-самосевов, устойчивых к гербициду бромоксинил, при этом бромоксинил-устойчивый сорт не выращивался на данном поле в течение 7 лет. Несмотря на то, что большинство семян не сохраняются в «банке семян» и уничтожаются в результате послеуборочных мероприятий, либо не переносят перезимовки, нужно учитывать возможность перехода в состояние вторичного покоя и сохранение «банка семян», что может приводить к последующему появлению самосевных растений.

### **3.5. Способность гибридизации с дикими родственными видами.**

При изучении потенциального воздействия на окружающую среду, связанного с неограниченным выпуском генетически модифицированного *B. napus*, важно понимать возможность образования гибридов при межвидовом/межродовом скрещивании сельскохозяйственной культуры и родственных видов. Рапс относится к растениям повышенного уровня риска миграции трансгена в природные популяции [5, 11]. Определяется данный факт тем, что он имеет диких родственников в регионе произрастания, например - сурепица *Brassica campestris*, горчица сарептская *Brassica juncea* и горчица черная *Brassica nigra*. Вероятность этого события не высока: возникновение межвидовых и межродовых гибридов  $F_1$  возможно, однако

эти гибриды – аллотриплоиды, и, поэтому, практически бесплодны при скрещивании между собой и дикорастущими крестоцветными.

Проведены исследования по анализу возможности передачи трансгена (и, в частности, устойчивости к гербицидам) к родственным видам *V. napus* (Chèvre et al. 1999; Daniels et al, 2005; Warwick et al., 2003, 2007). Надо отметить, что для того, чтобы передача трансгена произошла, необходимо совпадение целого ряда условий. Прежде всего, необходимо, чтобы произошло скрещивание. Однако эффективность гибридизации также зависит от целого ряда условий, которые включают близкое расположение родительских форм, перемещение пыльцы и время ее жизнеспособности, синхронность цветения, систему скрещиваний родительских форм, характеристики цветка, конкурентоспособность чужеродной пыльцы по сравнению с собственной. Даже если все эти условия, предшествующие оплодотворению, совпадают, необходимо успешное преодоление следующих барьеров: половая совместимость, дисбаланс эмбрионд-эндосперм, фертильность полученных гибридов и выживаемость в окружающей среде. Поскольку *V. napus* является тетраплоидом, он легче скрещивается с дикими видами (диплоидами) в том случае, когда дикие виды выступают в качестве материнского растения.

В том случае, если переопыление произойдет, полученное гибридное растение должно обладать достаточной приспособленностью к условиям окружающей среды для того, чтобы дать потомство, сохраняющееся в окружающей среде и способное участвовать в последующих возвратных скрещиваниях с реципиентом для формирования фертильного потомства в ряду поколений. И даже в том случае, если все условия будут соблюдены, интрогрессии трансгена в реципиентный организм не произойдет, если не произойдет конъюгация хромосом реципиента и сегмента хромосомы растения-донора, несущего трансген. Вместе с тем, предполагают, что сильный селекционный отбор в ходе многих поколений возвратных скрещиваний (что может произойти, например, при длительном

выращивании одной и той же формы рапса на одном поле, сохранении «банка семян» в результате недостаточных мероприятий по борьбе с сорными растениями) может привести к образованию стабильных форм, несущих экстра хромосомную пару (Chévre et al).

В Европейских странах установлено 14 родственных видов, которые потенциально могут скрещиваться с *B. napus* с вероятностью интрогрессии генов. Warwick et al (2009) суммировал результаты многочисленных исследований по возможности естественной гибридизации и гибридизации при использовании различных селекционных приемов, а также возможности интрогрессии гена в ходе межвидовых и межродовых скрещиваний. Вероятность гибридизации при опылении ручным способом или естественным путем в поле оценена как **высокая**: в прямом и обратном скрещивании с *B. campestris*, *B. juncea*, *B. incana*; в прямом – *B. napus* x *Raphanus raphanistrum*. При этом высокий потенциал к интрогрессии гена был отмечен только у гибридов с горчицей сарептской *B. juncea* и капустой полевой *B. campestris*.

Горчица сарептская *B. juncea* является культурно возделываемым растением, однако отмечены случаи ее распространения как сорного растения в Европе. Поскольку горчица сарептская (геном ААВВ) имеет с рапсом (геном ААСС) сходный геном А, есть вероятность интрогрессии трансгена. Warwick (2007) установил, что поток генов от рапса, устойчивого к гербицидам, к находящемуся рядом полю горчицы сарептской составляет 0,245% при непосредственном прилегании поля и 0,03, 0,021 и 0,005% при расстоянии между полями 50, 100 и 200 м. Установлено, что жизнеспособность пыльцы F1 гибридов низкая. Однако в ходе исследования была выявлено спонтанное беккроссирование и появление гибридов с восстановленной фертильностью.

Капуста полевая *B. campestris* является повсеместно распространенным сорняком. Рапс и капуста полевая легко скрещиваются между собой, поток генов между ними продемонстрирован в целом ряде исследований в Европе и

США [5]. Была установлена интрогрессия трансгенов, вызывающих устойчивость к гербицидам, от рапса к сурепице в Европе. Предполагается, что частота интрогрессии гена может быть ниже, если он расположен в С-геноме рапса, поскольку сурепица и рапс имеют общий только А-геном.

Вместе с тем, нужно сделать оговорку о том, что многие экспериментальные данные, представленные в [5], были получены путем направленной гибридизации, в том числе включавшей нескольких поколений возвратных скрещиваний. Экспериментальные данные могут в значительной мере отличаться от тех, которые можно ожидать в естественных условиях, а показатели могут быть завышенными. Поэтому в данном случае целесообразно проведение собственных исследований вновь создаваемых линий трансгенных растений.

### **3.6. Характер генетической модификации. Метод, использованный для переноса генетической конструкции. Стабильность вставки.**

Цель генетической модификации – включение в геном реципиентного организма (рапс *Brassica napus* L., сорт Прамень) и активность в нем бактериального гена *aroA*, обеспечивающего резистентность трансформированных растений к гербициду глифосату.

Полученные разработчиками генетически-модифицированные растения рапса содержат вставку чужеродной ДНК, которая включает в себя следующий генетический материал:

1. Целевой ген *aroA* (из бактерии *Dickeya dadantii*), кодирующий фермент 5-енол-пирувилшикимат-3-фосфат синтазу (EPSPS).
2. Селективный ген *nptII* *Escherichia coli*, кодирующий неомицинфосфотрансферазу II.
3. Pnos - промотор гена нопалинсинтазы *Agrobacterium tumefaciens*, обеспечивающий экспрессию селективного гена.
4. PCaMV35S - промотор 35S РНК вируса мозаики цветной капусты, обеспечивающий конститутивную экспрессию целевого гена.

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

6. последовательность СТР *Nicotiana tabacum* L, кодирующий сигнал транспорта продукта целевого гена в хлоропласт.

7. RB правый край *Agrobacterium tumefaciens*, обеспечивающий встраивание ДНК.

8. RL левый край *Agrobacterium tumefaciens*, обеспечивающий 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 гена проводилась методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

### **3.7. Способность переноса т-ДНК в другие организмы.**

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

### **3.8. Молекулярные характеристики генетически модифицированного организма, относящиеся к модификации.**

Методом ОТ-ПЦР геномной ДНК трансгенной линии было установлено, что целевой ген (*aroA*) штамма бактерии *Dickeya dadantii* ENA49 интегрирован в хромосому реципиента. Путем сайт-направленного мутагенеза в ген *aroA* введена однонуклеотидная замена, приводящая к замене аминокислоты пролин на серин с целью увеличения устойчивости EPSPS к глифосату. Полное секвенирование гена Заявителем подтвердило присутствие данной нуклеотидной замены.

Промотор 35S вируса мозаики цветной капусты обеспечивает конститутивную экспрессию целевого гена.

### **3.9. Характеристика генетически модифицированного организма.**

Морфологических изменений у трансгенных растений поколения Т<sub>0</sub> по сравнению с контрольным сортом Прамень Заявителем не выявлено.

Представленные Заявителем трансгенные линии отличаются от исходного сорта Прамень по следующим генам/ последовательностям ДНК, привнесенным в их геном в процессе агробактериальной трансформации: целевому (*aroA*), селективному (*nptII*) и СТР последовательности, кодирующей сигнал транспорта продукта гена *aroA* в хлоропласт. Таким образом, трансгенная линия отличается от немодифицированного сорта по двум новым признакам – устойчивость к гербициду глифосату, которая обусловлена экспрессией нового гена *aroA*, кодирующего фермент 5-енолпирувилшिकимат-3-фосфат синтазу (EPSPS), и устойчивость к антибиотику канамицину, которая обусловлена синтезом фермента неомицинтрансферразы. Активность гена *nptII* в растительной клетке придает ей также устойчивость к родственным канамицину антибиотикам: неомицину и гинетицину.

Целевой ген находится под контролем конститутивного промотора, следовательно, фермент EPSPS должен синтезироваться во всех частях трансгенного растения.

Следует отметить, что ранее неоднократно был получен трансгенный рапс с встроенными генами, определяющими устойчивость к глифосату, обусловленную синтезом следующих ферментов: глифосат оксидазы (*goxv* 247) и 5-енолпирувилшिकимат-3-фосфат синтазы (ген *aroA*). Во многие из данных растений для отбора трансформантов встроен ген *nptII*. Линии, устойчивые к глифосату, и допущенные к культивированию в ряде стран и для питания человека и/или животных представлены на сайте ISAAA [12] и ВСН [13].

### **3.10. Цель высвобождения.**

Высвобождение будет происходить на специальном опытном поле, соответствующем требованиям биобезопасности, установленным в

Республике Беларусь [8]. Цель высвобождения (из Досье) - размножение трансгенной формы рапса То, изучение показателей, определяющих общую продуктивность по отношению к контрольному сорту Прамень, оценка стабильности наследования трансформированной последовательности в последующих поколениях, определение предельно допустимых концентраций глифосатсодержащих гербицидов, применяемых для обработки трансформантов, экологическая экспертиза (передача трансгенов контрольным растениям, выращиваемым на полигоне). Для получения семенного потомства Заявитель предполагает искусственную изоляцию соцветий.

### **3.11. Условия принимающей среды.**

По данным Досье высвобождение будет осуществляться на опытном поле, соответствующем требованиям безопасности, расположенном на Биологической опытной станции Института генетики и цитологии НАН Беларуси. В районе расположения опытного поля и поблизости каких-либо природоохранных объектов и территорий нет. Родственных видов дикорастущих растений, произрастающих вблизи (в радиусе около 300 метров), по данным мониторинга, не выявлено [14]. В перечень видов дикорастущих растений, произрастающих в радиусе около 300 метров опытного поля (данные документов Национального координационного центра биобезопасности Республики Беларусь) вошли виды других родов семейства Крестоцветные, к которому относится рапс: Сурепка обыкновенная *Barbarea vulgaris*, Икотник серый *Berteroa incana*, Пастушья сумка *Capsella bursa-pastoris*, Резуховидник песчаный *Cardaminopsis arenosa*, Желтушник мелкоцветковый *Erysimum cheiranthoides*, Редька дикая *Raphanus raphanistrum*, Ярутка полевая *Thlaspi arvense*.

### **3.12. Предполагаемый вид использования ГМО.**

Разработчик предполагает, что трансгенная линия может быть использована в пищевых и кормовых целях.

**4. Этап 2. Оценка степени вероятности фактического возникновения 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.**

#### **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].

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.**

Таким образом, на основании листа контрольных вопросов вероятность миграции трансгена к диким родственным видам оценивается как «вероятно». В случае если существует вероятность появления устойчивых к воздействию глифосата сорных родственных видов, при последующем коммерческом выращивании трансгенных растений это может потенциально привести к необходимости смены гербицида.

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 условиях опытного поля по схеме, представленной в методических рекомендациях [4]. Во время полевого эксперимента рекомендовано проведение оценки частоты переопыления и интрогрессии гена *aroA* в дикие родственные виды, завязываемости гибридов, их выживаемости, формирование «банка семян». В случае проведения экспериментальных исследований в условиях опытного поля должен проводиться мониторинг возможности переноса встроенной последовательности диким сорным растениям на близлежащих к полю территориях методом ПЦР к гену *aroA*.

Параллельно могут быть проведены экспериментальные исследования в лабораторных условиях на возможность перезимовки семян.

Поскольку цель высвобождения трансгенной линии рапса – испытания в условиях опытного поля, соответствующего требованиям безопасности [8], получение семенного потомства по данным Заявителя будет проходить с искусственной изоляцией соцветий, в радиусе 300 м от опытного поля дикорастущих видов рода *Brassica* не выявлено, возможность распространения семян, их потерь и перезимовки, переопыления с дикорастущими видами рода *Brassica* и завязываемости семян - **низкая**. При этом необходимо отметить, что вероятность проявления преимуществ в условиях дикой среды сорных растений, полученных при гибридизации заявляемой трансгенной линии, оценивается как «маловероятно», поскольку селективных преимуществ в отсутствии фактора отбора (гербицида глифосат, применяемого на полях) у таких растений не должно быть.

В качестве очистки территории Заявителем указано, что по завершении вегетационного периода вся наземная часть и корневая система растений будет захораниваться в яме. Данный пункт следует заменить на – сожжена в крематоре.

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 **маловероятно**, а последствия в случае реализации риска – **незначительное**.

#### **4.1.2. Гипотеза. Вероятность передачи трансгенов культурным сортам рапса и последствия такой передачи.**

Рапс – факультативный самоопылитель, частота перекрестного опыления может достигать 5-30%. Факторы, влияющие на частоту переопыления, указаны в п. 3. При совместном выращивании трансгенного и нетрансгенного рапса вероятность передачи трансгенов культурным сортам оценивается, как **вероятно**, либо **высокововероятно** (в зависимости от

генотипа растений). При коммерческом возделывании необходима изоляция трансгенных и нетрансгенных культур, расстояние изоляции зависит от масштабов возделывания культур и наличия ульев с насекомыми-опылителями на прилегающих территориях, и может достигать 4 км между посевами.

Вместе с тем, Заявителем в Досье указано, что цель высвобождения трансгенной линии – экспериментальные исследования в условиях специально оборудованного опытного поля ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси». Поскольку в 2015 г. заявляется высвобождение 1 линии трансгенного рапса в условиях опытного поля, вероятность передачи трансгенов другим культурным сортам рапса (если того не требуют направленные экспериментальные исследования) при возделывании трансгенного рапса на территории полигона – **маловероятна**. Оценка последствия – **незначительное**.

В случае совместного выращивания форм рапса на территории опытных полей вероятность гибридизации высокая, поэтому если не предусмотрено условиями эксперимента, следует избегать совместного выращивания отдельных трансгенных линий рапса на территории одного опытного поля.

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 возможного дальнейшего коммерческого выращивания трансгенной линии, на возможность передачи встроенной последовательности другим выращиваемым на прилегающих полях формам рапса будет влиять изоляция посевов трансгенного и нетрансгенного рапса, отсутствие ульев на территории выращивания трансгенного рапса и прилегающих территориях, степень контроля за сроками и полнотой сбора урожая, послеуборочные мероприятия и мероприятия перед посадкой новых

форм рапса 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.

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

Рапс является культурным растением, вместе с тем, при несоблюдении сроков уборки, потерь при транспортировке может произрастать как сорное растение. Обладает свойствами сорного растения [11]. Однако, вероятность того, что введенный ген, определяющий устойчивость к гербициду глифосат, будет повышать преимущество трансгенной линии по сравнению с нетрансгенной при случайном выбросе трансгенной линии в окружающую среду и влиять на сокращение биологического разнообразия в результате вытеснения местных сортов **маловероятно**, поскольку в данных условиях будет отсутствовать селективный фактор отбора (гербицид глифосат).

Вероятность риска: **маловероятно**, оценка последствий: **незначительно**.

**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 Прамень последовательность *aroA*, кодирующую фермент 5- енолпирувилшикимат-3-фосфат синтазу, определяющую устойчивость к гербициду глифосат, и селективный ген *nptII*, кодирующий неомисинфосфотрансферазу II, необходимый для отбора трансформированных растений. Действие продуктов трансгенной линии не направлено на организмы-мишени, организмов немишеней нет.

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

**На основании данных оценки вероятности отдельных возможных экологических рисков, суммарный экологический риск при выращивании трансгенной линии рапса, со встроенной последовательностью гена *aroA*, обеспечивающей устойчивость к глифосату, на территории опытного поля оценен, как неопасный. В случае проведения экспериментальных исследований без искусственной изоляции соцветий рекомендуемый метод регулирования – мониторинг с использованием ПЦР к последовательности гена *aroA*.**

#### **4.2. Оценка риска здоровью человека.**

**Гипотеза. Трансгенный рапс при использовании в пищу оказывает токсическое и аллергенное влияние на организм человека.**

Заявителем был проведен поиск возможной гомологии продуктов встроенных последовательностей генов (*aroA* и *nptII*), и известных аллергенов и токсинов. В результате анализа аллергенности, проведенного с помощью поисковых систем Allermatch и PepBank, и токсичности, проведенного с помощью поисковой системы Toxin Target Database (T3DB), не выявлено сходство с известными аллергенами и токсинами продукта экспрессии целевого гена.

Следует отметить, что ряд ранее разработанных аналогов данной трансгенной линии со встроенным геном *aroA* и *nptIII*, имеют историю употребления в пищу и/или используются для кормления животных в ряде стран (США, Канада, Австралия, Япония, Мексика, Южная Корея, Новая Зеландия, Европейский Союз) [15]. При выпуске таких растений проводилась оценка по общепринятым мировым стандартам: сравнение трансгенных растений с не трансгенным аналогом (родительским организмом) по ключевым питательным веществам и подавителям метаболизма, устанавливалась гомология (отсутствие гомологии) с известными токсинами и аллергенами, стабильность к обработке протеолитическими ферментами в условиях *in vitro* для установления длительности сохранения трансгенного белка в желудочно-кишечном тракте, исследования на животных [16].

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

В том случае, если Заявитель предполагает в дальнейшем использовать трансгенную линию рапса для продовольственных и кормовых целей, в следующих поколениях необходимо определить копийность встроенных генов и уровень их экспрессии (что по данным Досье и предполагает проводить Заявитель), а также стабильность наследования вставки. Перед выпуском в окружающую среду либо на рынок нового сорта рекомендуется провести сравнение трансгенных растений с не трансгенным аналогом (сортом Прамень) по ключевым питательным веществам и подавителям метаболизма для установления следующего: не происходит ли превышение их содержания (например, эруковой кислоты и глюкозинолатов) у трансгенного сорта по сравнению с немодифицированным контролем (сорт Прамень). Необходимо провести аллергологические и токсикологические тесты по установленным в Республике Беларусь Инструкциям [3].

**4. Этап 4. Оценка совокупного риска, вызываемого ГМО, на основе оценки вероятности возникновения и последствий каждого 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.**

Суммарный экологический риск и риск для здоровья человека при выращивании для исследований заявленной трансгенной линии на территории опытного поля, соответствующего требованиям безопасности [8], оценивается как **неопасный**. 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 рапса со встроенной последовательностью гена *aroA*, обеспечивающей устойчивость к гербициду глифосат, выводы которой основываются на результате анализа данных Досье, представленных Заявителем (ГУО «Белорусский государственный университет»), Эксперт (ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси») считает, что риск высвобождения заявляемой трансгенной линии рапса 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 [8], является **неопасным**.

2. Заявителем (ГУО «Белорусский государственный университет») разработаны меры 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. Экспертом (ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси») даются рекомендации о том, что по завершении вегетационного периода наземная часть растений должна быть уничтожена путем сжигания в крематоре.

3. Экспертом даются рекомендации о проведении экологических экспериментов в условиях опытного поля, соответствующего требованиям безопасности, а также рекомендации по проведению лабораторных исследований на способность к переходу семян в состояние вторичного покоя и возможность перезимовки, которые могут проводиться параллельно с полевыми испытаниями. В случае проведения экспериментальных исследований в условиях опытного поля должен проводиться мониторинг возможности передачи встроенной последовательности формам рапса и

диким родственным видам методом полимеразной цепной реакции к целевому гену (последовательность гена *aroA*).

4. Представленная Заявителем трансгенная линия рапса со встроенной последовательностью гена *aroA*, обеспечивающей устойчивость к гербициду глифосат, **может быть выпущена 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.**

## 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. 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>.
3. 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.
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. Consensus document on the biology of the *Brassica* crops (*Brassica* spp.) Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 54. – Режим доступа: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=en/jm/mono\(2012\)41&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=en/jm/mono(2012)41&doclanguage=en).
6. Механизм посредничества по биобезопасности. – Режим доступа: <http://bch.cbd.int/>.
7. Международная служба по сбору агробιοтехнологических разработок. - Режим доступа: <http://www.isaaa.org/>.

8. 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.

9. Лемеш В.А., Пилюк Я.Э., Грушецкая З.Е., Мозгова Г.В., Бакановская А.В., Пикун О.А., Хотылева Л.В. Идентификация геном-специфических ДНК-маркеров для оценки генетического полиморфизма рапса (*Brassica napus* L.) в целях создания сортов пищевого назначения / Генетические основы селекции растений. Т.4: Биотехнология в селекции растений. Геномика и генетическая инженерия: колл. монография. – Мн.: Беларуская навука, 2014 - с. 146-166.

10. Хозяйственно-биологическая характеристика сорта ярового рапса Прамень. – режим доступа <http://sorttest.by/d/306784/d/raps-yarovoy.pdf>.

11. 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/Bio\(Tech-Saf-Eth\).pdf](http://biosafety.org.by/sites/default/files/downloads/Publications/Bio(Tech-Saf-Eth).pdf). – Дата доступа: 04.11.2013.

12. Данные Международной службы по сбору агrobiотехнологических разработок об одобренных к выпуску в окружающую среду и/или для употребления в пищу/ кормления животных устойчивых к гербицидам линий рапса. - Режим доступа: <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/advsearch/default.asp?CropID=2&TraitTypeID=1&DeveloperID=Any&CountryID=Any&ApprovalTypeID=Any>.

13. Данные по одобренным заявкам и категориям выпуска Механизма посредничества по биобезопасности. Организм – *Brassica napus*. – Режим доступа: <http://bch.cbd.int/database/results?searchid=631185>.

14. Сводная таблица количества видов в семействах дикорастущих растений, произрастающих вблизи (по периметру 300 метров) опытного поля Института генетики и цитологии за 2011-2014 гг. - Режим доступа: <http://biosafety.org.by/node/27755>.

15. Данные Международной службы по сбору агробιοтехнологических разработок об одобренных к выпуску в окружающую среду и/или для употребления в пищу/ кормления животных устойчивых к гербициду глифосат линий рапса. - Режим доступа: (<http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/advsearch/default.asp?CropID=2&TraitTypeID=1&DeveloperID=Any&CountryID=Any&ApprovalTypeID=1>)

16. Данные исследований безопасности ГМР, устойчивых к гербициду глифосат, человеку и животным. - Режим доступа: <http://www.inspection.gc.ca/plants/plants-with-novel-traits/approved-under-review/decision-documents/dd-201290/eng/1369340657511/1369340712069#a14>.

Заведующая лабораторией  
генетической и клеточной инженерии  
к.б.н., доцент

 В.А. Лемеш

вед.н.с. лаборатории генетической и  
клеточной инженерии, к.б.н.

 Г.В. Мозгова