

#### Институт генетики и цитологии НАН Беларуси

# Исследования по трансгенезу в Беларуси. Перспективы развития Международного исследовательского центра безопасности генной инженерии

Докладчик: директор ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси» Лемеш Валентина Александровна

Семинар для экспертов Республики Беларусь, обеспечивающих безопасность генно-инженерной деятельности

(в рамках подготовки Третьего Национального доклада по выполнению Картахенского протокола в Республике Беларусь, ЮНЕП-ГЭФ)

Минск, 23 декабря 2015 г.

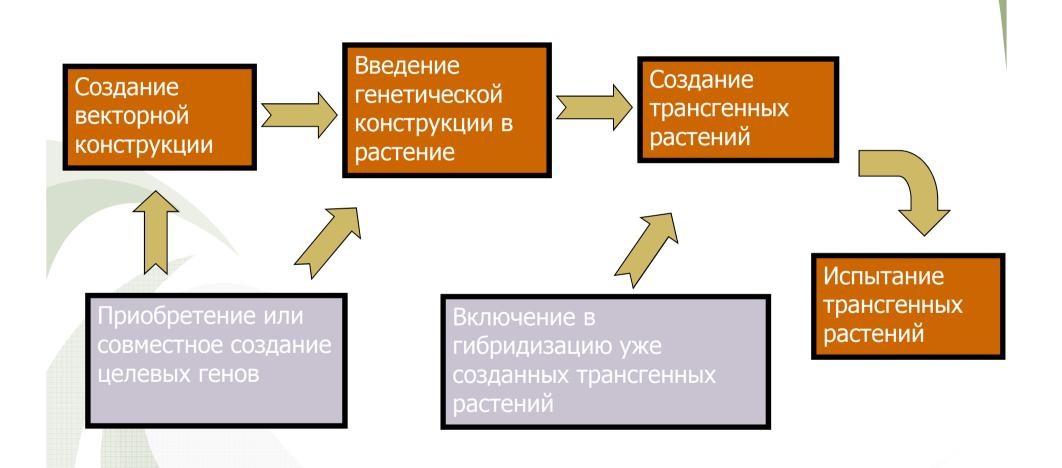
#### Направления исследований по трансгенезу в Беларуси

- **разработка проблем генетической и клеточной инженерии**
- создание новых форм растений, животных и микроорганизмов методами генетической инженерии
- изучение проблем биобезопасности.

### Направления исследований по генетической инженерии растений в Беларуси

Культура	Эффект	Организация	
Картофель	устойчивый к У-вирусу	НПЦ по картофелеводству	
Картофель	устойчивый к некоторым грибным болезням	ИГЦ НАНБ ИБКИ НАНБ	
Картофель	устойчивый к насекомым	ИГЦ НАНБ	
Картофель	синтезируется антимикробные пептиды	ИБКИ НАНБ НПЦ по картофелеводству	
Рапс	синтезируется белок куриного интерферона	БГУ ИБКИ НАНБ	
Рапс	устойчивый к глифосату	БГУ ИГЦ НАНБ	
Лен-долгунец	модифицированное строение клеточной стенки	ИГЦ НАНБ Ин-т льна, БГТУ	
Клевер луговой	повышенная урожайность	ЦБС НАНБ Ин-т экспериментальной ботаники НАНБ	
Клюква	улучшенные вкусовые качества	ЦБС НАНБ	
Табак, арабидопсис	устойчивые к тяжелым металлам и нефтепродуктам	ИГЦ НАНБ	
Табак	с ускоренным развитием и повышенной продуктивностью	ИГЦ НАНБ	

# Создание трансгенных растений



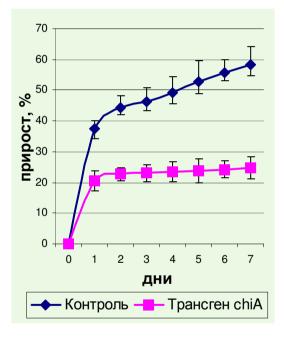
# Создание генетически модифицированных форм картофеля, устойчивых к грибным патогенам Fusarium oxysporum, Botrytis cinerea и Alternaria solani

Разработчики: ГНУ «Институт генетики и цитологии НАНБ» НПЦ НАНБ по картофелеводству

- Созданы трансгенные растения картофеля сорта белорусской селекции Дельфин с геном хитиназы (chiA) из Seratia plymitica.
- □ Оценка по комплексу хозяйственно-ценных признаков и устойчивости к фитопатогенам показала, что экспрессия фермента хитиназы в трансгенных растениях может приводить к повышению их способности ингибировать рост таких фитопатогенных грибов, как *Fusarium охуѕрогит*, *Botrytis cinerea* и *Alternaria solani*.
  - Выявлены линии картофеля с геном хитиназы, превышающие контроль более чем на 2 балла по устойчивости к парше серебристой и высокой устойчивостью к черной ножке.







Динамика прироста колоний Fusarium oxysporum в присутствии растительного сока на твердой фазе.

контроль трансгенная форма Поражение листьев картофеля патогеном Alternaria solani.

Разработана технология создания трансгенных растений, толерантных к широкому спектру тяжелых металлов и нефтепродуктам.

Созданы трансгенные растения, способные расти на почвах, загрязненных нефтепродуктами, а также содержащих высокие, превышающие ПДК в 10-30 раз концентрации металлов (меди, свинца, цинка, цезия и др.).



Контроль rhlA 800 мг Сs/кг почвы

#### Создание генетически модифицированных форм картофеля, характеризующихся повышенной устойчивостью к колорадскому жуку

Разработчик: ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»

Созданы векторы, несущие экспрессионные кассеты гена cry3aM из Bacillus thuringiensis Генетические конструкции использованы для агробактериальной трансформации листовых

дисков картофеля сорта Скарб.

□ Отбор регенерантов осуществляли при культивировании на селективной среде с канамицином.

□ Наличие встройки и экспрессии целевого гена подтверждено методами ПЦР, ОТ-ПЦР.

Транскрипционная активность выявлена у 52% образцов для конструкции со светоиндуцибельным промотором и у 60% образцов для конструкции с конститутивным 35S PHK CaMV промотором.



А - Контрольное растение на селективной среде Б - Контрольное растение на среде без антибиотика В - Растение сорта Скарб после трансформации на селективной среде

A

Выявлены трансгенные линии картофеля, характеризующиеся повышенной устойчивостью к колорадскому жуку.

# Создание трансгенных растений рапса, устойчивых к гербицидам

Разработчики: БГУ, ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси», НПЦ НАНБ по земледелию

- □ Создано 8 линий трансгенных растений рапса с введенным геном *CYPIIAI* цитохрома P450scc животного происхождения и *bar* геном. Проведен их молекулярно-генетический анализ, получено на селективной среде T1 поколение. Показана устойчивость трансформантов к гербициду фосфинотрицину.
  - Ведутся эксперименты по трансформации рапса сорта Магнат вектором pBI121-L-aroA с геном устойчивости к глифосату. Отобраны на селективной среде 7 линий и методом ПЦРанализа подтверждено наличие в них гена aroA.





 □ Начаты эксперименты по трансформации рапса с новыми векторными конструкциями РZН501 и РZН485, созданными на кафедре молекулярной биологии БГУ.

Рис - Растения рапса (опыт справа, контроль слева) после обработки промышленной дозой фосфинотрицина.

#### Создание трансгенных растений льна-долгунца, несущих химерный ген GFP-TUA6

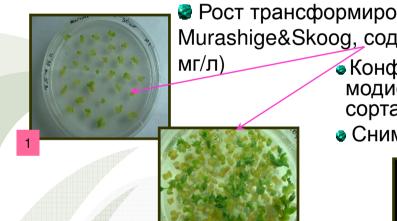
Разработчики: ГНУ «Институт генетики и

цитологии НАН Беларуси»

агробактериальная трансформация с использованием высоковирулентного штамма

Agrobacterium tumefaciens LBA4404. биобаллистическая трансформация Институт геномики и пищевой биотехнологии (Украина)

Вводимая генетическая конструкция – плазмида с химерным геном белка цитоскелета тубулин, слитый с репортерным геном GFP (green fluorescent protein зеленый флюоресцентный белок или белок зеленой флюоресценции).

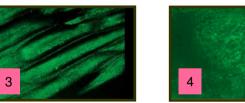


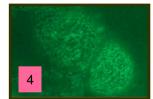
Методы:

Рост трансформированного каллуса на селективной среде Murashige&Skoog, содержащей канамицин (100мг/л) и цефотаксим (500

> Конфокальная микроскопия клеток модифицированного каллуса и стебля льна-долгунца сорта Василек. Экспрессия репортерного гена *gfp - 3, 4*

Снимок побега контрольного растения – 5







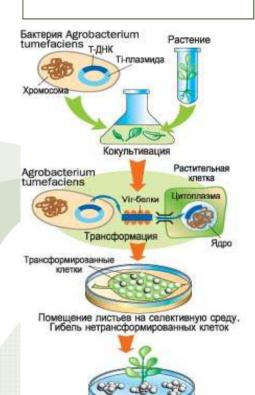
При амплификации с использованием специфических праймеров были получены фрагменты, соответствующие позитивному контролю (плазмида рВІ121), как после агробактериальной, так и после биобаллистической трансформации.

Созданы четыре трансгенные линии льна-долгунца (Т2) три линии от исходного сорта Василек, одна линия от исходного сорта Белита.

# Агробактериальная трансформация льна-долгунца генетической конструкцией с геном *aroA*, несущим устойчивость к глифосату

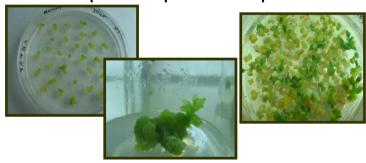
Разработчик: ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»

Этапы агробактериальной трансформации



Регенерация трансгенного растения

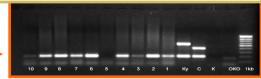
- Для экспериментов по созданию трансгенных растений льна-долгунца методом агробактериальной трансформации высококопийная плазмида pBl121 введена в супервирулентный штамм A.tumefaciens LBA. Встраиваемая конструкция несла ген aroA под контролем 35S промотора вируса мозаики цветной капусты, CTP фрагмент, кодирующий сигнал транспорта в хлоропласт.
- Формирование каллуса и побегов на гипокотильных эксплантах льна-долгунца, культивируемых на селективной среде (Кт 100) после трансформации



Электрофореграмма продуктов амплификации геномной ДНК первичных трансформантов льна.

Амплификация с праймерами к последовательности 35S промотора. Размер амипликона 194 пн

Амплификация с праймерами к последовательности *nptll* гена. Размер амипликона 489 пн





Молекулярный анализ обнаружил встройки *nptll* гена у четырех образцов (1, 3, 6, 7), что подтверждает трансгенный статус растений.

# Создание трансгенных растений клевера лугового и клюквы крупноплодной

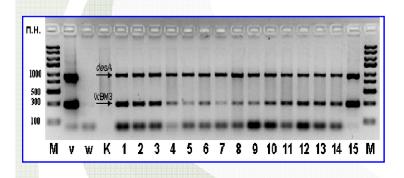
Разработчик: Центральный ботанический сад НАН Беларуси

- Создана технология агробактериальной трансформации *in vitro* и *in planta* клевера лугового; получены трансгенные растения клевера лугового сорта Витебчанин, содержащие ген *licB*.
- Разработана технология получения трансгенных растений клюквы крупноплодной, экспрессирующих гетерологичный ген белка тауматина II с проявлением антигрибной активности и изменением вкуса плодов.



Трансгенные растения клевера лугового

Трансгенные растения клюквы крупноплодной



Создано опытное поле для проведения испытаний непатогенных генно-инженерных организмов при их первом высвобождении в окружающую среду



В 2012 году при Институте генетики и цитологии НАН Беларуси вводится в эксплуатацию специальное опытное поле для испытания трансгенных растений при их первом высвобождении в окружающую среду.



#### Создание трансгенных животных

Разработчик: НПЦ НАН Беларуси по животноводству

■ Впервые совместно с Институтом биологии гена РАН получены козлята, трансгенные по гену лактоферрина человека.

■ Создано стадо животных-продуцентов в количестве 112 голов ( самки – 78, самцы – 34).

- Разработаны методики выделения, очистки и лиофильной сушки рекомбинантного лактоферрина человека из молока животных-продуцентов.
- Ведется разработка пищевых добавок и лекарственных средств с использованием лактоферрина человека.

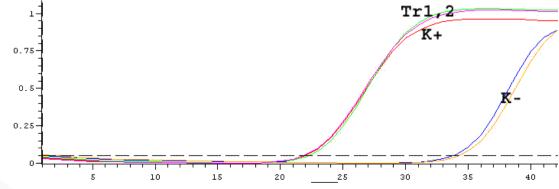


Лак-1 и Лак-2

Первое трансгенное потомство Лак-1 и Лак-2.

Проверка наличия гена лактоферрина человека в сперме козлов.

К- - нетрансгенные козлы К+ - человеческая ДНК Тr 1,2 - козлы, трансгены.



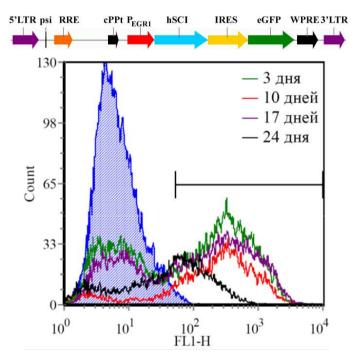
### Получение «суррогатных» клеток с глюкозорегулирумой эктопической экспрессией гена инсулина человека

Разработчики: Белорусский государственный университет

B модифицируемых клеток качестве используются мезенхимальные стволовые клетки костномозгового человека происхождения. Ключевым методом модификации генетической является лентивирусная трансдукция.

- Оптимизирован метод получения рекомбинантных псевдотипированных лентивирусов;
- Разработан метод высокоэффективной и стабильной генетической модификации мезенхимальных стволовых клеток человека одним или сопряженной парой генов с помощью лентивирусной трансдукции;
- Разработана серия генетических конструкций, кодирующих нативную форму инсулина человека, а также его модификации, достигнута конститутивная или глюкозорегулируемая эктопическая экспрессия таких конструкций в мезенхимальных стволовых клетках человека;
- подана заявка на патент.

РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий



Конфигурация лентивирусного вектора доставки, кодирующего одноцепочечную форму инсулина, а также эффективность и стабильность

а также эффективность и стабильность генетической модификации с его помощью мезенхимальных стволовых клеток человека

по данным проточной цитометрии

# Создание генно-инженерных штаммов-продуцентов для использования при производстве лекарственных препаратов

- Созданы векторы экспрессии уридинфосфорилазы и пуриннуклеозидфосфорилазы и соответствующие штаммы-суперпродуценты на основе BL21(DE3).
- Анализ показал 10-20-кратное увеличение эффективности биосинтеза ферментов в сравнении с исходным штаммом.

Данные ферментные препараты являются важным звеном в синтезе фармсубстанций «Лейкладин», «Флударабел» и «Гуаран», а также других фармацевтически важных нуклеозидов.

Разработчики: ГНУ «Институт генетики и цитологии НАНБ», ГНУ «Институт микробиологии НАНБ»

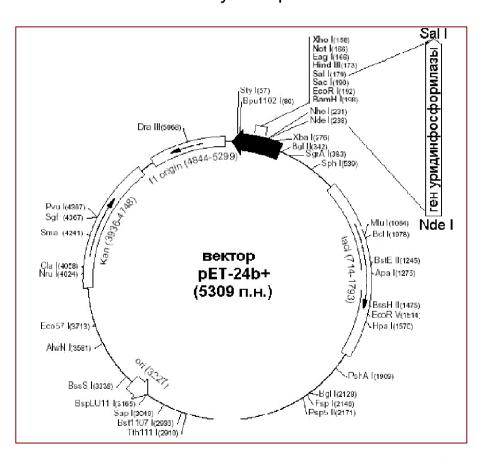


Схема клонирования гена UDP

# Республиканский банк ДНК человека, животных, растений и микроорганизмов

**Цель проекта** - обеспечение централизованного долгосрочного хранения и эффективного использования уникальных банков ДНК для нужд научных исследований, медицинской и сельскохозяйственной практики, биотехнологического производства.

#### Проведены следующие работы:

- оборудовано хранилище с низкотемпературными морозильными камерами;
  создана группа обеспечения банка;
  разработана документация
  - Положение о Республиканском банке ДНК;
  - Порядок депонирования образцов;
  - Система учета образцов.

### В настоящее время собрано более 9 000 образцов ДНК и биологического материала, в том числе

Раздел 1 Банк ДНК человека Раздел 2 Банк ДНК животных Раздел 3 Банк ДНК растений Раздел 4 Банк ДНК микроорганизмов



# Республиканский центр по генетическому маркированию и паспортизации растений, животных, микроорганизмов и человека (Республиканский центр геномных биотехнологий)

Функционирует с 2011 г. Вышел на проектную мощность в декабре 2013 г.







Аккредитован в системе Госстандарта

Лицензия Минздрава на право осуществления медицинской деятельности

Реализовано услуг в 2015 г. на сумму 4,8 млрд.руб.

Сертифицирован на соответствие системы менеджмента качества СТБ ISO 9001–2009

#### Область аккредитации Республиканского центра геномных биотехнологий

- определение наличия генетически модифицированных ингредиентов (ГМИ) в продовольственном сырье и пищевых продуктах;
- определение наличия ГМИ в сельскохозяйственной продукции, кормах и в семенном материале
  - •определение ДНК-маркеров для идентификации и паспортизации сортов сельскохозяйственных культур;
    - •определение генов, ответственных за хозяйственно ценные признаки и наследственные заболевания животных;
      - •определение генов, ответственных за различные индивидуальные особенности человека

# В планах расширить область аккредитации по направлениям:

- маркер-сопутствующая селекция сельскохозяйственных растений;
- ДНК-типирование редких и исчезающих видов животных

#### Лаборатория детекции ГМО

Создана в 2006 г. В настоящее время аккредитована в составе Республиканского центра геномных биотехнологий Института генетики и цитологии НАН Беларуси.

Основная задача - определение наличия генетически модифицированных ингредиентов в продовольственном сырье, пищевых продуктах, в с/х продукции, кормах и семенном материале в соответствии с областью ее аккредитации.

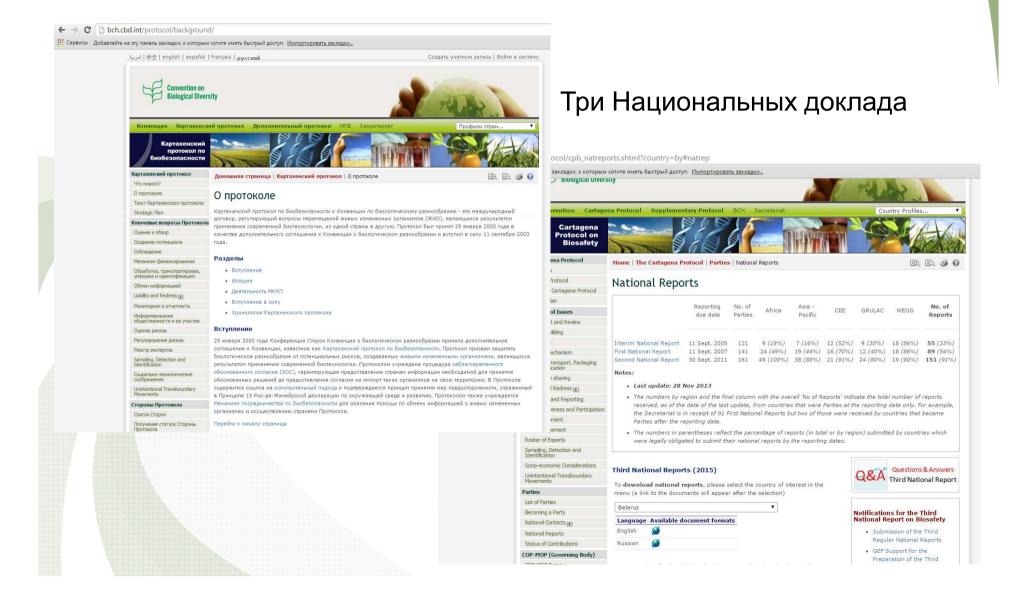
### Объекты исследований

Продовольственное сырье, пищевые продукты, корма, подлежащие контролю на наличие генетически модифицированных составляющих (компонентов) в соответствии с перечнем, утвержденным Постановлением Минздрава и Госстандарта Республики Беларусь от 8 июня 2005 г. № 12/26, а также Техническими регламентами Таможенного Союза

# Результаты испытаний продовольственного сырья, пищевых продуктов и кормов по определению ГМИ за 2006-2015 гг. (на 01.11.2015)

	Количество испытаний		Положительные	
Год	Общее	Положительные (соя – C,	результаты (в процентах)	
		кукуруза – К)		
2006	274	3 (2C+ 1K)	1,09 %	1.38 %
2007	1746	16 (15C+1K)	0,92 %	
2008	3166	62 (51C+11K)	1,96 %	
2009	3482	39 (38C+1K)	1,12 %	
2010	3427	3 (3C+ 0K)	0,09 %	0.14 %
2011	2803	6 (6C+ 0K)	0,21 %	
2012	3291	4 (3C+ 1K)	0,12 %	
2013	2779	43 (39C+ 4K)	1,55 %	1.42 %
2014	2673	32 (29C+ 3K)	1,20 %	
2015 (на 01.11)	1542	24 (24C+ 0K)	1,56 %	
Итого	25 183	232 (210С+22К)	0,92 %	

# Картахенский протокол по биобезопасности



**FAO** РАССМАТРИВАЕТ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ГМ СОРТОВ РАСТЕНИЙ ЛИБО ДРУГИХ ОРГАНИЗМОВ КАК НЕОТЪЕМЛЕМУЮ ЧАСТЬ БИОТЕХНОЛОГИИ

Горизонтальный перенос чужеродных генов, а также возможность взаимодействия трансгена с комплексом собственных генов ГМО могут приводить к появлению у ГМО новых признаков — источников потенциально негативных воздействий на окружающую среду и человека.

Детекция и идентификация ГМО является важным компонентом

- мониторинга продукции и ее маркирования;
- мониторинга семенного материала, поступающего на поля, с целью детекции ГМО-примесей и идентификации ГМО, не внесенных в списки разрешенных в соответствии с национальным законодательством.

# МЕЖДУНАРОДНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР БЕЗОПАСНОСТИ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ

- ✓ потенциальный генетический риск воздействия ГМО на окружающую среду и человека;
- ✓ необходимость разработки новых и совершенствования имеющихся методов детекции и идентификации генетически модифицированных ингредиентов (ГМИ) в продуктах питания и кормах для сельскохозяйственных животных;
- ✓ необходимость методического регулирования процесса на всех этапах генно-инженерной деятельности: создание → высвобождение для проведения испытаний → коммерциализация ГМО;
- ✓ осуществление международных контактов по вопросам генноинженерной деятельности.

#### ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

**Цель** – проведение исследований и разработка методического обеспечения в области безопасности генно-инженерной деятельности

#### Задачи:

- разработка, совершенствование и использование технологий и методов детекции и идентификации ГМО;
- разработка методического обеспечения в сфере безопасности генноинженерной деятельности (создание, высвобождение в окружающую среду и коммерциализация ГМО);
- при необходимости осуществление мониторинга использования и распространения ГМО;
- осуществление международных контактов по вопросам проведения совместных исследований и разработке методического регулирования в области генно-инженерной деятельности;
- проведение тренингов и консультаций для специалистов в области генно-инженерной деятельности.

#### ИМЕЮЩИЙСЯ ЗАДЕЛ ДЛЯ СОЗДАНИЯ МЕЖДУНАРОДНОГО ЦЕНТРА

Центр создается на базе Института генетики и цитологии НАН Беларуси.

Чем располагает	Институ	т генетики і	и цитологии:
-----------------	---------	--------------	--------------

- высокопрофессиональные кадры в области молекулярной генетики и генетической безопасности;
- опыт международной работы в области генетической безопасности:
  - Институт является Национальной контактной точкой Механизма посредничества по биобезопасности; участие в работе международных форумов;
  - участие в работе международной технической экспертной группы по оценке рисков ГМО и управлению рисками;
  - обучение персонала с привлечением зарубежных грантов в области безопасности генноинженерной деятельности (Швейцария, 2012; Молдова, 2014; Италия, 2013, 2014, 2015; Македония, 2014), а также посредством он-лайн Вебинаров;
  - сотрудничество с Отделом молекулярной биологии и геномики Объединенного исследовательского центра Европейской комиссии, сетью референсных лабораторий детекции ГМО Европейской комиссии;
  - региональное сотрудничество со странами Восточной Европы.
- опыт работы в области генетической безопасности и детекции ГМО:
  - Лаборатория детекции ГМО осуществляет свою деятельность с 2006 г.
- современная материально-техническая база

#### ОЖИДАЕМЫЕ НАУЧНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ ЦЕНТРА

#### Будут:

Подобраны наборы ДНК-маркеров для детекции и идентификации трансгенных событий (вставок чужеродных генов в геном растения-реципиента).

Разработаны технологии детекции и идентификации ГМ-компонент в биологическом материале различного происхождения.

Разработаны стандартные операционные процедуры для уточнения технологий детекции и идентификации ГМИ.

Усовершенствованы существующие методы детекции ГМ-компонент с/х растений.

Расширен спектр анализируемых с/х культур.

Созданы ДНК-банки генетически модифицированных видов с/х растений.

#### ОЖИДАЕМЫЕ ПРИКЛАДНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ ЦЕНТРА

Детекция и идентификация ГМО с использованием разработанных и усовершенствованных технологий и методов молекулярногенетического анализа.

Унификация методов скрининга разрешенных и неразрешенных ГМО на территории Таможенного союза и в других регионах.

Взаимодействие с международными организациями по вопросам генно-инженерной деятельности.

Мониторинг использования и распространения ГМО.

Подготовка методических рекомендаций в сфере безопасности генно-инженерной деятельности.

Проведение республиканских и международных тренингов и консультаций для специалистов в области генно-инженерной деятельности, в т.ч. из стран бывшего Советского союза.





Ref.: SCBD/BS/CG/ET/mw/85125

8 December 2015

# NOTIFICATION

Selected countries to participate in the pilot project: Capacity-building to promote integrated implementation of the Cartagena Protocol on Biosafety and the Convention on Biological Diversity at the national level

Dear Madam/Sir,

I would like to refer to notification 2015-119, issued on 27 October 2015, and notification 2015-133, issued on 23 November 2015, inviting Parties to submit expressions of interest to participate in the pilot project "Capacity-building to promote integrated implementation of the Cartagena Protocol on Biosafety and the Convention on Biological Diversity at the national level".

After careful review of the 27 expressions of interest that were received by the Secretariat before the extended deadline of 30 November 2015, and taking into consideration the criteria that were set out in the notification and the need for an equitable geographical balance among the recipients, I am pleased to inform you that the following 10 developing country Parties and Parties with economies in transition have been selected to receive financial assistance to participate in the project: Belarus, Burkina Faso, China, Colombia, Ecuador, Malaysia, Mexico, Republic of Moldova and Uganda.

The Secretariat will, in the coming days, contact the selected Parties with regard to further arrangements. I would like to take this opportunity to thank the Government of Japan, through the Japan Biodiversity Fund, for providing the financial support for the project.

Please accept. Madam/Sir, the assurances of my highest consideration.

Braulio Ferreira de Souza Dias Executive Secretary



#### Институт генетики и цитологии НАН Беларуси

### Благодарю за внимание!