

Утверждаю
Директор ГНУ «Институт генетики
и цитологии НАН Беларуси»



д.с.-х.н, чл.-корр.
Р.И. Шейко

09.2019

Заключение государственной экспертизы безопасности генно-инженерных организмов

1. Общие положения

Эксперт – Государственное научное учреждение «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси».

Заказчик – Государственное учреждение образования «Белорусский государственный университет».

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

Цель экспертизы – получение разрешения на высвобождение непатогенного генно-инженерного организма (трансгенного рапса) в окружающую среду для выращивания в технических целях.

Объект экспертизы – трансгенная линия рапса со встроенным геном *aroA*, обеспечивающим устойчивость к гербициду глифосат и его коммерческим аналогам.

1. ВВЕДЕНИЕ

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 1 к «Положению о порядке проведения оценки рисков возможных вредных воздействий генно-инженерных организмов на здоровье человека и окружающую среду» № 382, утвержденным Постановлением Совета Министров Республики Беларусь 12.06.2019 [1], проведена экспертиза биобезопасности объекта, заявленного Заказчиком, для высвобождения в окружающую среду. Экспертиза проведена в соответствии с данными «Руководства по оценке рисков в отношении живых измененных организмов» (Guidance on Risk Assessment of Living Modified Organisms) Механизма посредничества по биобезопасности (далее – BCH) [2], «Инструкции о порядке проведения оценки риска возможных вредных воздействий генно-инженерных организмов на здоровье человека» [3], методических рекомендаций «Оценка рисков воздействия ГМО на сохранение и устойчивое использование биологического разнообразия, с учетом рисков для здоровья человека» Республики Беларусь [4], консенсусного документа OECD (Организация экономического сотрудничества и развития) по биологии рода *Brassica* [5], данных BCH [6], данных ISAAA (Международной службы по сбору агrobiотехнологических 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 1 к «Положению о порядке проведения оценки рисков возможных вредных воздействий генно-инженерных организмов на здоровье человека и окружающую среду» [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 – выращивание трансгенной линии рапса на участке, принадлежащем Республиканскому унитарному предприятию «Шипяны-АСК» (Минская область, Смолевичский район, д. Алесино, ул. Школьная, д. 2) для получения семенного материала и использования его в технических целях [8], масштаб высвобождения (широкомасштабное высвобождение), условия принимающей среды высвобождения и последующих потенциальных принимающих сред.

Методология оценки риска [2] включала:

Этап 1. Выявление любых новых генотипических и фенотипических характеристик, связанных с генно-инженерным организмом (ГИО), 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 ГИО 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 ГИО, на основе оценки вероятности возникновения 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 ГИО, научно-достоверные сценарии реализации рисков, а также определялись пути дифференциации риска и вредного воздействия. С целью установления, какие новые характеристики ГИО 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., сорт Прамень), ГИО, проведен сравнительный анализ генотипических и фенотипических характеристик ГИО и организма-реципиента (*Brassica napus* L.), особенностей потенциальных принимающих сред и информации, касающейся предполагаемого вида использования ГИО. Проанализирована информация, полученная в ходе контролируемых высвобождений трансгенного рапса в окружающую среду (данные заявителя), отчеты о научно-исследовательских работах по испытаниям трансгенной линии рапса PZ4-100 с геном *aroA* при ее первом (2016 г.) и втором (2017 г.) высвобождении в окружающую среду на опытном поле Института генетики и цитологии (№ госрегистрации 20162849 и № госрегистрации 20170930), включающие данные эколого-генетического мониторинга флоры и фауны по периметру 300 метров опытного поля Института генетики и цитологии, отчет о научно-исследовательской работе «Исследование острой токсичности трансгенной линии рапса pZ4-100 с геном *aroA* бактерий *Dickeya dadantii*» (2018 г.), выполненную Государственным научным учреждением «Институт физиологии НАН Беларуси».

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

особенности ГИО (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 ГИО;

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

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

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

другие потенциальные риски.

На 2 и 3 этапах оценки рисков оценена вероятность возникновения каждого неблагоприятного воздействия 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 ГИО, которые могут оказать неблагоприятное воздействие на биологическое разнообразие в вероятной потенциальной принимающей среде, с учетом рисков для здоровья человека.

Информация п. 3 дается в соответствии с консенсусным документом OECD по биологии рода *Brassica* [5], Досье Заявителя [8], данных отчетов о научно-исследовательской работе по испытаниям трансгенной линии рапса PZ4-100 с геном *aroA* при ее первом и втором высвобождениях в окружающую среду (2016 г, № госрегистрации 20162849; 2017 г., № госрегистрации 20170930), отчета о научно-исследовательской работе «Исследование острой токсичности трансгенной линии рапса pZ4-100 с геном *aroA* бактерий *Dickeya dadantii*» (Договор 10X/2018 от 25.05.2018), баз данных ISAAA [13], ВСН [14], данных Пищевой продовольственной организации ФАО [16] и др.

3.1. Информация, имеющая существенное отношение к оценке риска.

3.2. Характеристика организма – реципиента.

Рапс (*Brassica napus* L.) – культурно возделываемое растение. В кариотипе *B. napus* 38 хромосом ($n = 19$, геном *AACC*). 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 *A*- и *C*- и имеют сложную природу наследования [9].

В качестве реципиента использован сорт ярового рапса белорусской селекции Прамень. Хозяйственно-биологическая характеристика сорта Прамень [10]: среднеранний, самый устойчивый к болезням современный сорт ярового рапса. В конкурсном сортоиспытании по урожайности семян сорт Прамень превысил стандарт на 6,8 ц/га. Вегетационный период на уровне стандарта – 102 дня. Отличается высокой масличностью (47,2%), низким содержанием и глюкозинолатов (9-14 мкМоль/г.), отсутствием эруковой кислоты. Относится к сортам пищевого назначения качества «канола». Отличается устойчивостью к осыпанию и полеганию, дружностью цветения и созревания. Отзывчив на интенсивную технологию возделывания и является одним из продуктивных сортов ярового рапса. Районирован по республике с 2009 года.

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% [5]. При создании новых форм рапса необходимо изолировать растения друг от друга.

Перенос пыльцы осуществляется ветром, насекомыми (пчелами и шмелями). Основную роль в опылении играют такие насекомые опылители как пчелы (*Apis mellifera*) и шмели (*Bombus* sp.). 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» [5].

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) [5]. 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 близко расположенных 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 пылевых зерен с ГМ-поля на не ГМ-поле [5]. 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.

Семена рапса мелкие, многочисленные, современные сорта дают урожай около 40 ц/га. Созревание семян происходит неравномерно. Процесс культивирования и сбора урожая, болезни, вредители, птицы могут быть причиной растрескивания стручков и высыпания семян. 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 хозяйствование, неравномерность созревания семян, недостаточная устойчивость к растрескиванию стручка может привести к тому, что большое количество семян *B. 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 самосевов, к 4 году рост самосевов 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, 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 Beckie 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.

Яровой рапс, к которому относится сорт Прамень, – холодостойкая культура. Семена могут прорасти при температуре 2–3°C, а молодые растения хорошо развиваются при 10–16°C [12]. Всходы ярового рапса выдерживают весной заморозки до -4 – -5°C, при появлении настоящих листьев морозостойкость посевов возрастает до -5 – -6 °C. При более низких

температурах наблюдается полная гибель посевов [10]. Проведенная Заявителем оценка морозоустойчивости трансгенного рапса методом прямого промораживания 300 проростков трансгенного рапса до появления настоящих листьев в течение 24 часов при температуре - 5°C выявила полную гибель растений из опытной (трансгенная форма) и контрольной групп (сорт Прамень) после их оттаивания.

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 сородичей 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 *B. napus* (Chèvre et al. 1999; Daniels et al, 2005; Warwick et al., 2003, 2007) [5]. 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 *B. 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 (Chèvre et al) [5].

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 [5]. 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* х *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 AABV) имеет с рапсом (геном AACС) 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.

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.

3.6. Способность воздействия на нецелевые организмы, не являющиеся мишенью действия

В ходе экологического мониторинга при высвобождении трансгенного рапса на территории опытного поля Государственного научного учреждения «Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси», соответствующего требованиям безопасности [15], и в его окрестностях, проведенного в 2016 и 2017 гг. выявлено широкое разнообразие насекомых, обитающих на растениях рапса. Так, в окрестностях опытного поля в 2017 году выявлен 191 вид насекомых, принадлежащих к 10 отрядам (Отчет о научно-исследовательской работе по испытаниям трансгенной линии рапса PZ4-100 с геном *aroA* при ее втором высвобождении в окружающую среду). Среди них встречались как широко распространенные в природе виды, не имеющие существенного хозяйственного значения так и вредители сельскохозяйственных культур, в частности, рапса. Всего на рапсе выявлено 15 видов вредителей. Также отмечены хищные и паразитические насекомые, которые используют вышеуказанных вредителей в качестве корма имаго или личинок: жуки коровки, наездники, мухи журчалки, хищные осы. На цветущем рапсе, несмотря на защиту спанбондом, в большом количестве концентрировались полезные виды опылителей из отрядов перепончатокрылые, двукрылые, чешуекрылые и др.

В ходе исследований с искусственной изоляцией соцветий в 2017 г. установлено, что насекомые, особенно шмели, активно проникали под спанбонд, откуда выход обратно для них оказывается затруднен. В связи с этим в начале июля была отмечена массовая гибель шмелей под спанбондом. При исследовании специалистом зоологом указана неопределенность в отношении, является ли это следствием контактного или пищевого отравления химическим препаратом обработки рапса. Высказано мнение, что вероятнее всего гибель шмелей под спанбондом на рапсовом поле происходит в солнечные дни по причине их перегрева (Отчет по договору 4-

04-17, выполненный в рамках научно-исследовательской работы по испытаниям трансгенной линии рапса PZ4-100 с геном *aroA* при ее втором высвобождении в окружающую среду на опытном поле Института генетики и цитологии, № госрегистрации 20170930, 2017 г.).

Помимо указанных видов насекомых на участке посевов рапса отмечены следы жизнедеятельности мышей полевков (род *Microtus*), разгрызающих его стручки. Полевки на зиму заготавливают пищевые запасы, достигающие (например, у обыкновенной полевки) 3 кг. Не исключено, что часть семян генетически модифицированных культур, в том числе и рапса, может быть «похищена» этими животными и перенесена в свои подземные хранилища. Несмотря на то, что полевкам свойственен территориальный консерватизм, не исключено, что благодаря им семена рапса могут попасть за пределы опытного поля, например будучи потерянными по пути к зимним хранилищам. При глубокой осенней распашке запасы семян, заготовленные полевками, могут оказаться в верхних слоях почвы и быть разнесены с землей, прилипшей к агротехнике.

Следует отметить, что продукт целевого гена трансгенного рапса не оказывает воздействие на нецелевые организмы, организмов-мишеней продукта трансгена не существует. Вместе с тем, в данном случае может быть целесообразным рассмотреть тот факт, что данная трансгенная форма устойчива к гербициду глифосат и его коммерческим аналогам (коммерческие названия аналогов – «Раундап», «Ураган», «Торнадо», «Аргумент Стар», «Триумф», «Ампир», «Агрокиллер» и др.).

В случае широкомасштабного выращивания трансгенного рапса, он всегда будет поставляться в одной упаковке с указанными выше гербицидами. Данные гербициды разрешены для использования на территории Республики Беларусь. По данным отчета Пищевой продовольственной организации ФАО на основании данных о токсичности и норм внесения действующего вещества глифосат риски для птиц, млекопитающих, водных организмов, пчел, дождевых червей и

микроорганизмов в почве при соблюдении соответствующих мер по управлению рисками рассматриваются как незначительные [16]. При этом существует исследования, указывающие на действие вышеуказанного гербицида и его коммерческих аналогов на нецелевые организмы, например, на пчел. Так, в обзоре [17] отмечено, что глифосат в количестве, обычно применяемым для обработки сельскохозяйственных культур, ухудшает когнитивные способности медоносных пчел, влияя на их навигацию, что может иметь долгосрочные негативные последствия для успеха выкармливания колоний.

3.7. Характер генетической модификации. Метод, использованный для переноса генетической конструкции. Стабильность вставки. Наличие во встроенной ДНК неизвестных последовательностей.

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.

Полученная разработчиками генетически-модифицированная линия рапса содержит 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, кодирующую 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.

По данным Заявителя вектор не встраивается в хромосомную ДНК, а инсерция тДНК является стабильной. В результате секвенирования установлена полная нуклеотидная последовательность гена *aroA* штамма *D. dadantii* ENA49, которая отличается от таковой, имеющейся в базе данных, штамма *D. dadantii* 3937 (GenBank:NC_014500).

По структуре и функциям встроенные последовательности соответствуют своему назначению. В интегрированных в геном растений фрагментах ДНК отсутствуют потенциально опасные последовательности. Во встроенной ДНК Заявителем не выявлено неизвестных последовательностей.

Обнаружение и идентификация встроенного целевого гена проводилась Заявителем методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием пары праймеров: ntCTPf (комплементарен области СТР (сигнал транспорта продукта целевого гена в хлоропласт) и EPSPSseq (комплементарен внутреннему фрагменту гена *aroA*).

Методом ПЦР с использованием геномной ДНК, выделенной из трансгенных растений рапса, заявителем получены последовательности ожидаемых размеров. С использованием метода ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с использованием праймеров к целевому гену и

кДНК трансгенных растений Заявителем выявлен ПЦР-продукт, что подтверждает интеграцию целевого гена в хромосому трансгенных растений рапса. Методом ПЦР в ряду поколений трансгенных растений рапса (Т1-Т6) Заявителем подтверждена стабильность инкорпорации ДНК в геном рапса. Фенотипический анализ трансгенных растений рапса в ряду поколений показал 100% резистентность трансгенных растений рапса к действию глифосат содержащего гербицида.

Для того, чтобы обеспечивать прослеживаемость ГИО, высвобождаемого в окружающую среду, и продовольственного сырья, содержащего ГИО, до прохождения процедуры государственной регистрации нового сорта должен быть разработан метод, позволяющий достоверно идентифицировать данный ГИО. С 2012 г. в связи с установлением 0,9% порога для маркировки ГИО в семенном материале, сырье, кормах и пищевой продукции в аккредитованных лабораториях Республики Беларусь применяется «золотой стандарт» - метод количественной ПЦР.

Лабораторией генетической и клеточной инженерии и Национальным координационным центром биобезопасности Института генетики и цитологии НАН Беларуси в 2016-2017 гг. перед высвобождением на опытном поле, соответствующем требованиям безопасности, а также при проведении данной оценки рисков, проводилась детекция основных генетических элементов, по которым можно идентифицировать данную трансгенную линию, а также осуществлялась идентификация по целевому гену. Детекция и идентификация проводились с использованием ДНК-маркеров к предоставленным разработчиками последовательностям ДНК, а также с использованием коммерческих тест-систем. Проведенные исследования в 2016 и 2017 гг. выявили, что метод качественной ПЦР к целевому гену с использованием пар праймеров, предоставленных Заказчиком, с электрофоретическим разделением фрагментов в агарозном геле не является эффективным для рутинной детекции и идентификации последовательностей

сложного генома рапса, поскольку выявляет неспецифические фрагменты и требует больших время- и трудозатрат (отчеты о научно-исследовательских работах по испытаниям трансгенной линии рапса PZ4-100 с геном *aroA* при ее первом (2016 г., № госрегистрации 20162849) и втором (2017 г., № госрегистрации 20170930) высвобождении в окружающую среду на опытном поле Института генетики и цитологии. Поэтому были использованы методики скрининга с помощью метода ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ), а также высокоточный метод абсолютного количественного определения - метод цифровой ПЦР. Детекция проводилась по PCaMV35S промотору и NOS-терминатору, последовательности CP4EPSPS, идентификация – по целевому гену.

Показано, что в ходе идентификации с помощью коммерческих наборов, используемых в аккредитованных лабораториях детекции ГМО Республики Беларусь, выявляются последовательности PCaMV35S-промотор, NOS-терминатор, последовательность CP4EPSPS. При этом, следует отметить, что данные последовательности содержат и другие ГМ-линии, как разрешенные, так и не разрешенные для размещения на рынке Беларуси и ЕАЭС. Поэтому до высвобождения в окружающую среду и до помещения на рынок новой трансгенной линии необходима разработка метода идентификации данной трансгенной линии и ее количественного определения, либо включение в уже разработанные коммерческие наборы праймеров, позволяющих достоверно выявлять целевой ген *aroA* данной линии. Кроме того, после регистрации новой трансгенной линии рапса необходимо включать в схемы скрининга для ГМ-рапса идентификацию последовательности целевого гена *aroA* заявленной линии.

3.8. 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 сородичами.

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

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.

Методом ОТ-ПЦР геномной ДНК трансгенной линии было установлено, что целевой ген (*aroA*) штамма бактерии *Dickeya dadantii* ENA49 интегрирован в хромосому реципиента. С использованием метода инвертированной ПЦР установлено, что количество копий тДНК соответствует трем.

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

Промотор 35S вируса мозаики цветной капусты обеспечивает конститутивную экспрессию целевого гена, то есть продукт целевого гена может экспрессироваться во всех частях растения.

3.10. Характеристика генетически модифицированного организма.

Морфологических изменений у трансгенной линии 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 ярового рапса Прамень по двум новым признакам – устойчивость к гербициду глифосату, которая обусловлена экспрессией нового гена *aroA*, кодирующего фермент 5-енолпирувилшикимат-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.

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-енолпирувилшикимат-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 [7] и ВСН [6].

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

3.11. Характеристика трансгенного рапса в связи с безопасностью для здоровья человека: токсические или аллергенные эффекты ГИО и/или продуктов, полученных из ГИО.

Оценка потенциальной аллергенности и токсичности трансгенного рапса проводилась в соответствии с [3]. На основании данных об аминокислотной последовательности продукта экспрессии целевого гена заявляемой трансгенной линии рапса Заявителем проведена оценка потенциальной аллергенности белка с использованием поисковых систем Allermatch и PepBank. Как показал анализ, проведенный с использованием базы данных Allermatch, сходство с известными аллергенными белками продукта экспрессии целевого гена отсутствует. В результате анализа, проведенного с помощью базы данных PepBank, был получен показатель «E value» 8.8, который является несущественным. Он означает, что в использованной базе данных ожидается 8.8 последовательностей с таким уровнем совпадения со случайной неродственной последовательностью.

Оценка токсичности продукта экспрессии анализируемой трансгенной вставки проводилась с использованием специализированной базы данных Toxin, Toxin Target Database (T3DB). Проведенный анализ показал отсутствие гомологии аминокислотной последовательности продукта трансгенной вставки с токсинами белковой природы.

Далее безопасность трансгенной линии рапса для здоровья человека и животных оценивалась в опытах на лабораторных животных (крысах), проведенных в лаборатории модуляции функций организма Государственного научного учреждения «Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси». В результате проведенного исследования острой токсичности семян рапса трансгенной линии было сделано заключение, что они относятся к V классу «Практически нетоксично» согласно классификации степеней токсичности Организации экономического содействия и развития (OECD) (отчет по договору 10X/2018 от 25.05.2018 г.). Данные некропсии продемонстрировали, что однократное

внутрижелудочное (в/ж) введение суспензии семян ГМ-рапса не вызывает видимых признаков патологии внутренних органов. Минимальная (50 мг/кг) и промежуточная (500, 1000 мг/кг) дозы не вызывают достоверных изменений со стороны всех исследованных органов. Однако отмечено увеличение массы селезенки у самцов при введении в/ж максимальной дозы семян ГМ-рапса (2500 мг/кг), что эксперт объясняет токсическим воздействием на функцию данного органа, который при этом компенсаторно увеличивается. У самок отмечено аналогичное действие на селезенку, но уже при введении более низких доз семян (1000 мг/кг), а также выявлено снижение массового коэффициента сердца на применение высоких доз (2000-2500 мг/кг) семян трансгенного рапса. Факты токсического воздействия рапса на сердечно-сосудистую систему отмечены в литературных источниках и, как правило, они объясняются присутствием в составе семян рапса эруковой кислоты. Однако, следует отметить, что сорт Прамень, использованный для создания трансгенного рапса, характеризуется как не содержащий эруковую кислоту.

В результате проведенных исследований как по первичной оценке биобезопасности трансгенной линии рапса, так и согласно данным исследования острой токсичности семян рапса *in vivo* установлено, что молекулярно-генетические характеристики продуктов встроенных генов определяют их как не представляющие опасности для здоровья человека и животных при их использовании в технических целях.

3.12. Цель высвобождения, условия высвобождения.

Разработчик планирует использовать трансгенную линию рапса в технических целях для производства биотоплива.

Высвобождение запланировано на территории Республики Беларусь на базе Республиканского унитарного предприятия «Шипяны-АСК» (Минская обл., Смолевичский р-н, д. Алесино, ул. Школьная, д.2).

Ближайшие заказники и заповедники: Биологический заказник Пекалинский – 10 км от участка; Березинский Биосферный заповедник – 60 км от участка.

В севообороте выращиваются следующие культуры: рапс, пшеница, тритикале, ячмень, кукуруза.

На участке применяются следующие виды обработки почвы: отвальная вспашка на глубину 20-22 см., безотвальная обработка (чизелевание, дискование) на глубину 16-20 см, культивация на глубину 12-14 см, вносятся органические и минеральные удобрения, применяются средства защиты растений (гербициды, фунгициды, инсектициды).

Разработчик планирует применение следующего контроля высвобождения трансгенной линии: для предотвращения рассеивания пыльцы и семян будет применена территориальная изоляция в виде 2,5 км от ближайших посевов рапса и близкородственных видов. Трансгенные растения будут высаживаться на участке, обозначенном специальной табличкой для предотвращения проникновения посторонних лиц. Очистка территории: по завершении вегетационного периода семенной материал будет тщательно собран, подвергнут сортировке, упакован и перенесен на хранение в зернохранилище. Участок будет вспахан и заборонован.

4. Этап 2. Оценка степени вероятности фактического возникновения неблагоприятных последствий, с учетом интенсивности и характера воздействия ГИО 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 ГМ-растение (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** - переход 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 дикорастущих видов, при последующем коммерческом выращивании трансгенных растений это может привести к необходимости смены гербицида. Поскольку вероятность миграции трансгена установлена, Заявителю настоятельно рекомендуется контроль при выпуске трансгенной линии в окружающую среду по замещению популяций в полевых условиях по схеме, представленной в методических рекомендациях [4]. Во время выращивания необходимо проведение оценки частоты переопыления и интрогрессии гена *aroA* в дикие сородичи, завязываемости гибридов, их выживаемости, формирования «банка семян» на поле.

Проведенная Заявителем оценка морозоустойчивости трансгенного рапса методом прямого промораживания при температуре -5°C выявила полную гибель растений из опытной (трансгенная форма) и контрольной групп (сорт Прамень) после их оттаивания. Однако остается вероятность сохранения «банка семян» трансгенного рапса на полях (п. 3.4), а также вероятность скрещивания трансгенного рапса с дикорастущими сородичами и сохранения их «банка семян». Необходимо учитывать то, что созревание семян рапса и диких сородичей, а также высыпание семян из растрескиваемых стручков происходит постепенно, семена мелкие (вес тысячи семян ярового рапса составляет около 5 г.), легко разносятся ветром. Следует также учитывать высокую урожайность диких сородичей, способность их семян к длительному сохранению всхожести, что увеличивает шансы образования гибридов с дикими сородичами. Так, максимальный урожай капусты полевой составляет до 20 000 семян с одного растения, а семена сохраняют всхожесть до 6 лет.

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 либо его коммерческих аналогов, применяемых на полях) у таких растений не должно быть.

Таким образом риск миграции и последующей интрогрессии трансгенов в дикие популяции в результате вертикального (обмен генетической информацией между организмами, принадлежащими к одному виду растений) переноса генов оценивается как «вероятно», при этом такие растения не будут иметь преимуществ в условиях дикой среды обитания. Оценка последствий – «незначительное».

Риск появления на полях сорняков, устойчивых к гербициду глифосат и его коммерческим аналогам, оценивается как «вероятно», что может изменить практики использования данных гербицидов. Оценка последствий – «среднее».

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

Рапс – факультативный самоопылитель, частота перекрестного опыления может достигать 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**. В случае совместного выращивания форм рапса на территории полей вероятность гибридизации высокая, поэтому при коммерческом возделывании необходима пространственная 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.

Поскольку цель высвобождения трансгенной линии рапса широкомасштабное высвобождение, существует возможность распространения семян: их потерь во время выращивания, сбора урожая, транспортировки, распространения грызунами; смешивание семян трансгенного и не трансгенного рапса при хранении и загрязнения не трансгенных сортов рапса трансгенной линией. **Риск загрязнения сортов нетрансгенного рапса трансгенной линией в условиях широкомасштабного выращивания оценивается как «высоковоероятно».** Это может иметь определенные последствия: в случае, если будут выявлены трансгенные линии в импортируемой продукции, обозначенной как не содержащая ГМО, вся партия продукции может быть забракована на территории страны импорта такой продукции, а также могут быть применены другие меры в соответствии с законодательством этой страны.

Оценка совокупных последствий – «существенное». Поэтому при выращивании должны быть разработаны и четко соблюдаться инструкции по выращиванию трансгенной линии, препятствующие ее распространению, а также инструкции по перевозу и хранению трансгенной линии, препятствующей ее смешиванию с не трансгенными сортами рапса, например отдельные уборочные средства, отдельные помещения для хранения. Должен быть утвержден и применяться метод мониторинга – ПЦР-РВ к целевому гену.

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 неомицинфосфотрансферазу 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, оценка последствий неблагоприятного воздействия при условии соблюдения рекомендаций пп. 4.1.1., 4.1.2. оценена как «среднее», при отсутствии соблюдения, как «существенное». Совокупный риск – «средний», при не соблюдении рекомендаций пп. 4.1.1., 4.1.2. – «высокий».

4.2. Оценка риска здоровью человека.

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

Оценка риска здоровью человека проведена Заявителем на основании Инструкций [3]. 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.

Безопасность трансгенных растений рапса для здоровья человека и животных также была подтверждена в опытах на лабораторных животных (крысах), проведенных в лаборатории модуляции функций организма Государственного научного учреждения «Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси». В результате проведенного исследования острой токсичности семян рапса трансгенной линии было сделано заключение, что они относятся к V классу «Практически нетоксично» согласно классификации степеней токсичности Организации экономического содействия и развития (OECD) (отчет по договору 10X/2018 от 25.05.2018 г.). Следует отметить, что ряд ранее разработанных аналогов данной трансгенной линии со встроенным геном *aroA* и *nptII*, 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) [7]. 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 [6, 7].

Также необходимо учесть цель высвобождения трансгенного рапса – выращивание для технических целей.

Вероятность возникновения неблагоприятного последствия – «маловероятно». Оценка последствия – «незначительное», общий риск – «незначительный».

5. Этап 4. Оценка совокупного риска, вызываемого ГИО, 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.

Суммарный экологический риск и риск для здоровья человека при выращивании трансгенной линии рапса для технических целей оценивается как **«средний»**. При этом должны быть разработаны и четко соблюдаться инструкции по выращиванию трансгенной линии, в которых должны быть прописаны меры, препятствующие распространению линии, а также разработаны и четко соблюдаться инструкции по перевозу и хранению трансгенной линии, препятствующие ее смешиванию с не трансгенными сортами рапса (отдельные машины для уборки и транспортировки, отдельные помещения для хранения).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной государственной экспертизы безопасности трансгенной линии рапса со встроенной последовательностью гена *aroA*, обеспечивающей устойчивость к гербициду глифосат и его коммерческим аналогам, выводы которой основываются на результате анализа данных Досье, представленных Заявителем (ГУО «Белорусский государственный университет»), Эксперт (ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси») считает, что суммарный экологический риск и риск для здоровья человека при выращивании трансгенной линии рапса для технических целей оценивается как **«средний»**, при соблюдении следующих условий: должны быть разработаны и четко соблюдаться инструкции по выращиванию трансгенной линии, в которых должны быть прописаны меры, препятствующие распространению ГМ-линии, а также разработаны и четко соблюдаться инструкции по размещению посевов, уборке, транспортировке и хранению трансгенной линии. В инструкциях по хранению ГМ-линии должны быть четко прописаны условия, препятствующие ее смешиванию с нетрансгенными сортами рапса. Расстояние от ульев каждого из краев поля выращивания ГМ-рапса должно составлять не менее 2,5 км. Должен быть утвержден и применяться метод мониторинга – ПЦР-РВ к целевому гену.

ВЫВОДЫ О ДОПУСТИМОСТИ (НЕДОПУСТИМОСТИ) ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ТРАНСГЕННОЙ ЛИНИИ РАПСА СО ВСТРОЕННЫМ ГЕНОМ *aroA* В ОКРУЖАЮЩУЮ СРЕДУ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЦЕЛЯХ

Представленная Заявителем трансгенная линия рапса со встроенной последовательностью гена *aroA*, обеспечивающей устойчивость к гербициду глифосат, может быть выпущена в окружающую среду для выращивания для технических целей при неукоснительном соблюдении условий, указанных в Заключении.

Руководитель Национального
координационного центра
биобезопасности Института генетики
и цитологии НАН Беларуси, к.б.н.



Мозгова Г.В.

Заведующий лабораторией
генетической и клеточной инженерии
Института генетики
и цитологии НАН Беларуси,
к.б.н., доцент



Лемеш В.А.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Постановление Совета Министров Республики Беларусь «Об оценке рисков в генно-инженерной деятельности и выдаче разрешительного документа» от 12 июня 2019 г. №382 // Электронный ресурс. Режим доступа: <http://www.biosafety.by/wp-content/uploads/2019/07/Postanovlenie-Sov-Mina-382.pdf> / Дата доступа - 1.08.2019.

2. Руководство по оценке рисков в отношении живых измененных организмов» // Электронный ресурс. Режим доступа: <https://www.cbd.int/doc/meetings/bs/mop-08/official/bs-mop-08-08-add1-en.pdf> / Дата доступа - 1.08.2019.

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 Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 54. // Электронный ресурс. 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) / Дата доступа – 1.08.2019.

6. Механизм посредничества по биобезопасности. – Режим доступа: <http://bch.cbd.int/> / Дата доступа – 1.08.2019.

7. Международная служба по сбору агробиотехнологических разработок. - Режим доступа: <http://www.isaaa.org/> / Дата доступа – 1.08.2019.

8. Информация об оценке риска возможных вредных воздействий генно-инженерных организмов – трансгенного рапса – на здоровье человека и окружающую среду, а также о мерах по предупреждению такого риска. Электронный ресурс. Режим доступа: http://www.biosafety.by/wp-content/uploads/2019/04/Dose_raps.pdf / Дата доступа - 2.08.2019.

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. Республиканское объединение «Белсемена». Каталог семян. Электронный ресурс. Режим доступа: – <http://robelsemena.by/d/96397/d/katalog-semyan.pdf> / Дата доступа - 1.08.2019.

11. Биотехнология. Биобезопасность. Биоэтика / А. П. Ермишин [и др.]. – Минск: Тэхналогія, 2005. – 430 с. Электронный ресурс / Национальный координационный центр биобезопасности. – 2005. – Режим доступа: <http://www.biosafety.by/wp->

[content/uploads/2018/02/7DDCE_ermishin_a_p_biotehnologiya_biobezopasnost_bioetika.pdf](#) / Дата доступа: 01.08.2019.

12. Растениеводство. Масличные и эфирномасличные культуры: пособие / О. С. Ключкова, О. Б. Соломко. – Горки: БГСХА, 2015. – 92 с.

13. Данные Международной службы по сбору агробиотехнологических разработок об одобренных к выпуску в окружающую среду и/или для употребления в пищу/ кормления животных устойчивых к гербицидам линий рапса. Электронный ресурс - Режим доступа <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/advsearch/default.asp?CropID=2&TraitTypeID=1&DeveloperID=Any&CountryID=Any&ApprovalTypeID=Any> / Дата доступа – 02.08.2019.

14. Данные по одобренным заявкам и категориям выпуска Механизма посредничества по биобезопасности. Организм – *Brassica napus*. – Режим доступа: <http://bch.cbd.int/database/results?searchid=631185> / Дата доступа – 02.08.2019.

15. Постановление 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 (в ред. постановления Минприроды от 31.05.2019 № 11). Электронный ресурс. - Режим доступа: <http://www.biosafety.by/wp-content/uploads/2019/07/Minprirody-56.pdf> / Дата доступа – 28.08.2019.

16. FAO specifications and evaluations for agricultural pesticides. Glyphosate. N-(phosphonomethyl)glycine / FAO. – 2016. – 72 p. Электронный ресурс. - Режим доступа: http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/Glyphosate_2016_02_10.pdf / Дата доступа – 02.08.2019.

17. Glyphosate / M. Watts [et al.] // Pesticide Action Network International. – 2016. – 95 p. // Электронный ресурс. - Режим доступа: <http://pan->

international.org/wp-content/uploads/Glyphosate-monograph.pdf / Дата доступа – 02.08.2019.