

УТВЕРЖДАЮ

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

_____ Е.А. Сычева
(М.П.) _____ 2016 г.



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

1. Общие положения

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

Заказчик – РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук по земледелию»

Исполнитель – Министерство природных ресурсов и охраны окружающей среды Республики Беларусь

Цель экспертизы – получение разрешения на высвобождение непатогенного генно-инженерного организма трансгенной формы рапса с геном куриного альфа-интерферона в окружающую среду для испытаний в условиях опытного поля, соответствующего требованиям биобезопасности.

Объект экспертизы – трансгенная форма рапса с геном куриного альфа-интерферона.

Основание для проведения экспертизы – договор № 6 от 11 декабря 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 «Инструкции о порядке проведения оценки риска возможных вредных воздействий генно-инженерных организмов на здоровье человека» [2], методических рекомендаций [3, 4], консенсусного документа Организации экономического сотрудничества и развития по биологии рода *Brassica* [5], данных Механизма посредничества по биобезопасности ВСН [6], данных ISAAA (Международной службы по сбору агроботехнологических разработок) [7].

2. Методология проведения оценки рисков трансгенной линии рапса.

Оценка рисков трансгенной линии рапса со встроенной последовательностью, кодирующей первичную структуру белка куриного альфа-интерферона, маркерный ген для селективного отбора трансформированных растений *bar*, кодирующий фермент фосфинотрицинацетилтрансферазу и лидерную последовательность вируса мозаики табака, увеличивающую экспрессию целевого гена, 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 и потенциальная принимающая среда последующих высвобождений.

Методология оценки риска [4] включала:

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

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

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

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

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

- особенности ГМР по сравнению с реципиентным организмом (сорт 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 ГМР;

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

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

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

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

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

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

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

Этап 4. Дана качественная оценка совокупного риска, вызываемого ГМР [3, 4]. Оценка совокупного риска дана с использованием следующих

терминов «высокий», «средний», «неопасный», «минимальный» или «неопределенный» (вследствие отсутствия ясности относительно уровня риска или недостаточности знаний).

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

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

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

3.1. Информация, имеющая существенное отношение к оценке риска.

Информация пп. 3.2 - 3.5. дается в соответствии с консенсусным документом Организации экономического сотрудничества и развития по биологии рода *Brassica* [5], информации Досье и баз данных ВСН [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 *AACC*). Большинство хозяйственно-ценных признаков контролируются совместно двумя и более генами геномов А (геном капусты полевой *Brassica campestris*) и С (геном капусты огородной *Brassica oleracea*) и имеют сложную природу наследования [9].

В качестве реципиента использован сорт ярового рапса белорусской селекции Прамень. Хозяйственно-биологическая характеристика сорта Прамень (на основании данных Заявителя): сорт характеризуется как среднеспелый с урожайностью 27,1 ц/га. Семена содержат 40,9% масла, 0,83% эруковой кислоты и менее 1% глюкозинолатов. Сорт характеризуется устойчивостью к болезням и осыпанию. Адаптирован к климатическим условиям Беларуси и отличается высокой продуктивностью; районирован по всем областям Республики Беларусь и широко используется для производства маслосемян и белкового шрота.

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 составляет 5-30%. Перенос пыльцы осуществляется ветром, насекомыми (пчелами и шмелями). Ветер приводит к основному оттоку пыльцы с полей, дальность переноса зависит от скорости ветра.

Частота перекрестного опыления, по данным консенсусного документа Организации экономического сотрудничества и развития [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.

Эксперименты для установления частоты переопыления между двумя популяциями *B. napus* с использованием различных расстояний между донором пыльцы и реципиентом 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 [5]. Результаты модельных 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. Данные исследований, проведенных различными исследовательскими группами [5] 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 рапса [5]. При этом «растения-приманки» давали семена на этом расстоянии, что указывает на то, что пыльца, находящаяся в воздухе, может успешно оплодотворять растения.

Вклад пчел в распространение пыльцы сильно варьирует в зависимости от области возделывания культуры и условий окружающей среды [5]. 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. 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) [5].

3.4. Размножение рапса. Сорный потенциал.

Размножение рапса происходит семенами. 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. Количество семян попавших в «банк семян» будет зависеть от устойчивости к растрескиванию стручка и осыпанию, а также от продуктивности растения. При этом необходимо учитывать, что семена рапса могут сохранять всхожесть в течение 5-6 лет. При выращивании культур плохое хозяйствование, неравномерность созревания семян, недостаточная устойчивость к растрескиванию стручка может привести к тому, что большое

количество семян рапса не будет собрано. На выживаемость и устойчивость семян в растительном покрове значительно влияет окружающая среда, период покоя, а также установившиеся практики земледелия и севооборота. В местах с плотной посадкой культур это 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. 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 самосево из севооборота, чередование сельскохозяйственных культур в севообороте. 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 самосево, к 4 году рост самосево 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 [10]. Помимо вышеназванных источников распространения семян, семена могут распространяться за счет потерь при транспортировке сельскохозяйственного оборудования с поля в хранилище, 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).

Таким образом, 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. Эти факторы следует принимать во внимание и чередовать выращивание неродственных рапсу культур после выращивания трансгенного рапса, не допускать выращивание нетрансгенных форм рапса после трансгенного рапса в течение указанного выше промежутка времени, в целях избежания переноса трансгенов от растений, сохранившихся в «банке семян» и засорения районированных сортов, либо обеспечить при возделывании нетрансгенных форм рапса на поле после трансгенного рапса контроль таких полей и полное устранение химическим и/или механическим способом самосевных растений.

3.5. Способность гибридизации с дикими родственными видами.

Рапс относится к растениям повышенного уровня риска миграции трансгена в природные популяции [5, 11], поскольку он имеет диких сородичей в регионе произрастания, например – капуста полевая *Brassica campestris*, горчица сарептская *Brassica juncea* и горчица черная *Brassica nigra*. Вероятность этого события не высока: возникновение межвидовых и межродовых гибридов F_1 возможно, но эти гибриды – аллотриплоиды, и, поэтому, практически бесплодны при скрещивании между собой и дикорастущими крестоцветными [5].

Для того чтобы передача трансгена произошла, необходимо совпадение целого ряда условий. Прежде всего, необходимо, чтобы произошло

скрещивание. 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 рапс 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 мероприятиями по борьбе с сорными растениями) может привести к образованию стабильных форм, несущих эктра хромосомную пару [5].

В Европейских странах установлено 14 родственных видов, которые потенциально могут скрещиваться с *B. napus* с вероятностью интрогрессии генов. 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 было 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.

Однако, нужно учитывать, 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 необходимо проведение собственных исследований по оценке вероятности переноса трансгенов от вновь создаваемых линий трансгенных растений к диким родственным видам.

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

Цель генетической модификации – включение в геном реципиентного организма (рапс, сорт Прамень) и активность в нем гена, кодирующего куриный альфа-интерферон, гена *bar*, а также нетранслируемой последовательности, увеличивающей экспрессию целевого гена (куриного альфа-интерферона).

Полученная разработчиками генетически модифицированная форма рапса содержит вставку чужеродной ДНК, которая включает в себя следующий генетический материал:

1. Целевой ген, выделенный из генома курицы домашней *Gallus gallus*, кодирующий первичную структуру белка куриного альфа-интерферона.

2. Селективный ген *bar* бактерии *Streptomyces hydroscopicus*, встроенный для отбора трансгенных форм с использованием гербицидов Баста и Биалафос. Данная последовательность кодирует фермент фосфинотрицинацетилтрансферазу (PAT) и элиминирует гербицидную активность глюфосината путем ацетилирования.

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

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

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

6. Лидерная последовательность вируса мозаики табака, обеспечивающая синтез нетранслируемой последовательности мРНК и увеличивающую экспрессию целевого гена – энхансер.

7. Правая граница T-области плазмиды pTiT37 *Agrobacterium tumefaciens*, обеспечивающая встраивание ДНК.

8. Левая граница T-области плазмиды pTiT37 *Agrobacterium tumefaciens*, обеспечивающая встраивание ДНК.

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

Метод переноса генетической конструкции – агробактериальная трансформация.

Обнаружение и идентификация встроенного целевого и селективного генов проводилась Заявителем методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием трех пар праймеров.

3.7. Способность переноса т-ДНК в другие организмы.

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

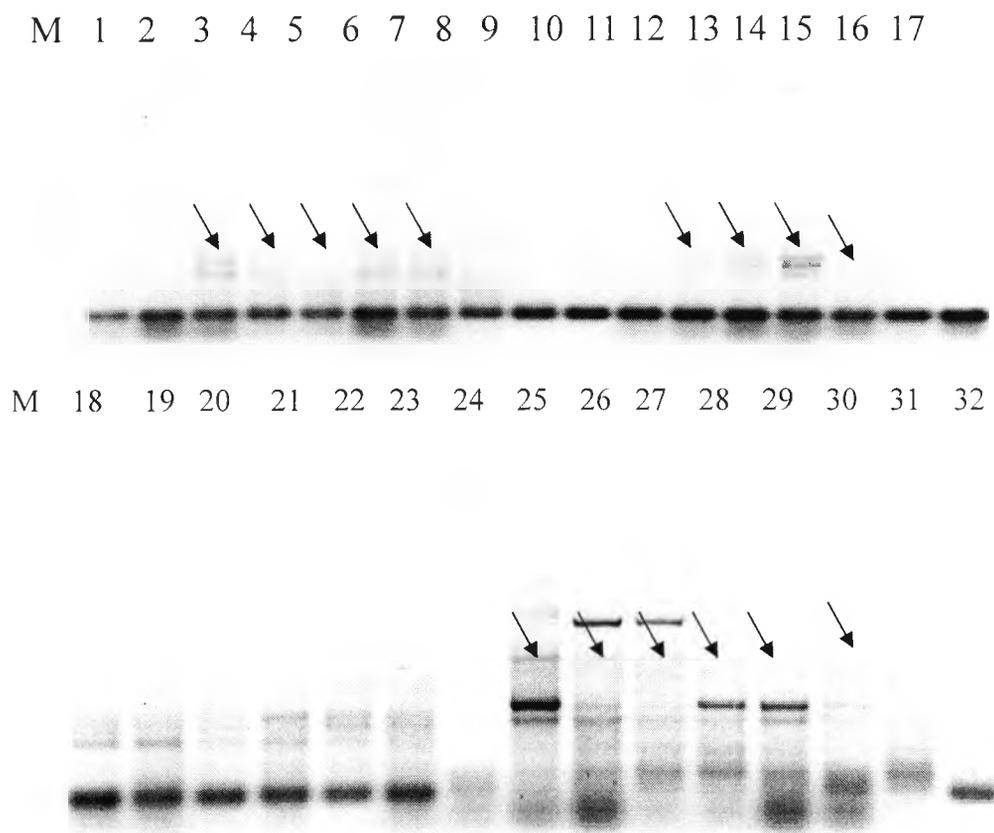
3.8. Молекулярные характеристики генетически модифицированного организма, относящиеся к модификации.

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

Заявителем подтверждено наличие последовательностей целевого и маркерного генов в геноме трансформированных растений поколений T0 и T1. Заявителем указано, что стабильность инкорпорации, количество копий встроенной последовательности и уровни экспрессии в последующих поколениях будут выявлены в дальнейшей работе.

Проведенная в лаборатории генетической и клеточной инженерии идентификация целевого и селективного генов в предоставленном Заявителем материале (Акт о передаче семенного материала рапса с геном куриного альфа-интерферона от 11.12.2015 г.) по протоколу ПЦР,

представленному в Досье, с использованием пар праймеров Ch-IF4S/Ch-IF4A, Bar1S/Bar1A позволила идентифицировать заявляемые последовательности в материале. Вместе с тем, данные последовательности идентифицировались не во всем выборочно взятом материале, сигналы могли быть слабыми, либо праймеры могли отжигаться в нескольких участках генома (рисунок 1).



М – маркер молекулярного веса 100 пн (ОДО «Праймтех»),
 1-23 – индивидуальные растения трансгенного рапса, анализируемые на наличие гена *bar*, 25-32 - индивидуальные растения трансгенного рапса, анализируемые на наличие гена куриного альфа-интерферона, 24 – контроль (сорт Прамень)

Рисунок 1 – Электрофореграмма продуктов амплификации индивидуальных трансгенных растений рапса с праймерами Bar1S/Bar1A, Ch-IF4S/Ch-IF4A.

Идентификация последовательностей Заявителем проводилась с использованием 3 пар праймеров для каждого из генов, а также предложен

метод «гнездовой ПЦР» с целью увеличения специфичности и чувствительности для слабых ПЦР-сигналов.

Эксперты указывают на то, что в случае выпуска нового сорта применение такого метода может быть дорогостоящим и неэффективным, и необходима разработка методики ПЦР для мониторинга сорта в случае его выпуска.

3.9. Характеристика генетически модифицированного организма.

Представленная Заявителем трансгенная форма отличается от исходного сорта Прамень по следующим генам/ последовательностям ДНК, привнесенным в их геном в процессе агробактериальной трансформации: целевому гену, кодирующему куриный альфа-интерферон, селективному (*bar*) и лидерной последовательности вируса мозаики табака, увеличивающей экспрессию целевого гена. В следствие этого трансгенная форма отличается от немодифицированного сорта по двум новым признакам – синтез куриного альфа-интерферона и синтез фосфинотрицинацетилтрансферазы для селективного отбора трансформантов.

Куриный альфа-интерферон проявляет антивирусную, иммуномодулирующую и пролиферативную активности при взаимодействии со специфическими клеточными рецепторами. Эффективен в борьбе с вирусом птичьего гриппа, вирусом псевдочумы птиц, вирусом инфекционного бурсита, вирусом инфекционного бронхита птиц, вирусом болезни Марека, вирусом саркомы Рауса. При таком способе получения растений сложные и энергоемкие биотехнологические процессы, организуемые на биофабриках с целью получения куриного альфа-интерферона в качестве кормовой добавки, заменяются простым сельскохозяйственным производством, когда на полях выращиваются генетически модифицированные растения, накапливающие в клетках и тканях целевой продукт, в данном случае - куриный интерферон.

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

Поскольку целевой и маркерный ген находятся под контролем конститутивного промотора, следовательно, продукты генов должны синтезироваться во всех частях трансформированных растений.

Трансгенные линии рапса, устойчивые к глюфосинату, и допущенные к культивированию в ряде стран и для питания человека и/или животных представлены на сайте ISAAA [11].

Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей, проведенный заявителем, показал, что белок куриного альфа-интерферона имеет низкую степень гомологии (примерно 24-28%) с альфа-интерфероном человека. Сравнение аминокислотных последовательностей куриного альфа-интерферона с последовательностями известных токсинов и аллергенов с помощью баз данных Allermatch и PepBank показало, что целевой белок обладает определенной степенью аллергенности и несет антигенные детерминанты.

3.10. Цель высвобождения.

Цель высвобождения (из Досье) – получение растений, стабильно наследующих трансгенные признаки: накопление внутриклеточного белка куриного альфа-интерферона и устойчивость к гербициду Баста и его аналогам.

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 [12]. 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*, Жерушник болотный *Rorippa palustris* (L.) Bess, Ярутка полевая *Thlaspi arvense* L., Башенница гладкая *Turritis glabra* L. [12], не относящиеся к растениям с высоким потенциалом интрогрессии трансгена [5].

3.12. Методы мониторинга.

Для получения семенного потомства Заявитель предполагает искусственную изоляцию соцветий. Мониторинг переноса трансгенов – метод ПЦР.

3.13. Предполагаемый вид использования ГМР.

Разработчик предполагает использовать трансгенные растения на птицефабриках в виде кормовой добавки, состоящей из растительных тканей и плодов, в лечебных (борьба с вирусными инфекциями) и профилактических (повышение иммунитета) 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] (приложение 1).

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

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

Поскольку цель высвобождения трансгенной формы 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*, относящихся к растениям с высоким потенциалом интрогрессии трансгена, 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 формы и передаче гена *bar*, оценивается как «маловероятно», поскольку селективных преимуществ в отсутствии фактора отбора (гербицида глюфосинат аммония, 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.

Яровой рапс – факультативный самоопылитель, частота перекрестного опыления может достигать 3-5%. 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 **высоковероятно** (в зависимости от генотипа растений и факторов окружающей среды).

При совместном возделывании с другими сортами рапса, например, при совместном проведении испытаний на территории опытного поля либо на селекционных станциях в случае одобрения нового сорта, вероятность оценивается, как **высоковероятно**. 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 либо совместного выращивания с другими формами рапса в условиях селекционного питомника. При сортоиспытании и коммерческом возделывании необходима изоляция трансгенных и нетрансгенных культур, расстояние изоляции зависит от масштабов возделывания культур и наличия ульев с насекомыми-опылителями на прилегающих территориях, и может достигать 4 км между посевами. Кроме того, необходимо соблюдение мероприятий для предотвращения сохранения «банка семян».

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

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 формы, 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, проводимые 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.

В целом, необходимо отметить, что существует высокий риск переопыления с другими сортами рапса при совместном возделывании культур на полях либо недостаточной удаленности сортов либо гибридов друг от друга.

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 [5, 12]. Однако, вероятность того, что встроенный ген куриного альфа-интерферона и ген *bar*, определяющий устойчивость к гербицидам, содержащим глифосинат аммония, будут повышать преимущество трансгенной формы по сравнению с нетрансгенной при ее случайном выбросе в окружающую среду и влиять на сокращение биологического разнообразия в результате вытеснения местных сортов **маловероятна**, поскольку в данных условиях будет отсутствовать селективный фактор отбора (гербицид глифосинат аммония), куриный альфа-интерферон не придает трансгенному растению селективных преимуществ. Вместе с тем, выращивание совместно с другими местными сортами, недостаточное удаление от местных сортов и неправильное хозяйствование, которое может привести к сохранению «банка семян» могут

привести к переопылению с местными сортами и переносу конструкции в данные сорта.

Вероятность риска при выращивании на территории опытного поля: **маловероятно**, оценка последствий: **незначительно**.

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

Заявляемая трансгенная форма несет по сравнению с не модифицированным сортом Прамень последовательность, кодирующую куриный альфа-интерферон и ген *bar*, определяющий устойчивость к гербициду глюфосинат аммония. Действие продуктов трансгенной формы не направлено на организмы-мишени, организмов не мишеней нет.

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

На основании данных оценки вероятности отдельных возможных экологических рисков, суммарный экологический риск при выращивании трансгенной формы рапса со встроенными последовательностями гена куриного альфа-интерферона и гена *bar*, обеспечивающего устойчивость к гербицидам, содержащим глюфосинат аммония, на территории опытного поля при искусственной изоляции соцветий оценен, как *неопасный*. В случае проведения экспериментальных исследований без искусственной изоляции соцветий рекомендуемый метод регулирования – мониторинг с использованием ПЦР к последовательностям целевого и маркерного генов.

4.2. Оценка риска здоровью человека.

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

С использованием поисковых систем Allermatch и PepBank заявителем был проведен поиск возможной гомологии продуктов встроенных последовательностей генов (гена куриного альфа-интерферона и гена *bar*), и

известных аллергенов и токсинов. В результате анализа аллергенности, выявлено, что куриный альфа-интерферон обладает определенной степенью аллергенности и несет аллергенные детерминанты.

Следует отметить, что ранее разрабатывались трансгенные растения, несущие ген *bar*. После прохождения экологической экспертизы и оценки рисков здоровью человека такие растения были одобрены для выпуска на рынок [11]. 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.

Поскольку куриный альфа-интерферон потенциально может вызывать аллергенные реакции, ген синтеза находится под контролем конститутивного промотора и, следовательно, может синтезироваться во всех частях растения, в том числе в пыльце, существует неопределенность в оценке риска и необходимо более тщательное изучение аллергенности по установленным в Республике Беларусь стандартам [2]. Необходимо будет определить копийность встроенных генов и уровень экспрессии куриного альфа интерферона.

Вероятность возникновения неблагоприятного последствия при выращивании на территории опытного поля, соответствующего требованиям биобезопасности оценивается, как вероятно. При искусственной изоляции соцветий - маловероятно. Оценка последствия – среднее, общий риск – средний.

Перед выпуском в окружающую среду без искусственной изоляции соцветий либо на рынок нового сорта необходимо провести сравнение трансгенных растений с нетрансгенным аналогом (сортом Прамень) по

ключевым питательным веществам и ингибиторам метаболизма для установления следующего: не происходит ли превышение их содержания у трансгенного сорта по сравнению с немодифицированным контролем (сорт Прамень). Необходимо обязательно подтвердить стабильность вставки, число копий и безопасные уровни накопления конечного продукта – куриного альфа-интерферона в трансгенных растениях. Необходимо провести аллергологические и токсикологические тесты по установленным в Республике Беларусь Инструкциям [2]. В случае выращивания таких растений необходимо соблюдение достаточных изолирующих расстояний до посадок других сортов или гибридов рапса и мероприятия по недопущению формирования «банка семян» для того, чтобы не произошло переопыление и засорение районированных сортов рапса.

4. Этап 5. Оценка совокупного риска, вызываемого ГМР, на основе оценки вероятности возникновения и последствий каждого выявленного неблагоприятного воздействия. Этап 5. Вынесение рекомендации относительно того, являются ли риски приемлемыми или 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 формы рапса на территории опытного поля, соответствующего требованиям безопасности [8], оценивается как **средний**. Рекомендуемый метод регулирования при испытаниях в условиях опытного поля, соответствующего требованиям безопасности – искусственная изоляция соцветий. При оценке без искусственной изоляции соцветий – использовать мониторинг (метод ПЦР к целевому и селективному генам). Заявителю дан ряд рекомендаций по проведению оценки экологического риска и риска здоровью человека при анализе последующих поколений и при (п. 4.1.1,

4.1.2, 4.2). Даны настоятельные рекомендации в случае возможного коммерческого выращивания (п. 4.1.2, 4.2).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. В результате проведенной государственной экспертизы безопасности трансгенной формы рапса со встроенными последовательностями гена, кодирующего куриный альфа-интерферон; гена *bar*, обеспечивающего устойчивость к гербицидам, содержащим модифицированный фосфинотрицин аммония (глюфосинат аммония); нетранслируемой последовательностью, увеличивающей экспрессию целевого гена, выводы которой основываются на результате анализа данных Досье, представленных Заявителем (РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию»), Эксперт считает, что риск высвобождения заявляемой трансгенной формы 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 **средним**.

2. Заявителем разработаны меры мониторинга при выращивании трансгенной формы 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 выращивание трансгенной формы рапса на территории опытного поля возможно только при искусственной изоляции соцветий; 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, 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 (этап 5). В случае проведения экспериментальных исследований в условиях опытного поля должен проводиться мониторинг возможности передачи целевого гена, кодирующего куриный альфа-интерферон и маркерного гена *bar* формам рапса и диким родственным видам методом полимеразной цепной реакции к целевому и маркерному генам.

4. Экспертом даны рекомендации о необходимости разработки более чувствительного ПЦР-метода для детекции целевого и маркерного генов с целью их последующего мониторинга в случае коммерческого использования после прохождения экологической, медико-биологической экспертиз, а также госсортоиспытания нового сорта.

4. Представленная Заявителем трансгенная форма рапса со встроенной последовательностью гена, кодирующего куриный альфа-интерферон, гена *bar*, обеспечивающего устойчивость к гербицидам, содержащим модифицированный фосфинотрицин аммония (глюфосинат аммония), а также нетранслируемой последовательностью, увеличивающей экспрессию целевого гена, **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 при условии соблюдения искусственной изоляции соцветий.** В ходе испытаний должна быть проведена соответствующая экологическая экспертиза, указанная в этапе 5. Метод мониторинга – ПЦР к последовательностям целевого и селективного генов.

До выпуска на рынок нового сорта на основе трансгенной формы рапса должна быть определена копийность целевого и селективного генов и уровни

их экспрессии в заявляемом сорте, проведена медико-биологическая экспертиза по установленным в Республике Беларусь стандартам [2], а также разработан чувствительный ПЦР метод для мониторинга.

Список литературы

1. Постановление Совета Министров Республики Беларусь «Об утверждении Положений о порядке проведения государственной экспертизы безопасности генно-инженерных организмов и примерных условиях договоров, заключаемых для ее проведения, и выдачи разрешений на высвобождение непатогенных генно-инженерных организмов в окружающую среду для проведения испытаний» от 8 сентября 2006 г. № 1160 // Национальный реестр правовых актов Республики Беларусь. – 2006 – № 151. – Рег. № 5/22922.

2. Порядок проведения оценки риска возможных вредных воздействий генно-инженерных организмов на здоровье человека: Инструкция по применению / В.Г.Цыганков [и др.] // Утверждена Министерством здравоохранения Республики Беларусь 25 августа 2006. – Регистрационный №076-0806. – Минск, 2006. – 15 с.

3. Руководство по оценке рисков в отношении живых измененных организмов» // Электронный ресурс. Режим доступа: <http://www.cbd.int/doc/meetings/bs/mop-06/official/mop-06-13-add1-ru.pdf>.

4. Мозгова Г.В. Оценка рисков воздействия ГМО на сохранение и устойчивое использование биологического разнообразия, с учетом рисков для здоровья человека: методические рекомендации. Мн: Право и экономика, 2014, 58с.

5. 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=env/jm/mono\(2012\)41&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/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.

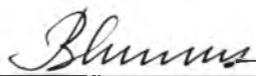
10. Биотехнология. Биобезопасность. Биоэтика / А. П. Ермишин [и др.]. – Минск: Тэхналогія, 2005. – 430 с. [Электронный ресурс] / Национальный координационный центр биобезопасности. – 2005. – Режим доступа: [http://biosafety.org.by/sites/default/files/downloads/Publications/Bio\(Tech-Saf-Eth\).pdf](http://biosafety.org.by/sites/default/files/downloads/Publication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

11. Данные Международной службы по сбору агробιοтехнологических 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>.

12. Сводная таблица количества видов в семействах дикорастущих растений, произрастающих вблизи (по периметру 300 м) опытного поля

Института генетики и цитологии за 2011-2015 гг. – Режим доступа:
<http://biosafety.org.by/node/27755>.

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


_____ В.А. Лемеш

Ведущий научный сотрудник
лаборатории генетической и клеточной
инженерии, к.б.н.


_____ Г.В. Мозгова

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

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 родственными видами 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 родственные виды 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.