

## ИНФОРМАЦИЯ

об оценке риска возможных вредных воздействий генно-инженерных организмов, относящихся к высшим растениям (голосеменным и покрытосеменным) – трансгенной формы картофеля с генами антимикробных пептидов цекропин-мелиттинового типа – на здоровье человека и окружающую среду, а также о мерах по предупреждению такого риска

1.1. Полное название:

семейство – *Solanaceae*;

род – *Solanum*;

вид – *Solanum tuberosum*;

подвид – *tuberosum*;

сорта – Одиссей (линии Одиссей а, Одиссей с), Скарб (линии Скарб п, Скарб l), Ветразь (линия Ветразь z);

обычное название – картофель.

1.2. Информация, касающаяся особенностей размножения:

способ(ы) размножения – вегетативный и половой;

специфические факторы, влияющие на размножение – семенное размножение картофеля требует специальных условий, ограничено и используется только в селекционной работе;

время произведения потомства – для использования в хозяйственной деятельности картофель выращивают в виде клубней в течение вегетационного периода с мая по сентябрь;

половая совместимость с другими культивируемыми или дикими видами – полная половая несовместимость с другими культивируемыми видами картофеля и очень низкая совместимость с дикими видами картофеля, которые в Беларуси не произрастают.

1.3. Выживаемость в окружающей среде:

способность образовывать структуры для выживания или переходить в состояние покоя – клубни картофеля после созревания переходят в состояние покоя и хранятся в специальных хранилищах при плюсовой температуре; оставшиеся в почве не убранные во время уборки клубни могут сохраняться и прорасти на следующий год;

специфические факторы, влияющие на выживаемость – температура и влажность воздуха, степень заражения нематодами, колорадским жуком и поражения фитопатогенными микроорганизмами.

1.4. Рассеивание:

пути и степень рассеивания – рассеивание картофеля естественным путём возможно на небольших площадях, но практически не происходит;

специфические факторы, влияющие на рассеивание – степень контроля со стороны человека за полнотой сборки урожая и уничтожения семян вместе с вегетативной массой в процессе уборки картофеля.

#### 1.5. Географическое распространение:

большинство стран мира; одна из основных сельскохозяйственных культур в Беларуси; дикие виды картофеля в естественных условиях произрастания встречаются только в Южной (Перу, Чили, Боливия, Аргентина) и Центральной (Мексика, Гватемала) Америке.

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

в естественных условиях в Беларуси не произрастает; наиболее значимые факторы для сельскохозяйственного выращивания – состав почвы (супесчаные почвы, а также лёгкие и средние суглинки), освещённость (светлюбивая культура), применение удобрений, температура для прорастания (+ 8-10 °С); основные вредители – нематоды и колорадский жук (*Leptinotarsa decemlineata*); возбудителями болезней – вирусы, грибные и бактериальные патогены, вириды и микоплазмы; наиболее вредоносные болезни – фитофтороз, рак картофеля, различные вирусозы, ризктониоз, парша клубней, чёрная ножка и другие.

#### 1.7. Потенциально значимое взаимодействие с организмами, отличными от растений, в экосистемах, характерных для обычного произрастания, включая информацию о токсичности для людей, животных или других организмов:

картофельные клубни используются для питания человека и многих животных и не являются токсичными, однако при хранении клубней на свету в них накапливаются токсичные гликоалкалоиды, например, соланин.

Более полная информация о биологических особенностях картофеля как реципиентного организма представлена в Консенсусном документе OECD по биологии картофеля [1].

#### 2. Информация о биологических особенностях организмов доноров

В геном картофеля встроены гены для синтеза искусственных рекомбинантных молекул, полученных на основе пептидов 2-х донорных организмов – личинки североамериканского шелкопряда и пчелы медоносной.

##### 2.1. Полное название:

1) семейство – *Saturniidae*

род – *Hyalophora*;

вид – *Hyalophora cecropia*;

обычное название – личинка североамериканского шелкопряда;

2) семейство – *Apidae*,

род – *Apis*,

вид – *Apis mellifera*,

обычное название – пчела медоносная;

##### 2.2. Происхождение организмов доноров:

происхождение и ареал распространения *Hyalophora cecropia* – Восточные и Северные США; центр происхождения рода *Apis* – юго-восточная Азия, ареал распространения *Apis mellifera* – на всех 5 континентах мира более 100 лет;

### 2.3. Биологические характеристики организмов доноров

Семейство павлиноглазок (*Saturniidae*) объединяет свыше 1200 видов, распространенных почти повсеместно. Тропические павлиноглазки относятся к самым крупным бабочкам мира. У многих бабочек большие глазки и прозрачные «окошечки», без чешуек на крыльях. Такие приспособления помогают избежать нападения. Хоботок недоразвит или практически отсутствует, поэтому бабочки не способны питаться и живут очень недолго – обычно четыре-пять дней, а бывает, и того меньше. Перистые усики павлиноглазок на редкость чувствительны. Самцы улавливают феромоны самок на расстоянии в несколько километров. Гусеница, пройдя последнюю линьку, плетет плотный шелковый кокон, в котором она окукливается. Кокон некоторых павлиноглазок используются для получения натурального шелка в текстильной промышленности. *Hyalophora cecropia* — самый известный представитель североамериканского рода *Hyalophora* в который входят четыре вида. Размах крыльев *Hyalophora cecropia* достигает 16 см. На юге Канады и в США бабочки летают с марта по июнь, далее к югу встречаются редко. Самки откладывают яйца на листья широколиственных деревьев, как, например, клен, яблоня, ива, а также берёза, вишня и др. *Hyalophora cecropia* — одна из немногих павлиноглазок, у которой на крыльях нет прозрачных «окошечек». Ее окраска зависит от температуры, при которой проходило развитие куколки. Чем выше температура, тем ярче красно-бурая окраска бабочки. Иммунная система гигантского шелкопряда *Hyalophora cecropia* как и других насекомых, основана на действии катионных антимикробных пептидов. Антимикробные пептиды – цекропины впервые были выделены из гемолимфы куколок *Hyalophora cecropia*.

Медоносная пчела – вид общественных пчёл, биологические особенности которых хорошо известны. С древних времён люди разводят медоносных пчёл для получения продуктов пчеловодства: воска, мёда, яда, прополиса, перги и других. С развитием сельского хозяйства росла роль пчёл как естественных опылителей растений. Мелиттин – катионный пептид, состоящий из 26 аминокислот, являющийся основным компонентом пчелиного яда и обладающий свойствами поверхностно-активного вещества. Помимо антибактериальных, радипротекторных, аникоагулянтных и др. свойств мелиттин обладает гемолитической активностью.

### 3. Биологические особенности вектора

3.1. Природа и происхождение вектора, естественная среда обитания и соответствующие характеристики безопасности

Векторные системы для генетической трансформации картофеля получены на основе Ti-плазмиды грамотрицательной почвенной бактерии *Agrobacterium tumefaciens*, существующей в ризосфере растений. T-область почвенной бактерии способна встраиваться в геном растений и содержит, в

частности, онкогены, вызывающие корончатые галлы у двудольных растений. Бинарные векторные системы, используемые для агробактериальной трансформации, не содержат онкогенов. Они состоят из бинарного вектора, несущего в T-области маркерные и целевые гены, а также плазмиду-помощник, несущую гены вирулентности для встраивания T-области в геном растения. Агробактериальная векторная система для генетической трансформации растений не обладает функциями для естественного встраивания T-ДНК в ДНК организмов, отличных от растений. Наличие клеток агробактериальных штаммов в клубнях трансгенных линий, используемых для выпуска в окружающую среду, исключено.

3.2. Структура транспозонов, промоторов и других некодирующих генетических сегментов, использованных для создания генетической конструкции, необходимых для ее переноса и функционирования в реципиентном организме

Генетические конструкции получены на основе бинарного вектора pBIΔGUS1 [2], полученного из плазмиды pBI121, GenBank AF485783 (рисунок 1) [3, 4]. Бинарные векторы способны реплицироваться в клетках как *E. coli*, так и агробактерий. Вектор pBI121 получен на основе широко используемого бинарного вектора pBIN19 [5, 6], который сконструирован на базе плазмиды pRK252 с широким кругом хозяев, а также содержит ген *nptIII* неомизинфосфотрансферазы III (NPTIII) плазмиды pJH1 *Streptococcus faecalis*, определяющий устойчивость к канамицину при селекции в клетках *E. coli* [7]. T-область плазмиды pBI121 (переносимый в геном растений фрагмент вектора) ограничена повторами из Ti-плазмиды нопаинового типа pTiT37. T-область содержит экспрессируемые в клетках растений ген *nptIII* неомизинфосфотрансферазы II [8] под контролем промотора гена нопаинсинтетазы (NOS) [9] и химерный ген *uidA* β-D-глюкуронидазы (GUS) [10] с промотором вируса мозаики цветной капусты CaMV35S (размер промотора 835 пн) [4]. Оба вышеуказанных гена имеют терминирующие последовательности гена *nos* [4]. В T-области также имеются полилинкеры, позволяющие встраивать фрагменты ДНК между генами *nptIII* и *uidA* (GUS) до (апстрим) и после (даунстрим) промотора CaMV35S. Сайты полилинкера PstI и SphI не являются уникальными. Размер вектора pBI121 составляет 14758 пн, размер T-области – 6192 пн [4]. При использовании pBI121 встроенная под контроль CaMV35S последовательность синтезируется в составе системы слитой экспрессии с геном GUS. Плазида pBIΔGUS1 получена из pBI121 путём удаления кодирующей части гена GUS (β-D-глюкуронидазы) по сайтам SmaI и Ecl136II и переориентации кассеты для экспрессии синтетических генов в растениях относительно сайта репликации в *E. coli*, локализованного в T-области векторов, полученных на основе pBIN19 (рисунок 2). Кассета экспрессии синтетических генов в клетках растений (HindIII/EcoRI-фрагмент T-области) клонирована по SmaI-сайту рестрикции полилинкера pBI121. Вектор pBIΔGUS1 обеспечивает конститутивную экспрессию клонированной последовательности под контролем промотора вируса мозаики цветной капусты CaMV 35S.

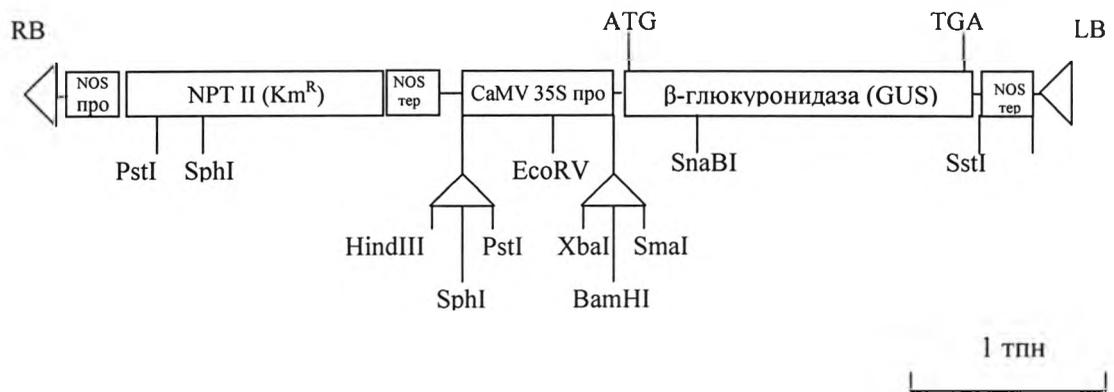


Рисунок 1 –Строение Т-области бинарного вектора pBI121 [3]

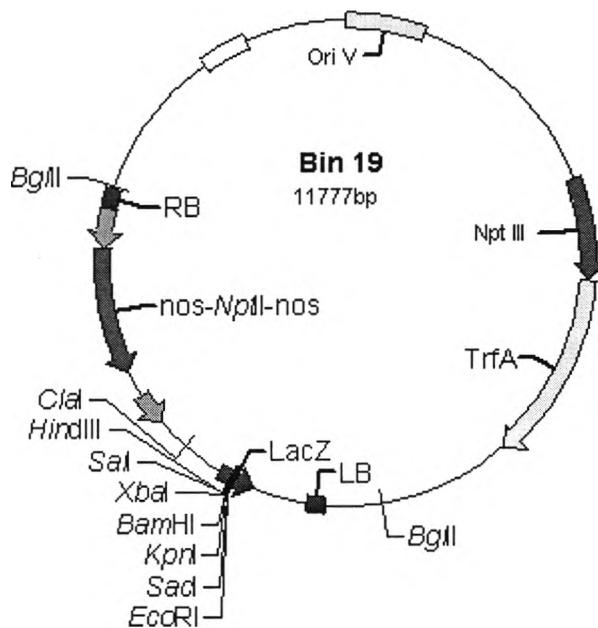


Рисунок 2 –Схема вектора pBIN19

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

Встроенная в геном растений Т-ДНК вектора свойствами мобильности или переноса в другие организмы не обладает. Перенос Т-ДНК из генома трансгенного картофеля в другие растения возможен только в процессе переопыления с сортами культурного картофеля (см п. 1.4). Вероятность горизонтального переноса Т-ДНК в геномы других организмов, отличных от высших растений, ничтожно мала. Кроме того, искусственные гены содержат растительные регуляторные генетические элементы (промоторы и терминаторы транскрипции) и не могут экспрессироваться в клетках млекопитающих и человека с использованием вышеуказанных сигналов транскрипции. Однако гены из Т-области векторов на основе рВ1121 могут экспрессироваться в клетках бактерий вследствие возможной сквозной транскрипции с промотора гена *lacZ* бинарного вектора (см схему вектора рВ1119, на основе которого сконструирован рВ1121) с последующей инициацией трансляции с инициаторных кодонов этих генов. Для получения трансгенной формы картофеля с генами антимикробных пептидов был использован вектор с переориентированной кассетой экспрессии, что исключает возможность транскрипции целевого гена под контролем бактериального промотора.

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

Организмом-хозяином бинарной векторной системы для агробактериальной трансформации растений являются клетки агробактерий искусственно созданных агробактериальных штаммов. Возможен искусственный (с участием человека в условиях лаборатории) перенос агробактериальной векторной системы в другие отличные от агробактерий бактериальные штаммы без изменения растительной природы ДНК-мишени для трансформации и со значительным снижением функциональной активности вектора.

4. Информация, относящаяся к характеру генно-инженерной модификации

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

С целью конструирования синтетических генов антимикробных пептидов цекропин-мелиттинового типа для экспрессии в растениях были подобраны соответствующие нуклеотидные последовательности с учётом частоты встречаемости кодонов у *Solanum tuberosum*, содержащие иницирующие и стоп-кодоны, а также сайты XbaI и BamHI для клонирования в полилинкер кассеты для экспрессии в растениях бинарных векторов на основе рВ1121. Нуклеотидные последовательности MsrA1 и СЕМА были синтезированы ЗАО "Евроген Ру" (г. Москва).

Удаление кодирующей последовательности гена GUS из вектора рВ1121 проводили путём рестрикции по сайтам SmaI и Ecl136II, самолигирования оставшейся части вектора с получением плазмиды рВ1ΔGUS. В результате

работы по конструированию векторов с генами антимикробных пептидов на основе рВІΔGUS было обнаружено, что продукты экспрессии таких векторов обладают токсичным действием по отношению к клеткам *E.coli*, вероятно, в результате сквозной транскрипции с промотора гена *lacZ* рВІN19. Клонирование такого вектора с генами АП в клетках бактерий возможно, если ген для синтеза антимикробного пептида будет встроен в противоположной ориентации. Для этого был сконструирован вектор рВІΔGUS1 с “переориентированной” кассетой для конструирования химерных генов, экспрессируемых в клетках растений. Так как для конструирования вектора с переориентированной кассетой необходимо значительное количество ДНК фрагмента, несущего кассету экспрессии, то кассета экспрессии из плазмиды рВІΔGUS была переклонирована в вектор небольшого размера рUC57 по сайтам *Ecl136* и *HincIII* с последующим переклонированием в бинарный вектор. С целью наработки фрагмента, соответствующего кассете экспрессии, ПЦР- продукт размером 1,2 тпн, полученный с помощью праймеров BINS (5'– aaacagctatgaccatgatt), BINA (5' – acgacgttgtaaaacgacgg) на матрице ДНК плазмиды рВІΔGUS, гидролизовали эндонуклеазами рестрикции *HindIII* и *EcoRI*, а затем выделяли из геля и очищали с помощью GFX-колонок (“Amersham”). Затем фрагмент с кассетой экспрессии обрабатывали с использованием фрагмента Клёнова с целью получения “тупых” концов, и лигировали с дефосфорилированным вектором. Продуктами реакции трансформировали клетки штамма DH5α и отбирали клоны на среде с ампициллином. Затем методом ПЦР с праймерами M13R (5'– caggaaacagctatgac), рBIS (5'– catttcatttggagagaacacg) отбирали клоны, несущие плазмиду с необходимой ориентацией вставки. Ожидаемый размер ПЦР-продукта около 400 пн. Из клеток отобранных клонов была выделена плазмидная ДНК вектора, названного рUC-СаMV. Далее была проведена переориентация кассеты экспрессии вектора рВІΔGUS. Для этого ДНК этого вектора, а также вектора рUC-СаMV обрабатывалась рестриктазами *EcoRI* и *HindIII*, выделялись необходимые фрагменты, лигировались. Продуктами реакции лигирования трансформировали клетки штамма DH5α [11] и отбирали клоны на среде с канамицином. Наличие вставки подтверждали методом ПЦР с праймерами BINS, BINA и PBIS, BINS. В результате были отобраны клоны, несущие вектор рВІΔGUS1, для которых наблюдался положительный ПЦР-сигнал с праймерами BINS, BINA в области 1200 пн и PBIS, BINS в области 340 пн (ожидаемые размеры ампликонов). Из клеток отобранных клонов была выделена плазмидная ДНК вектора рВІΔGUS1 с переориентированной кассетой экспрессии. Вектор рВІΔGUS1 обеспечивает конститутивную экспрессию клонированной последовательности под контролем промотора вируса мозаики цветной капусты СаMV 35S, в то время как при использовании рВІ121 клонированная последовательность синтезируется в составе системы слитой экспрессии с геном GUS.

Нуклеотидные последовательности MsrA1 или СЕМА встраивали в бинарный вектор рВІΔGUS1 по сайтам полилинкеров – *XbaI* и *BamHI* с

целью получения плазмид pBI-MsrA1 и pBI-CEMA, а также pBIΔGUS1-MsrA1 и pBIΔGUS1-CEMA. Работа состояла из следующих этапов: 1) выделение плазмидной ДНК и её гидролиз по сайтам XbaI и BamHI, очистка целевых фрагментов с помощью GFX-колонок (Амершам); 2) лигирование выделенных фрагментов с бинарным вектором, обработанным эндонуклеазами XbaI и BamHI и очищенным с помощью GFX-колонок; 3) трансформация клеток *E.coli* (DH5 α) а также *Agrobacterium tumefaciens* (штамм AGL0 [12], получен из штамма EHA101 [13], pTiBo542с делецией T-области, супервирулентный). Бактериальные клетки, трансформированные полученным вектором, отбирали на среде с канамицином, наличие плазмиды с кассетой для синтеза антимикробного пептида определяли методом ПЦР с праймерами PBIS, BINS. Размеры ПЦР-продуктов определялись методом электрофореза в агарозном геле и соответствовали ожидаемым (450 пн для CEMA и 465 пн для MsrA1).

Для переноса векторных систем в растения картофеля сортов Скарб, Одиссей, Ветразь был использован метод трансформации посредством векторных молекул на основе плазмиды Ti-бактерий *Agrobacterium tumefaciens*, наиболее часто используемый в случае трансформации двудольных растений, к которым относится культурный картофель.

В качестве материала для агробактериальной трансформации использовали вегетативное потомство оздоровлённых растений картофеля сортов Скарб, Одиссей, Ветразь, регенерированных из меристемной ткани, полученных из РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству».

Трансформацию растений картофеля осуществляли методом инокуляции эксплантов растений агробактериями согласно методике *Beaujean et al., 1998* [14] с некоторыми изменениями. В качестве эксплантов использовали фрагменты междоузлий без пазушных почек 3–4-недельных растений картофеля, выращенных *in vitro*. Использовали стеблевые экспланты с шести верхних междоузлий растения. В одном эксперименте использовали в среднем 60 эксплантов, которые культивировали в чашках Петри. Инокулятом служила ночная культура агробактерий, выращенная в жидкой среде УЕВ без антибиотиков, которую затем разводили в жидкой среде УЕВ в соотношении 1:10. Экспланты инокулировали в течение 30 мин, затем подсушивали на стерильном фильтре и помещали на чашки Петри со средой для каллусообразования СИМ (callus inducing medium) следующего состава: стандартная агаризованная среда Мурасиге-Скуга (МС) с витаминами [15], сахароза – 30 мг на л, агар – 0,8%, бензиламинопурина (БАП) – 1 мг на л, нафтилуксусная кислота (НУК) – 0,1 мг на л, гибберелловая кислота (ГА<sub>3</sub>) – 0,1 мг на л. Экспланты культивировали при температуре 20–21 °С, накрыв чашки фильтровальной бумагой. После 3 дней сокультивации экспланты помещали на среду СИМ с добавлением антибиотиков: тиментина (150 мг на л) и канамицина (25 мг на л). Экспланты культивировали в условиях 16-часового светового периода при освещенности

с 16-часовым фотопериодом ( $200 \text{ мкм м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ ; лампы LF 35W/54-765), Philips, Польша) и температуре  $19\text{--}21^\circ\text{C}$ . После 7–12 дней культивации экспланты с хорошо сформированным каллусом переносили на среду SIM (shoot inducing medium), стимулирующую побегообразование. В основе среды SIM – среда МС с витаминами, гормонами (БАП – 1 мг на л, ГАЗ – 0,1 мг на л) и антибиотиками (канамицин – 25 мг на л, тиментин – 100 мг на л). Образовавшиеся побеги высотой 1–2 см переносили в пробирки со средой для укоренения RIM (root inducing medium) на основе среды МС с витаминами, гормоном НУК (0,1 мг на л) и антибиотиками (канамицин – 25 мг на л, тиментин – 100 мг на л). Отобранные на селективной среде трансформированные побеги пересаживали на среды для укоренения, содержащие канамицин в концентрации 50 мг/л.

Дальнейший отбор полученных после трансформации регенерированных растений проводили методом ДНК- и кДНК-ПЦР. В случае кДНК-ПЦР для получения кДНК-матрицы использовали олиго dT<sub>18</sub> праймер, что позволяет определять только полиаденилированные транскрипты. Использовали праймеры как на маркерный ген NPTII; так и на синтетический ген и кодирующую последовательность АП.

Отобранные трансгенные растения не отличались от контрольных по морфологическим характеристикам *in* и *ex vitro*.

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

Цель генетической модификации – включение в геном реципиентного организма и активность в нем химерных генов для синтеза антимикробных пептидов цекропин-мелиттинового типа СЕМА и MsrA1.

Антимикробные пептиды цекропин-мелиттинового типа СЕМА (*Met-Lys-Trp-Lys-Leu-Phe- Lys- Lys-Ile-Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Val-Leu- Thr- Thr-Gly- Leu-Pro-Ala-Leu- Lys- Leu- Thr- Lys*) [16] и MsrA1 (*Met-Ala-Leu-Glu-His-Met-Lys-Trp-Lys-Leu-Phe- Lys- Lys-Ile-Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Val-Leu- Thr- Thr- Gly- Leu-Pro-Ala-Leu- Lys- Leu- Thr- Lys*) [17] являются искусственными рекомбинантными молекулами, разработанными с помощью молекулярного моделирования, содержащие 8 N-концевых аминокислот цекропина А насекомых, 18 C-концевых аминокислот мелиттина пчёл, а также 2 дополнительных положительно заряженных аминокислотных остатка на C-конце молекулы.

Пептид MsrA1 отличается от СЕМА наличием дополнительной последовательности *Met-Ala-Leu-Glu-His* на N-конце молекулы. Кодонный состав нуклеотидных последовательностей АП СЕМА (ATGAAGTGGAAGCTTTTAAAGAAGATTGGAATTGGAGCTGTTCTTAAGG TTCTTACTACTGGACTTCCTGCTCTTAAGCTTACTAAGTGA) и MsrA1 (ATGGCTCTTGAACATATGAAGTGGAAGCTTTTAAAGAAGATTGGAATTGGAGCTGT

TCTTAAGGTTCTTACTACTGGACTTCCTGCTCTTAAGCTTACTAAGTGA) был подобран с использованием свойств вырожденности генетического кода и Codon Usage Database в соответствии с частотой синонимичных кодонов для *Solanum tuberosum*.

Антимикробные пептиды цекропин-мелиттинового типа обладают высокой антибиотической активностью *in vitro* по отношению к широкому спектру микроорганизмов, включая грам-положительные и грам-отрицательные бактерии, а также грибные патогены. при низкой гемолитической активности [18]. Показана антибактериальная активность по отношению к бактериальным (*Erwinia carotovora*) и грибным (*Phytophthora cactorum*, *Fusarium solani*) фитопатогенам [16, 17, 19].

СЕМА (также известный под названием MBI-28 обладает более сильным абиотическим действием, однако может оказывать токсичное действие на растительные клетки. Наличие дополнительной последовательности *Met-Ala-Leu-Glu-His* на N-конце молекулы MsrA1 способствует уменьшению токсичности пептида для клеток растений с сохранением достаточного уровня антибиотической активности [19].

Анализ состава трансгенных конструкций методом секвенирования был проведён с использованием праймера BINS на матрицах, полученных методом ПЦР с праймерами BINS, BINA из препаратов суммарной растительной ДНК. В результате были отобраны линии трансгенных растений, содержащие гены с целевыми нуклеотидными последовательностями, идентичность которых при сравнении с нуклеотидными последовательностями АП СЕМА и MsrA1 (см стр. 9) с использованием инструментов BLAST составляла 100%. На рисунке 3 приведены примеры установленных последовательностей.

Размер встроенных в геном растений картофеля целевых нуклеотидных последовательностей составляет 90 пн для СЕМА и 105 пн для MsrA1.

Заявляемые трансгенные линии картофеля содержат по сравнению с исходными сортом вставки чужеродной ДНК, которые, помимо кодирующих последовательностей в составе гибридных генов для синтеза антимикробных пептидов СЕМА и MsrA1, включают генетический материал, представленный в таблице 1. Все перечисленные в таблице организмы не являются опасными для здоровья человека (по классификации ВОЗ).

Маркерный ген устойчивости к антибиотику канамицину – *nptII* (*aphA2*) является наиболее часто используемым в практике генетической инженерии и является компонентом генома многих представленных на рынке коммерческих образцов ГИО [20]. Ген *npt II* выделен из транспозона Tn5 *E. coli* и кодирует фермент неомицинофосфотрансферазу II (амино-гликозид-3'-фосфотрансферазу II, АРН(3')II). Его экспрессия в растениях (при объединении *nptII* с промотором, активным в растительных клетках) обеспечивает им признак устойчивости к антибиотику канамицину. Кроме того, активность продукта гена *nptII*, фермента NPTII, в клетке придает ей А.

AAAAAANGAAAAGAACCGTTTTCCCAATCCCAACNGTNCTTTCCAAANGGCAAAG  
 NGGGAATTGATTGTGGATTACNTCCCGCTGGACGTAAANAGGATNAACGCACAATT  
 CCCANTATNCCTTTNGCAAGACCCTTTCCTCTTATATAAGGAAGTTCATTTTCATTTAG  
 GAGAGAACACGGGGGACTCTAGAATGAAGTGGAAGCTTTTTAAGAAGATTGGAATTG  
**GAGCTGTTCTTAAGGTTCTTACTACTGGACTTCCTGCTCTTAAGCTTACTAAGTGAGGA**  
 TCCCCCTCGAATTTCCCCGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGA  
 ATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCA  
 TGTAAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAG  
 AGTCCCGCAATTATACATTTAATGCGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAACCT  
 AGGATCNCNTNTCGCGNGGAAATCNTCTTTNCCCTGGGTGNGAGAAACGCNNGGCA  
 AACA

**Б.**

GCCCACCCNCNGAGGAGCATCCGTGAAAAAAGAAGACGGTCCCAACCACGTCTTCA  
 AAAGCAAGTGGATTGATGTGATACCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCC  
 ACTATCCTTCGCAAGACCCTTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTTCATTTGGAGAGAA  
 CACGGGGGACTCTAGAATGGCTCTTGAACATATGAAGTGGAAGCTTTTTAAGAAGATT  
**GGAATTGGAGCTGTTCTTAAGGTTCTTACTACTGGACTTCCTGCTCTTAAGCTTACTAA**  
**GTGAGGATCCCCCTCGAATTTCCCCGATCGNTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTT**  
 AAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTAC  
 GTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTT  
 ATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCG  
 CGCAAACCTAGGANNAATTATCGCGGGAAAAATCATTTNCCNCCNAGANGGNAAAA  
 ANNGCAGAGGAANCAACAAGCTTG

Рисунок 3 – Определение нуклеотидных последовательностей АП СЕМА и MsrA1, встроенных в каскету экспрессии вектора pBIΔGUS1 Последовательности из pBIΔGUS1-CEMA (А) и из pBIΔGUS1-MsrA1 (Б) выделены полужирным курсивом.

Таблица 1 – Генетические элементы, входящие в состав трансгенных вставок у линий картофеля с генами антимикробных пептидов цекропин-меллитинового типа

№ п/п	Генетический элемент	Происхождение	Функция
1	Кодирующая последовательность антимикробного пептида цекропин-мелитинового типа MsrA1(или СЕМА)	Нуклеотидные последовательности, подобранные с учётом частоты встречаемости кодонов у <i>Solanum tuberosum</i> , кодирующие искусственные рекомбинантные молекулы	Целевой ген, белковый продукт которого обладает высокой антибиотической активностью <i>in vitro</i> по отношению к широкому спектру микроорганизмов,
	Продолжение таблицы	1	включая грам-
		антимикробных	

		пептидов	положительные и грам-отрицательные бактерии, а также грибные патогены
2	Ген <i>nptII</i> ( <i>aphA2</i> ) неоминфосфотрансферазы II устойчивости к антибиотику канамицину	Транспозон Tn5 <i>E.coli</i>	Маркерный ген для селективного отбора трансформированных растений на средах с канамицином
3	35S-промотор вируса мозаики цветной капусты (CaMV)	Вирус мозаики цветной капусты	Обеспечивает конститутивную экспрессию целевого гена
4	Промотор гена нопалин-синтетазы	<i>Bacillus thuringiensis ssp</i>	Обеспечивает конститутивную экспрессию маркерного гена
5	Терминальная последовательность <i>polyA</i> гена нопалин-синтетазы	<i>Bacillus thuringiensis ssp</i>	Обеспечивает завершение транскрипции целевого и маркерного генов

признак устойчивости к родственным канамицину антибиотикам: неоминцину и гинетицину (G418). Фермент NPTII модифицирует структуру молекулы канамицина (фосфорилирует одну из его гидроксильных групп), вследствие чего канамицин утрачивает свои антибиотические свойства, а клетка приобретает признак устойчивости [21]. В результате специальных исследований показана безопасность NPTII для здоровья человека и животных [22]. 35S-промотор вируса мозаики цветной капусты (CaMV) является одним из наиболее часто используемых для обеспечения экспрессии встраиваемых генов в двудольных растениях. Это промотор типа конститутивных, ведущий к наработке существенных количеств белка экспрессируемого гена [23].

Таким образом, созданные и встроенные в геном растений картофеля генетические конструкции содержат элементы, выделенные из ДНК организмов, которые не относятся к категории опасных для здоровья человека. По своей структуре и функциям они соответствуют своему назначению. Потенциально опасных последовательностей в интегрированных в геном растений фрагментах ДНК нет.

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

Во встроеной ДНК каких-либо неизвестных последовательностей не выявлено. С использованием метода ПЦР с праймерами для различных участков Т-ДНК показано, что вставки ДНК содержат последовательности, соответствующие переносимому фрагменту Т-области бинарного вектора, необходимые для синтеза антимицробных пептидов, а также неомицинфосфотрансферазы.

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

Использование метода агробактериальной трансформации предполагает инкорпорацию вставки в хромосому реципиентного растения. Стабильность интеграции вставки в хромосомы заявляемых линий подтверждена с использованием метода ПЦР (наличие последовательностей целевого гена и гена *nptII* у их клубневого и семенного потомства поколения T1, см. 4.5 и 4.6).

4.5. Стабильность инкорпорации привнесенной ДНК в геном (плазмон) реципиентного организма

При оценке клубневого поколения заявляемых линий методом ПЦР-детекции генов для синтеза пептидов *MsrA1*(или *CEMA*) (см. 4.7), соответствующий фрагмент ДНК был выявлен у всех клубневых клонов, полученных от исходных трансгенных растений, что говорит о стабильной наследуемости целевого гена при вегетативном размножении всех заявляемых линий. Стабильность наследования трансгенной конструкции подтверждено также при оценке семенного потомства поколения T1.

4.6. Количество копий трансгенов

Сравнительная оценка полученных трансгенных линий картофеля методом ДНК-ПЦР-РВ с использованием праймеров на ген актина картофеля (эндогенный контроль) и ген неомицинфосфотрансферазы *NPTII* из Т-области бинарного вектора показала, что линии различаются между собой по количеству трансгенных вставок с кратностью до 2 раз. Корреляции относительного количества трансгенных вставок с относительными уровнями экспрессии целевых генов не обнаружено. При оценке семенного потомства поколения T1 характер генетического расщепления по трансгенному признаку соответствовал встраиванию трансгенной конструкции в одну и более хромосом. **Более точное число копий будет определено для перспективных трансгенных линии, отобранных в процессе испытаний на специальном полигоне.**

4.7. Описание методики обнаружения и идентификации встроенного фрагмента ДНК, чувствительность, надежность и специфичность этой методики.

Для обнаружения и идентификации встроенного фрагмента ДНК используется метод ДНК-ПЦР с праймерами, специфическими к кодирующим последовательностям пептидов MsrA1 и CEMA (MC2S, MC2A) и к последовательностям Т-ДНК, граничащим с кассетой для экспрессии АП в клетках растений (PBIS, BINS), таблица 2.

Таблица 2 – Праймеры для определения встроенного фрагмента ДНК

Наименование пары праймеров	Смысловой праймер 5'-3'	Антисмысловой праймер 5'-3'	Размер ПЦР-продукта, пн	
			MsrA1	CEMA
MC2S, MC2A	tggaagcttttaagaagattgg	aagcttaagagcaggaagtcaag	76	76
PBIS, MC2A	catttcatttgagagaacacg	aagcttaagagcaggaagtcaag	128	113
PBIS, BINS	catttcatttgagagaacacg	aaacagctatgaccatgatt	465	450

Режим амплификации в термоциклере “My cycler” (Био-Рад, США):

Денатурация 5 мин при 94 °С, далее 30 циклов (денатурация 30 сек при 94 °С; отжиг 30 сек при температуре 51 °С для MC2S, MC2A или PBIS, MC2A-праймеров и 55 °С для PBIS, BINS-праймеров; элонгация 15 сек при 72 °С), далее завершающая элонгация 15 мин при 72 °С. После ПЦР проводится горизонтальный электрофорез продуктов амплификации в агарозном геле с добавлением красителя SYBR Green I. Для PBIS, BINS-праймеров используется 1,7 %-агароза, для пар праймеров MC2S, MC2A и PBIS, MC2A концентрация агарозы составляет 5 %. Результаты разделения визуализируются при освещении гелей ультрафиолетовым светом с помощью трансиллюминатора или прибора для гель-документирования ( $\lambda_{детекции}=520$  нм). Размеры определяются путем сравнения с маркерными линейными фрагментами ДНК. Чувствительность метода: определение наличия трансгенной вставки в 100 нг суммарной растительной ДНК.

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

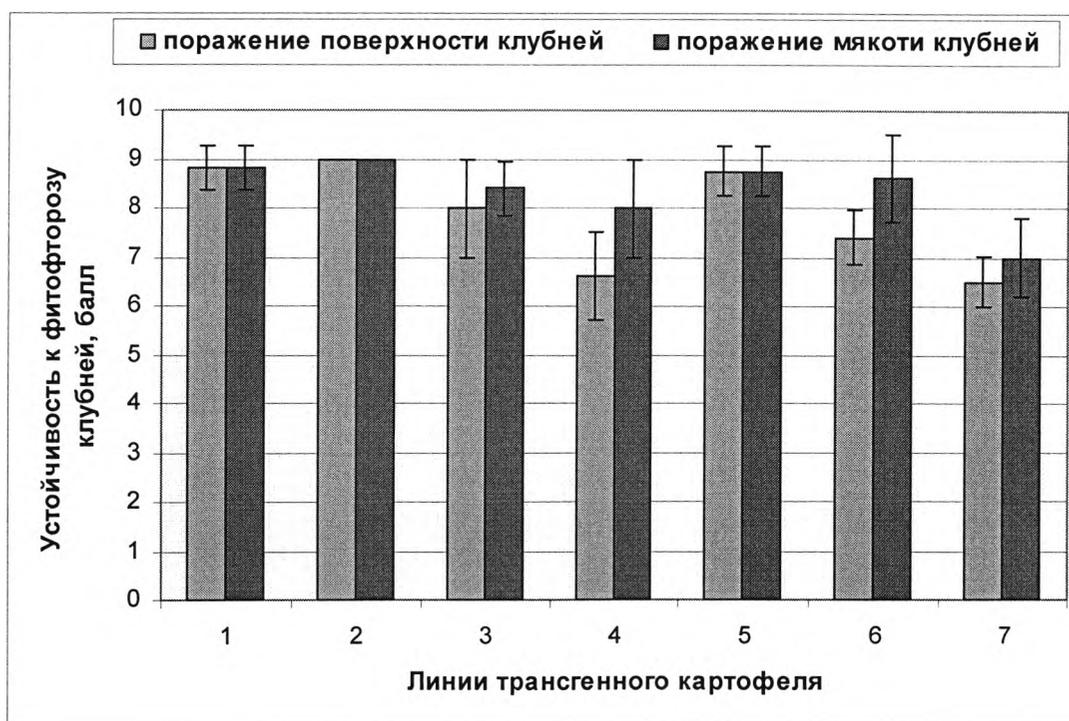
5.1. Описание генетических признаков или фенотипических характеристик, которые стали проявляться или перестали проявляться у ГИО по сравнению с реципиентным организмом

В генетическом отношении заявляемые трансгенные линии отличаются от реципиентного организма по двум генам, привнесённым в их геном в процессе трансформации. Соответственно, у заявляемых трансгенных линий имеется два новых признака, связанных с экспрессией встроенных генов для синтеза антимикробных пептидов цекропин-мелиттинового типа и гена *nptII*: устойчивость к фитопатогенным микроорганизмам [24] и устойчивость к антибиотику канамицину, обусловленная синтезом фермента неомидифосфотрансферазы. Каких-либо морфологических изменений у

трансгенных линий по сравнению с контрольными растениями не наблюдается.

### 5.2. Генетическая стабильность ГИО

Изучение наследования трансгенной вставки при вегетативном размножении показало их высокую генетическую стабильность (см п 4.5). В качестве критерия стабильности использовали устойчивость к селективному маркеру – канамицину для вегетативного потомства растений, выращиваемых на агаризованных средах, а также наличие положительных ПЦР-сигналов для целевого и маркерного гена. Кроме того, для двух поколений клубней показано наличие повышенной устойчивости к фитофторозу по сравнению с контрольными нетрансформированными образцами (рисунок).



1-6 – линии сорта Одиссей с экспрессией гена MsrA1, 7 – контрольное растение сорта Одиссей

Рисунок – Оценка устойчивости к заражению *Phytophthora infestans* 2-го поколения клубней трансгенного картофеля

### 5.3. Степень и уровень экспрессии трансгена(ов). Метод оценки экспрессии трансгена, его чувствительность

Наличие экспрессии трансгенов определяется методом РНК-ПЦР: для целевого гена – с праймерами MC2S, MC2A (см п. 4.7), для гена *nptII* – с праймерами NPTS (5' – cttgctcctgccgagaaagtatcc), NPTA (5' – cggcaagcaggcatcgccatgtgc). Для праймеров NPTS, NPTA размер ПЦР-

продукта составляет 264 пн [25]. Тотальная РНК выделяется из листьев с использованием реагента “TRIreagent” (Сигма) по протоколу фирмы-производителя, из клубней – с использованием высоких концентраций NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> и додецилсульфата натрия по методу Kumar et al., 2007 . Препараты кДНК готовятся с использованием обратной транскриптазы и олиго dT<sub>18</sub> праймера. Среднее количество кДНК в пробе для ПЦР соответствует 25-50 нг суммарной растительной РНК. Наличие мРНК транскриптов вышеуказанных трансгенов показано для всех заявленных линий. Количественный анализ экспрессии будет проведён для наиболее перспективной линий, отобранной в процессе полевых испытаний.

#### 5.4. Активность и свойства протеинов, кодируемых трансгенами

Целевыми донорными кодирующими последовательностями заявляемых трансгенных линий являются последовательности катионных антимикробных пептидов (КАП) цекропин-мелиттинового типа (см п. 2.2), которые в составе синтетического гена определяют синтез в растениях КАП MsrA1 или СЕМА). Данные КАП обладают антибиотической активностью в отношении фитопатогенных микроорганизмов, поражающих растения (см п. 2.3).

Было показано, что в препаратах суммарного белка, полученных для вегетативного потомства заявляемых линий, присутствуют пептиды размером около 3кДа, что соответствует размерам целевых антимикробных пептидов (размер пептида MsrA1 – 3,6 кДа, пептида СЕМА – 3,2 кДа).

Катионные антимикробные пептиды, синтезируемые в природе на рибосомах про- и эукариотических клеток (КАП) – класс макромолекулярных пептидных антибиотиков размером до 10 кДа с широким спектром антимикробного действия. Отличительные черты КАП – суммарный положительный заряд и амфифильность – обеспечивают основной механизм действия КАП, а именно, нарушение целостности биомембран и лизис клеток [26]. Реализация такого механизма действия существенно уменьшает вероятность появления резистентных штаммов патогенов. Кроме антибактериального и фунгицидного действия, некоторые антимикробные пептиды (АП) обладают антивирусной активностью, могут оказывать цитотоксическое действие, в частности, на клетки опухолей и сперматозоидов [26], или являться токсинами ядов, разрушающими мембраны не только про-, но и эукариотических клеток (например, мелиттин). Кроме того, КАП выполняют функции сигнальных молекул, митогенов; участвуют в процессах репарации тканей и др. [27, 28]. Катионные антимикробные пептиды многоклеточных организмов, прежде всего, участвуют в первичных реакциях защиты от патогенных микроорганизмов и являются частью врожденной иммунной системы [29]. Несмотря на существование природных КАП с довольно сильным антимикробным действием, поиск новых пептидов с более широким спектром активности и минимальной цитотоксичностью привел к созданию синтетических КАП. Синтетические гибридные пептиды цекропин-мелиттинового типа обладают антимикробной активностью, которая может в

100 раз превышать активность природного цекропина А насекомых [30]. При этом КАП цекропин-мелиттинового типа селективно действуют на прокариотическую мембрану, отличая ее от эукариотической, то есть не обладают существенной гемолитической активностью в отличие от полноразмерного мелиттина пчёл.

Ген *npt II* выделен из транспозона Tn5 *Escherichia coli* и кодирует фермент неоминфосфотрансферазу II (амино-гликозид-3'-фосфотрансферазу II, АРН(3')II. Активность NPTII в клетке придает ей признак устойчивости к родственным антибиотикам: канамицину, неоминцину и генетицину (G418). Канамицин, впервые выделенный из микроорганизмов в 1957 году, относится к классу сахаросодержащих антибиотиков. Это трисахарид, состоящий из молекулы дезоксистрептамина и двух молекул глюкозамина. Антибиотик взаимодействует с 30S и 50S субъединицами бактериальных рибосом и субъединицами рибосом митохондрий и хлоропластов растений, прекращая при этом процесс синтеза белка (что приводит в итоге к гибели клеток). Фермент NPTII модифицирует структуру молекулы канамицина (фосфорилирует одну из его гидроксильных групп), вследствие чего канамицин утрачивает свои антибиотические свойства, а клетка приобретает признак устойчивости [21]. История использования генетических вставок, ответственных за синтез ферментов, обеспечивающих устойчивость к антибиотикам (селективные факторы), в частности, гена *nptII*, свидетельствует об их доказанной биологической безопасности [22], поэтому в соответствии с принципами осведомленности (familiarity) и существенной эквивалентности, изучение биобезопасности этого элемента вставки не проводили.

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

Целевые гены находятся под контролем конститутивного промотора, поэтому антимикробные пептиды цекропин-мелиттинового типа образуются во всех частях растения.

5.6. История прежних генно-инженерных модификаций генно-инженерных организмов

В качестве реципиентных растений при получении заявляемых трансгенных линий картофеля были использованы интактные немодифицированные растения картофеля сортов Скарб, Одиссей, Ветразь.

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

Антимикробные пептиды цекропин-мелиттинового типа не представляют угрозы для позвоночных животных и человека при употреблении в пищу трансгенного картофеля, так как легко денатурируют при нагревании, в кислой среде желудка, быстро перевариваются желудочным соком.

Антимикробные пептиды MsrA1 и СЕМА были получены на основе последовательностей цекропина А насекомых и мелиттина пчёл. Целью конструирования было создание пептидов с минимальной токсичностью, обладающих при этом повышенными по сравнению с цекропином А антимикробными свойствами по отношению к анаэробным инфекциям человека. Поиск возможных белковых аналогов MsrA1 и СЕМА, относящихся к аллергенам или токсинам, с использованием баз данных UniProt and WHO-IUIS (приложение), как и следовало ожидать, показал наличие токсичности мелиттина пчёл и отсутствие таковой у цекропина, что соответствует известным данным. С другими известными аллергенами значительной гомологии не выявлено.

По литературным данным белковые продукты целевых генов в чистом виде при попадании в кровь являются безопасными для млекопитающих даже при концентрациях более чем в 20 раз превышающих действующие как при лечении анаэробных инфекций человека, так и для растительных фитопатогенов: пептиды цекропин-меллителинового типа не вызывают лизиса эритроцитов (>8%) в концентрации 200-600 мкМ [30-34]. Показано также, что при добавлении в корм для мышей трансгенного картофеля, синтезирующего антимикробный пептид MsrA1, не наблюдается токсичных эффектов [17].

Белковый продукт селективного гена имеет историю безопасного использования по отношению к здоровью человека и животных [20-22, 35].

Безопасность для здоровья человека и животных заявляемых линий была подтверждена также в опытах на лабораторных животных. Этот подход позволяет определить комплексное воздействие на живые организмы диеты, содержащей определенные ГМ-продукты, и выявить не только прямые, но и возможные неблагоприятные эффекты, связанные с непреднамеренными, опосредованными эффектами генетической модификации. Особый интерес представляют результаты изучения потенциальной репродуктивной токсичности ГМ-продуктов. Сложность феномена репродукции делает его уязвимым для неблагоприятных воздействий на любом этапе реализации функции. В связи с этим оценка репродуктивной токсичности является одним из интегральных критериев оценки биобезопасности ГМ-продуктов.

Институтом физиологии НАН Беларуси проведено исследование влияния диеты, содержащей трансгенный картофель заявляемых трансгенных линий, на эмбриональное развитие лабораторных животных (приложение). В качестве родителей использовались мыши двух-трех-месячного возраста линии Af, которые являлись родителями. Животные находились в стационарных условиях вивария при температуре  $22 \pm 1,0$  °C со свободным доступом к воде и пище. Они были произвольно разделены на группы (опытную, контрольную и интактную) и переведены на рационы с включением картофеля. Опытные группы получали с рационом ГМ картофель (30 % от рациона), контрольные – традиционный аналог (исходные сорта) в том же количестве. Интактный контроль включал в себя самок и их потомство, получавших обычный рацион без картофеля.

Исследования выполнены только для поколения F1. Общее состояние животных было удовлетворительным: по внешнему виду, качеству шерстного покрова, поведению и скорости роста животные опытной группы не отличались от животных контрольной группы и интактных животных. В результате показано, что кормление трансгенным картофелем с конструкциями для синтеза антимикробных пептидов цекропин-меллитинового типа, не влияет на пренатальное и постнатальное развитие потомства мышей линии Af. Значения почти всех показателей эмбрионального развития (за исключением массы печени) почти не отличались в опытной и контрольной сериях. Масса печени была достоверно выше во всех поколениях у мышей, в рацион которых входил как трансгенный, так и обычный картофель, превышая среднюю массу интактной группы в контрольной группе в 1,66 раза, а в опытной группе – в 2,35 раза. Так как достоверные изменения наблюдали также и в контрольной серии, то, очевидно, что они не связаны с тем, что в опытной серии картофель был трансгенным. Различия между опытной и контрольной группами по средней массе печени не были достоверными. Отличия от интактной группы можно объяснить увеличением калорийности рациона и сезонностью. Таким образом, оценка потенциальной репродуктивной токсичности изученных образцов трансгенного картофеля в опытах на лабораторных животных в поколении F1 не выявила достоверных различий их от исходных (немодифицированных) сортов. Полученные результаты находятся в соответствии с опубликованными данными по безопасности кормления лабораторных мышей трансгенным картофелем, содержащим антимикробный пептид MsrA1 [17]

Проведена также оценка протеомного статуса трансгенных линий растений картофеля с экспрессируемыми генами антимикробных пептидов цекропин-мелитинового типа, полученных на основе сортов белорусской селекции Ветразь и Одиссей. Не обнаружено существенных изменений в белковых профилях между трансгенными и контрольными растениями исходных сортов [36]. Показано, что в клубнях трансгенных линий наблюдается повышенное накопление белков семейства пататинов, что может быть следствием активации защитной системы растений под воздействием конститутивного трансгенного синтеза антимикробных пептидов [37].

5.8. Предлагаемые методы обнаружения и идентификации генно-инженерных организмов, их точность, чувствительность, надежность

Для выявления и идентификации трансгенных растений достаточно простым, надёжным и чувствительным, методом является применение ПЦР-анализа ДНК растений с использованием ДНК-праймеров (см п. 4.7). Метод РНК-ПЦР с использованием ДНК-праймеров является более дорогим и сложным, но при этом более чувствительным (см п. 5.3), так как копияемость мРНК-транскриптов существенно выше, а также позволяет выявлять транскрипционно-активный трансген.

6. Информация о потенциальной принимающей среде

6.1. Местоположение участка, где будет осуществляться высвобождение (область, район, населенный пункт, принадлежность земельного участка землевладельцу или землепользователю с его полным наименованием)

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

6.2. Близость к заповедникам, заказникам и другим природоохранным объектам и территориям

В районе расположения полигона и поблизости каких-либо природоохранных объектов и территорий нет.

6.3. Описание участка: размер и обработанность, климатическая, геологическая и почвоведческая характеристика, флора и фауна

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

6.4. Сравнение мест естественного обитания реципиентных организмов с предполагаемым местом высвобождения генно-инженерных организмов

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

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

Подготовка участка для посадки и технология выращивания заявляемых трансгенных линий картофеля ничем не отличаются от обычной подготовки почвы – вспашка трактором, боронование, окучивание посаженных растений. В случае необходимости участок может поливаться, поскольку на экспериментальном поле имеется водопроводная сеть.

7. Информация о взаимодействии генно-инженерных организмов с окружающей средой

7.1. Биологические особенности генно-инженерных организмов (по сравнению с интактными реципиентными организмами), которые могут оказывать влияние на выживаемость, размножение и распространение в потенциальной принимающей среде

В условиях *ex vitro* показано, что экспрессия АП сопровождается повышением устойчивости ботвы к заражению *P. infestans*, *A. solani* и *A.*

*alternata*, а также клубней к *P. infestans* (таблица 3). Для подтверждения наличия данной устойчивости уже проанализированных линий, а также тестирования линий, для которых не проводилось предварительное биотестирование *ex vitro*, необходимо провести полевые испытания в условиях специального полигона для трансгенных растений.

Положительные свойства заявляемых линий – повышенная устойчивость к фитопатогенным микроорганизмам будет способствовать повышению выживаемости и урожайности трансгенного картофеля по сравнению с исходным сортом.

Таблица 3 – Линии трансгенного картофеля с генами антимикробных пептидов, предназначенные для испытания на специальном полигоне для трансгенных растений.

Линия	Наличие трансгена	Устойчивость к фитофторозу ботвы, балл	Устойчивость к фитофторозу клубней, балл	Устойчивость к альтернариозу, балл	Устойчивость к <i>E. carotovora</i> , ботва*
Скарб п	<i>CEMA</i>	9	8,8/8,4	9	не проверялась
Скарб l	<i>Msr A1</i>	9	5,0/5,7	8	не проверялась
Одиссей а	<i>Msr A1</i>	8,8	2,7/7,1	9	не проверялась
Одиссей с	<i>Msr A1</i>	не проверялась	не проверялась	не проверялась	не проверялась
Ветразь z	<i>CEMA</i>	не проверялась	не проверялась	не проверялась	не проверялась

Примечание \* Предварительные результаты,  $p > 0,05$

Определение устойчивости трансгенного картофеля с генами КАП *MsrA1* и *CEMA* к возбудителю фитофтороза проводили путем заражения отделенных листьев, интактных растений и клубней.

Использовали листья растений *ex vitro*, выращенных в лабораторных условиях. При этом для оценки отбирали только боковые доли листьев без признаков повреждения, верхних 3-4 ярусов. При инкубации зараженных листьев создавали условия, благоприятные для развития патогена и в меньшей степени для самих листьев: высокая влажность, слабое освещение, перепад дневных и ночных температур. Оценку заражения проводили на 7 сутки инкубации, определяя балл заражения и соответствующую ему степень устойчивости по 9-балльной шкале. В результате были получены показатели, соответствующие очень высокой (9 баллов), высокой (8 баллов) и относительно высокой (7 баллов) устойчивости по сравнению с низкой устойчивостью у исходного типа. Повышение устойчивости трансгенных линий по сравнению с контролем определялось с достоверностью  $p < 0,05$ .

При определении устойчивости клубней заражению подвергали целые клубни картофеля без признаков повреждения, прошедшие период покоя.

В одном эксперименте для каждой линии использовали по 5 клубней. После 21 дня инкубации во влажной камере проводили учет поражения. Оценке подвергали 2 параметра: площадь поражения поверхности и степень поражения мякоти клубня на разрезе. В результате были получены пары показателей для каждой проанализированной линии. Анализ полученных

данных показал в целом достоверное повышение устойчивости ( $p < 0,05$ ) клубней трансгенных растений по сравнению с исходным типом. Для отдельных линий был показан очень высокий результат (9 баллов по 9-балльной шкале устойчивости). Кроме того, при сравнении показателей, полученных при оценке указанных параметров, была выявлена закономерность, заключающаяся в более высокой резистентности мякоти клубней по сравнению с поверхностью. Это может быть связано с более высоким содержанием антимикробных пептидов в запасающей ткани клубня.

Тестирование устойчивости трансгенного картофеля к альтернариозу проводили путем заражения отделенных листьев. В качестве инокулята использовали суспензию, содержащую смесь патогенов *A. solani* и *A. alternata*. Отбор листьев для заражения проводили по тем же правилам, что и для *P. Infestans*. Инфицированные листья инкубировали в течение 7 дней. После этого проводили учет заражения, оценивая площадь поражения листьев, интенсивность спороношения и соотнося эти показатели с величиной инкубационного периода. На основании полученных показателей рассчитывали индекс поражения и соответствующую ему степень устойчивости. Результаты представленные в таблице 3, соответствуют высокой и относительно высокой устойчивости проверенных линий трансгенного картофеля к альтернариозу.

Оценка способности растений цвести и завязывать ягоды проводилась в условиях специального модуля закрытого грунта. Образцы растений ряда индивидуальных трансгенных линий каждые 7 дней учитывали по наличию бутонов, цветов, завязыванию ягод. Соцветия накрывались изолятором из капрона для исключения перекрёстного опыления. Интенсивность цветения и способность завязывать ягоды заявляемых трансгенных линий соответствовала исходным сортам. Все трансгенные растения в условиях защищённого грунта завязывали клубни. Количество и размер клубней на одно растение у трансгенных растений на основе сортов Скарб, Одиссей и Ветразь было на уровне нетрансформированных контрольных растений. **Для дальнейшего анализа интенсивности цветения, бутонизации, образования семян и оценки урожайности необходимы полевые испытания в условиях специального полигона для трансгенных растений.**

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

На выживаемость и урожайность трансгенных линий, также как и реципиентного картофеля, могут оказывать влияние климатические условия в период вегетации, почва, способы её обработки, удобрения. Поскольку картофель является вегетативно размножаемой культурой, то рассеивания трансформированных растений происходить не будет.

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

Заявляемые трансгенные линии практически не отличаются от исходного сорта по морфологии куста, мощности растений. Благодаря устойчивости к фитопатогенным микроорганизмам трансгенные растения могут превосходить исходный сорт по конкурентоспособности в силу лучшей выживаемости и урожайности.

7.4. Вероятность проявления у генно-инженерных организмов в потенциальной принимающей среде нежелательных свойств, признаков  
Вероятность проявления нежелательных свойств и признаков у трансформантов картофеля незначительная.

7.5. Вероятность резкого увеличения численности популяции генно-инженерных организмов в потенциальной принимающей среде  
Картофель – культурное растение, которое размножается преимущественно вегетативно и не обладает способностью к выживанию вне культурных биоценозов в климатических условиях Беларуси. Заявляемые трансгенные линии не обладают свойствами, которые позволили бы им, в отличие от исходного сорта резко увеличить численность в окружающей среде.

7.6. способность к переносу генетической информации: наличие в потенциальной принимающей среде диких или культурных родственных видов, способных к гибридизации с генно-инженерными организмами, вероятность переноса трансгенов от генно-инженерных организмов к таким организмам

На территории Беларуси единственным дикорастущим родственным видом культурного картофеля является паслен черный (*Solanum nigrum* L.), не относящийся к серии *petota*. Данный вид является сорным растением, растущим в посадках культурного картофеля. Однако по данным литературы спонтанная гибридизация между *S. tuberosum* и *S. nigrum* с образованием жизнеспособных семян в естественных условиях отсутствует [1]. Возможно только получение межвидовых гибридов в экспериментальных условиях с обязательным искусственным выращиванием эмбриоидов на искусственных питательных средах. Проведенный Институтом генетики и цитологии НАН Беларуси эксперимент по опылению кастрированных цветков паслена смесью пыльцы трансгенных линий (опылено более 50 цветков) показал полное отсутствие завязываемости гибридных ягод и семян, что полностью согласуется с данными литературных источников. Таким образом, в условиях Беларуси можно полностью исключить возможность переноса трансгенов диким сородичам культурного картофеля.

Культурный тетраплоидный картофель *Solanum tuberosum* L относят к растениям-самоопылителям [1]. Однако возможно переопыление разных растений тетраплоидного картофеля посредством насекомых. Основными насекомыми-опылителями картофеля являются шмели, возможно также опыление единичными пчелами. При использовании шмелей в качестве насекомых-опылителей для повышения урожайности сельскохозяйственных растений-перекрестников рекомендуемое максимальное расстояние размещения ульев от поля, например клевера,

составляет 150 метров. Таким образом, размещение посадок трансгенного картофеля от нетрансгенного на расстоянии, превышающем 150-200 метров, может рассматриваться достаточным изолирующим фактором для предотвращения переноса пыльцы и, соответственно переноса чужеродного генетического материала, к немодифицированному картофелю.

Однако завязывание семян в результате переопыления трансгенных клонов с сортами культурного картофеля и распространение в окружающей среде гибридов не может иметь каких-либо негативных последствий для биологического разнообразия. Для посадки картофеля как вегетативно размножаемой культуры используют исключительно семенные клубни определенного сорта.

#### 7.7. Идентификация и описание организмов-мишеней продуктов трансгенов

Организмом-мишенью продуктов трансгенов являются бактериальные и грибные фитопатогенные микроорганизмы.

Среди заявленных линий картофеля с генами антимикробных пептидов присутствуют линии, обладающие повышенной устойчивостью к заражению *P. infestans*, *A. solani* и *A. alternata* (см таблицу 3).

Фитофтороз – самое вредоносное заболевание картофеля в большинстве стран мира. Возбудитель – фитопатогенный организм *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, относящийся к классу Oomycetes. Мицелий патогена распространяется внутри тканей растения-хозяина по межклеточному пространству. Симптомы болезни проявляются во всех органах растений. Поражаются листья, стебли, клубни, ростки, бутоны и ягоды. Главным источником инфекции служат больные растения в поле. Споры патогена разносятся дождем и ветром, попадают на здоровые кусты картофеля и заражают их. Источником инфекции могут стать остатки растений в почве. Клубни, как правило, заражаются от больной ботвы. Главная опасность болезни – это огромная скорость ее развития. Климатические условия Беларуси оптимальны для развития фитофтороза. При благоприятных погодных условиях численность популяций патогена растет экспоненциально, от единичных больных кустов через 10-15 дней может заразиться все поле, а за 2-3 недели растения могут быть полностью уничтожены. Применение фунгицидов, направленных на подавление развития *P. infestans* в вегетационный период, приводят к возникновению резистентных форм. При этом существует тесная зависимость между объемом применения системных препаратов в Беларуси и уровнем резистентности возбудителя. Ранее селекция картофеля, устойчивого к *P. infestans*, велась с использованием сортов, обладающих сверхчувствительным типом устойчивости. Однако впоследствии оказалось, что наличие R-генов обеспечивает высокую устойчивость только к некоторым расам патогена. По мере появления новых более сложных рас эта устойчивость ослабевает.

Альтернариоз – широко распространенное заболевание. Возбудителем болезни являются грибы рода *Alternaria*. Вначале патоген развивается в

ткани без видимых симптомов. Проявляется болезнь в фазе бутонизации растений и развивается в течение всего лета. Заболевание появляется на листьях, а затем распространяется на черешки и стебли.

В Беларуси альтернариоз проявляется в двух формах в зависимости от возбудителя [38]. *Alternaria solani* поражает листья, что ведет к появлению хлоротичных пятен, которые постепенно темнеют и приобретают коричневую окраску. Особенностью пятен является концентричность, которая заметна на верхней стороне листа. На стеблях заболевание проявляется в виде штрихов, которые, соединяясь, образуют сплошные пятна, вытянутые в длину. В природных условиях Беларуси заражение клубней картофеля *A. solani* не обнаружено. *Alternaria alternata* поражает листья, стебли, черешки и редко клубни. Образующиеся на листьях пятна, в отличие от поражения *A. solani*, лишены концентричности. На поврежденных клубнях болезнь проявляется в виде небольших коричневых или черных, слегка вдавленных пятен неправильной формы с четкими границами, с хорошо заметным бархатистым налетом спороношения гриба *A. alternata* усугубляет и довершает поражение, вызванное *A. solani*.

Перезимовка патогена происходит на растительных остатках в виде конидий или мицелия, которые и являются источником заражения. Инфицированные растения впоследствии сами становятся новыми источниками инфекции. Споры с пораженных участков листьев легко переносятся ветром на большие расстояния. Гриб легко проникает в ткани растения через эпидермис. Заражение молодых клубней обычно наступает во время сбора урожая при контакте со спорами на поверхности земли. Зрелые клубни подвержены заражению только при наличии раневых повреждений.

#### 7.8. Предполагаемый механизм и результат взаимодействия генно-инженерных организмов с организмами-мишенями

Заявляемые линии трансгенных растений синтезируют антимикробные пептиды цекропин-мелиттинового типа, относящиеся к классу катионных антимикробных пептидов (см п. 5.4). Результатом взаимодействия ГИО с организмами мишенями является комплексный эффект защиты картофеля от фитопатогенных микроорганизмов, а именно, от грибного, бактериального, а также, возможно, вирусного заражения как при выращивании, так и при хранении продовольственной, технической и семеноводческой продукции.

Известно, что в абсолютном большинстве цекропин-мелиттиновые гибриды повреждают клетки микроорганизмов, воздействуя на их мембрану. Что касается механизма действия, то здесь большое значение имеют такие параметры, как длина молекулы КАП и концентрация пептида в растворе, а точнее, значения соотношения количества КАП и липидов мембраны. При высокой концентрации пептида он действует согласно “ковровой” модели, выстилая отрицательно заряженную мембрану прокариотической клетки и действуя подобно детергенту. При более низких концентрациях цекропин-мелиттиновые пептиды встраиваются в мембрану, принимая конформацию  $\alpha$ -спирали, и образуют поры. Однако для формирования поры необходимо,

чтобы молекула пептида состояла не менее, чем из 22 аминокислотных остатков, иначе образуемая  $\alpha$ -спираль будет слишком коротка для проникновения через мембрану, толщина которой обычно составляет 32–38Å [39]. Более короткие молекулы также действуют по механизму “ковра”. В случае же порообразования наблюдается корреляция между концентрацией пептида, размером пор и активностью КАП: при более высокой концентрации формируются более крупные поры, что ведет к быстрой гибели клетки [40].

КАП селективно действуют на прокариотическую мембрану, отличая ее от эукариотической. Благодаря положительному заряду пептиды связываются с отрицательно заряженной прокариотической мембраной, а именно, с анионными фосфолипидами клеточной поверхности, такими как фосфатидилглицерол и кардиолипин, которые широко представлены в микроорганизмах. Клеточная мембрана млекопитающих, напротив, состоит главным образом из незаряженных фосфолипидов, таких как фосфатидилхолин и сфингомиелин, что обуславливает крайне слабое влияние АП на клетки млекопитающих [41]. Существуют данные о дополнительной адсорбции КАП в липидном компоненте мембраны эукариот. Связывание АП с мембраной в данном случае не приводит к формированию пор. Находясь в функционально неактивном состоянии, АП абсорбируются в области полярных головок липидного бислоя. Это позволяет им функционировать в качестве защитных молекул организма-хозяина [42].

КАП с фунгицидной активностью также могут вызывать нарушение проницаемости и (или) лизис клеточной стенки или нарушать синтез её компонентов [43].

7.9. Идентификация и описание организмов, не являющихся мишенями продуктов трансгенов, которые могут быть подвержены влиянию генно-инженерных организмов

Учитывая потенциально широкий спектр антибиотического действия антимикробных пептидов существует проблема возможного негативного влияния синтезируемых КАП цекропин-мелиттинового типа на установление ассоциативных связей между растениями и полезными для них микроорганизмами, которая до настоящего времени исследована недостаточно. Значительная часть микрофлоры листьев растений представлена метилотрофными бактериями. Метилотрофы способны утилизировать продукты жизнедеятельности растений в качестве источника углерода и энергии. Кроме того, метиловобактерии минерализуют галометаны, метилсернистые соединения и метилированные амины. Метилотрофы и метанотрофы могут принимать участие в развитии растений, обеспечивая их фитогормонами, витаминами и другими ростовыми факторами, что придает растениям повышенную устойчивость к различным биотическим и абиотическим стрессовым факторам [44].

7.10. Другие потенциально возможные взаимодействия генно-инженерных организмов с окружающей средой

Характер используемой генетической конструкции (отсутствие последовательности, кодирующей лидерный пептид для транспорта АП в межклеточное пространство) не предполагает значительной экскреции АП в окружающую среду.

7.11. Информация, касающаяся предполагаемого вида использования генно-инженерных организмов, включая новый или измененный вид использования по сравнению с организмом реципиентом

Трансгенный картофель предполагается использовать для продовольственных и кормовых целей, а также в качестве технического сырья для различных отраслей перерабатывающей промышленности.

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

8.1. Информация о высвобождении генно-инженерных организмов:

описание процесса предполагаемого высвобождения генно-инженерных организмов, цели высвобождения;

предполагаемые сроки начала и окончания высвобождения и календарный план экспериментов, связанных с высвобождением, включая количество и продолжительность экспериментов;

предполагаемое количество высвобождаемых генно-инженерных организмов, количество генно-инженерных организмов на единицу площади участка;

расстояние от участка до посадок растений диких и культурных родственных видов, способных к гибридизации с генно-инженерными организмами;

информация о наличии и результатах предыдущих высвобождений генно-инженерных организмов в окружающую среду;

Целью посадки созданных трансгенных линий картофеля на специальном полигоне является их размножение, а также изучение устойчивости растений к грибным и микробным патогенам, оценка их урожайности в сравнении с контрольными (реципиентными) сортами картофеля.

Для посадки растений участок будет вспахан и забаранован как обычно. Посадка будет производиться вручную. Через 7 дней после посадки будет проведено довсходовое культивирование посадок. После появления всходов будет проведено культивирование и окучивание кустов 3 раза. Посадка будет осуществляться рядами. Расстояние между рядами 0,7 м, между растениями в ряду 0,35 м. Всего будет высажено 10 трансгенных линий. Посадка будет осуществляться в оптимальные для посадки картофеля сроки, т.е. в начале мая 2017 года.

Поблизости от участка никаких диких и культурных родственных видов, способных к гибридизации с трансгенным картофелем, нет. Посадка обычного картофеля если и будет производиться на опытном поле, то не ближе 50 м от полигона.

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

#### 8.2. методы мониторинга:

методы наблюдения за генно-инженерными организмами, а также мониторинга их возможных взаимодействий с потенциально уязвимыми элементами окружающей среды;

специфичность, то есть возможность идентифицировать генно-инженерные организмы, отличить их от реципиентных организмов, а также чувствительность и надежность методов мониторинга генно-инженерных организмов;

методы выявления переноса трансгенов другим организмам;

продолжительность и частота мониторинга;

Будет производиться наблюдение за поврежденностью растений грибными патогенами. После уборки осенью будет дана оценка урожайности трансгенных линий. Будет изучена стабильность созданных трансгенных линий молекулярно-генетическими методами. Растения трансгенных линий не имеют какой-либо специфичности по морфологическим признакам. Возможное отличие трансформантов от реципиентных растений будет наблюдаться в конце вегетативного периода по степени поврежденности листьев и стеблей растений.

Перенос трансгенов другим организмам может выявляться только выделением ДНК из генеративных органов или плодов и проведением анализа ДНК методом ПЦР. Такой анализ будет проведен на семенах контрольных растений, выращиваемых на полигоне.

#### 8.3. Контроль высвобождения генно-инженерных организмов:

меры, которые предполагается использовать для предотвращения рассеивания пыльцы, семян генно-инженерных организмов;

методы и процедуры, направленные на охрану территории высвобождения от вторжения посторонних лиц;

методы и процедуры, предохраняющие территорию от нежелательного посещения другими организмами;

Для предотвращения рассеивания пыльцы и семян может быть применено удаление цветков или семян путём их обрыва и захоронения в могильнике. Однако в нашем случае в конце вегетационного периода вся надземная часть растения будет срезаться и уничтожаться путём захоронения в могильнике (специально вырытой яме), находящемся на территории полигона.

Трансгенные растения будут высаживаться на специальном полигоне, огороженном оградой – металлической сеткой. Ворота закрываются замком, а ключ будет находиться на посту охраны Биологической опытной станции. Территория полигона будет находиться под круглосуточным контролем камер слежения и звуковой сигнализации. Таким образом, территория полигона будет охраняться от проникновения животных и посторонних лиц.

#### 8.4. Очистка территории:

процедура обработки участка по завершении высвобождения;

методы удаления генно-инженерных организмов по завершении экспериментов;

По завершении вегетационного периода вся надземная часть растения будет захораниваться путём сожжения в специальном месте, а клубни будут тщательно выбраны, перенесены в хранилище для использования в дальнейших исследованиях. Участок будет вспахан и забаранован.

8.5. План действий в чрезвычайных ситуациях, связанных с непредвиденным распространением генно-инженерных организмов:

методы и процедуры контроля генно-инженерных организмов в случае непредвиденного распространения;

методы утилизации или оздоровления растений, животных и т.д., которые оказались подвергнуты воздействию генно-инженерных организмов в ходе или после их непредвиденного распространения;

планы защиты здоровья человека и охраны окружающей среды в случае обнаружения не желательных воздействий генно-инженерных организмов.

Использование специального полигона для выращивания и испытания трансгенных растений, оборудованного хранилища клубней, биологические особенности размножения картофеля не предполагают непредвиденного распространения трансформантов. В случае, если все-таки произойдет несанкционированный вынос клубней трансгенных линий посторонними лицами, это не может иметь неблагоприятных последствий, так как имеющиеся данные указывают на безопасность заявляемых трансгенных линий для здоровья человека и окружающей среды.

#### Список литературы

- 1 Консенсусный документ по биологии картофеля *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* (№8) Директората по охране окружающей среды Организации Экономического Сотрудничества и Развития (OECD/GD(97)143). Париж, 1997. 14 с.
- 2 Гапеева Т.А., Пундик А.Н., Волотовский И.Д. Конструирование векторов для экспрессии генов антимикробных пептидов в клетках растений // Материалы VI Международной научной конференции: «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии». Т.2. – Минск: И.П. Логвинов, 2008. С. 130–133.
- 3 Jefferson R. A., Kavanagh T. A., Bevan M. W. GUS-fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants // EMBO J. 1987. V. 6, N 13. P. 3901–3907.
- 4 Chen P.-Y., Wang C.-K., Soong S.-C. and To K.-Y. Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants // 2003.– Mol. Breeding V. 11. P. 287–293,.
- 5 Bevan M. Binary Agrobacterium vectors for plant transformation // 1984. Nucl. Acids Res. V. 12. P. 8711-8721.

- 6 Frisch D.A., et al. Complete sequence of the binary vector Bin 19 // 1995. *Plant Mol. Biol.* V.27. P. 405–409.
- 7 Trieu-Cuot P. and Courvalin P. Nucleotide sequence of the *Streptococcus faecalis* plasmid gene encoding the 3', 5"-aminoglycoside phosphotransferase type III // 1983. *Gene.* V. 23. P. 331-341.
- 8 Beck E. et al. Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5 // 1982. *Gene.* V. 19. P. 327–336.
- 9 Kim Y., Buckley K., Costa M. A and An G.A 20 nucleotide upstream element is essential for the nopaline synthase (nos) promoter activity // 1994. *Plant Mol. Biol.* V. 24. P. 105-117.
- 10 Blanco C., Ritzenthaler P., Mata-Gilsinger M. Cloning and Endonuclease Restriction Analysis of uidA and uidR Genes in Escherichia coli K-12: Determination of Transcription Direction for the uidA Gene // 1982. *J. Bacteriol.* V. 149. P.587-594.
- 11 Sambrook J. W., Fritsch E. F., Maniatis T. *Molecular cloning: A Laboratory manual.* N.Y: Cold Spring Harb. Lab.Press, 1989.
- 12 Lazo G.R., Stein, P.A., Ludwig R.A. A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium* // *Biotechnology.* 1991. V. 9. P. 963–967.
- 13 Hood E.E., Helmer G.L., Fraley R.T., Chilton, M.-D. The Hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA // *J. Bact.* 1986. V. 168. P. 1291-1304.
- 14 Beaujean A., Sangwan R.S., Lecardonnel A., Sangwan-Norreel, B.S. *Agrobacterium* mediated transformation of three economically important potato cultivars using sliced internodal explants: an efficient protocol of transformation // *J. Exp. Bot.* 1998. V. 49, N 326. P. 1589–1595.
- 15 Murashige T., Skoog F. A. Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures // *Physiol. Plant.* 1962. V. 15. P. 473–497.
- 16 Hancock R.E.W., Brown M.H., Piers K. // US patent application serial № 07.913.492 / filed August 21. 1992.
- 17 Osusky M., Zhou G., Osuska L., et al. Transgenic plants expressing cationic peptide chimeras exhibit broad-spectrum resistance to phytopathogens // *Nat. Biotech.* 2000. V. 18. P. 1162-1166.
- 18 Boman, H. G., Wade, D., Boman, I. A., et al. Antibacterial and antimalarial properties of peptides that are cecropin-melittin hybrids. // *FEBS Lett.* 1989. V. 259. P. 103–106.
- 19 Yevtushenko D. P., Romero R., Forward B. S., Hancock, R. E. Pathogen-induced expression of cecropin A-melittin antimicrobial peptide gene confers antifungal resistance in transgenic tobacco // *J. Exp. Bot.* – 2005. – V. 56., N. 416. P. 1685-1695.
- 20 Redenbaugh K. et al. Aminoglycoside 3' - phosphotransferase II (APH(3')II): Review of its safety and use in the production of genetically engineered plants // 1994. *Food Biotech.* V. 8. P. 137-165

- 21 Moens W., Collard J.M. GM Plants containing antibiotic resistance genes. Belgian Biosafety Server. Last revised: 4 December 2002 (<http://biosafety.ihe.be/ARGMO/ARGMOmenu.htm>).
- 22 Nap J. P., Bijvoet J., Stikema W. J. Biosafety of kanamycin-resistant transgenic plants // *Transgenic Res.* 1992. V. 1. P. 239–249.
- 23 Биотехнология. Биобезопасность. Биоэтика / Ермишин А.П. [и др.]; под ред. А.П. Ермишина // Мн.: Тэхналогія, 2005. 430 с.
- 24 Вутто Н.Л., Гапеева Т.А., Пундик А.Н., Третьякова Т.Г., Волотовский И.Д. Трансгенные растения картофеля белорусских сортов, экспрессирующие гены антимикробных пептидов цекропин-мелиттинового типа // *Генетика.* 2010. Т.46. №9. С.1-9
- 25 Libiakova G., Jurgensen, B., Palmgren, G. et al. Efficacy of an intron-containing kanamycin resistance gene as a selectable marker in plant transformation // *Plant Cell Rep.* 2001. V. 20. P. 610–615.
- 26 Reddy K.V, Yedery R.D, Aranha C. Antimicrobial peptides: premises and promises // *Int. J. Antimic. Agent.* 2004. V. 24, N 6. P. 536–547.
- 27 Brahmachary M., Krishnan S. P. T., Koh J. L. Y., Khan A. M. ANTIMIC: a database of antimicrobial sequences // *NAR.* 2004. V. 32. Database issue D586–D589.
- 28 Kamysz W., Okrűj M., Lukasiak J. Novel properties of antimicrobial peptides // *Acta Biochim. Pol.* 2003. V. 50. P. 461–469.
- 29 Hancock R.E., Diamond G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences // *Trends Microbiol.* 2000. V. 8. P. 402–410.
- 30 Wade D., Boman A., Wahlin B., et al. All-D amino acid-containing channel-forming antibiotic peptides. // *PNAS.* 1990. V. 87. P.4761-4765.
- 31 Cavallarin L., Andreu D., Segundo B. Cecropin A-derived peptides are potent inhibitors of fungal plant pathogens // *Mol. Plant Microb. Interact.* – 1998. V. 11. P. 218-227.
- 32 Andreu D., et al. Shortened cecropin A-melittin hybrids. Significant size reduction retains potent antibiotic activity // *FEBS* 1992. V.196, N2. P. 190-194.
- 33 Park Y., et al. A Leu-Lys-rich antimicrobial peptide: activity and mechanism // *BBA.* 2002. V. 1645. P. 172-182.
- 34 Friedrich C., Scott M.G., Karunaratne N., et al. Salt-resistant alpha-helical cationic antimicrobial peptides // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999. V. 43, N 7. P. 1542–1548.
- 35 Petition for determination of regulated status for Newleaf@Y Potato lines RBMT15-101, SEMT15-02, and SEMT15-15 (Monsanto #97-357U3)/ ([http://www/aphis.usda.gov/brs/aphisdocs/97\\_33901p.pdf](http://www/aphis.usda.gov/brs/aphisdocs/97_33901p.pdf)).
- 36 Бакакина Ю.С., Гапеева Т.А., Дубовская Л.В., Волотовский И.Д.. Протеомный анализ трансгенных растений картофеля, экспрессирующих гены антимикробных пептидов, для оценки их функционального состояния // РУП «НПЦ НАНБ по картофелеводству и плодоовощеводству»; редкол.: С.А. Турко (гл. ред.) [и др.]. Минск, 2015, №4, С.35-43.

- 37 Campo S. et al. Production of cecropin A in transgenic rice plants has an impact on host gene expression // Plant Biotech. J. 2008 V.6 P. 585–608.
- 38 Иванюк В.Г., Банадысев С.А., Журомский Г.К. Защита картофеля от болезней, вредителей и сорняков // Минск, Белпринт, 2005. 696 с.
- 39 Bhargava K., Feix J.B. Membrane Binding, Structure, and Localization of Cecropin-Mellitin Hybrid Peptides: A Site-Directed Spin-Labeling Study // Biophys. J. 2004. V. 86. P. 329 – 336.
- 40 Juvvadi P., Vunnam S., Merrifield E.L., et al. Hydrophobic effects on antibacterial and channel-forming properties of cecropin A-melittin hybrids // J. Pept. Sci. 1996. V.2. P. 223–232.
- 41 Андреева-Ковалевская, Ж.И., Солонин, А. С., Синева, Е. В., Терновский, В. И. Пороформирующие белки и адаптация организмов к условиям окружающей среды // Успехи биологической химии. 2008. Т. 48. С. 267–318.
- 42 DeGray G., Rajasekaran K., Smith F., Sanford, J. Expression of an antimicrobial peptide via the chloroplast genome to control phytopathogenic bacteria and fungi // Plant Physiol. 2001. V. 127. P. 852-862.
- 43 Avrahami D., Shai. Y. Bestowing antifungal and antibacterial activities by lipophilic acid conjugation to D, L-amino acid-containing antimicrobial peptides: a plausible mode of action // Biochemistry. 2003. V. 42. P. 14946–14956.
- 44 Доронина Н.В., Иванова Е.Г., Троценко Ю.А. // Новые данные о способности метиловобактерий и метанотрофов синтезировать ауксины Микробиология. 2002. Т. 71. С. 130-132.

  
(подпись заявителя)

М.П.



Л.В. Дубовская  
(инициалы, фамилия)

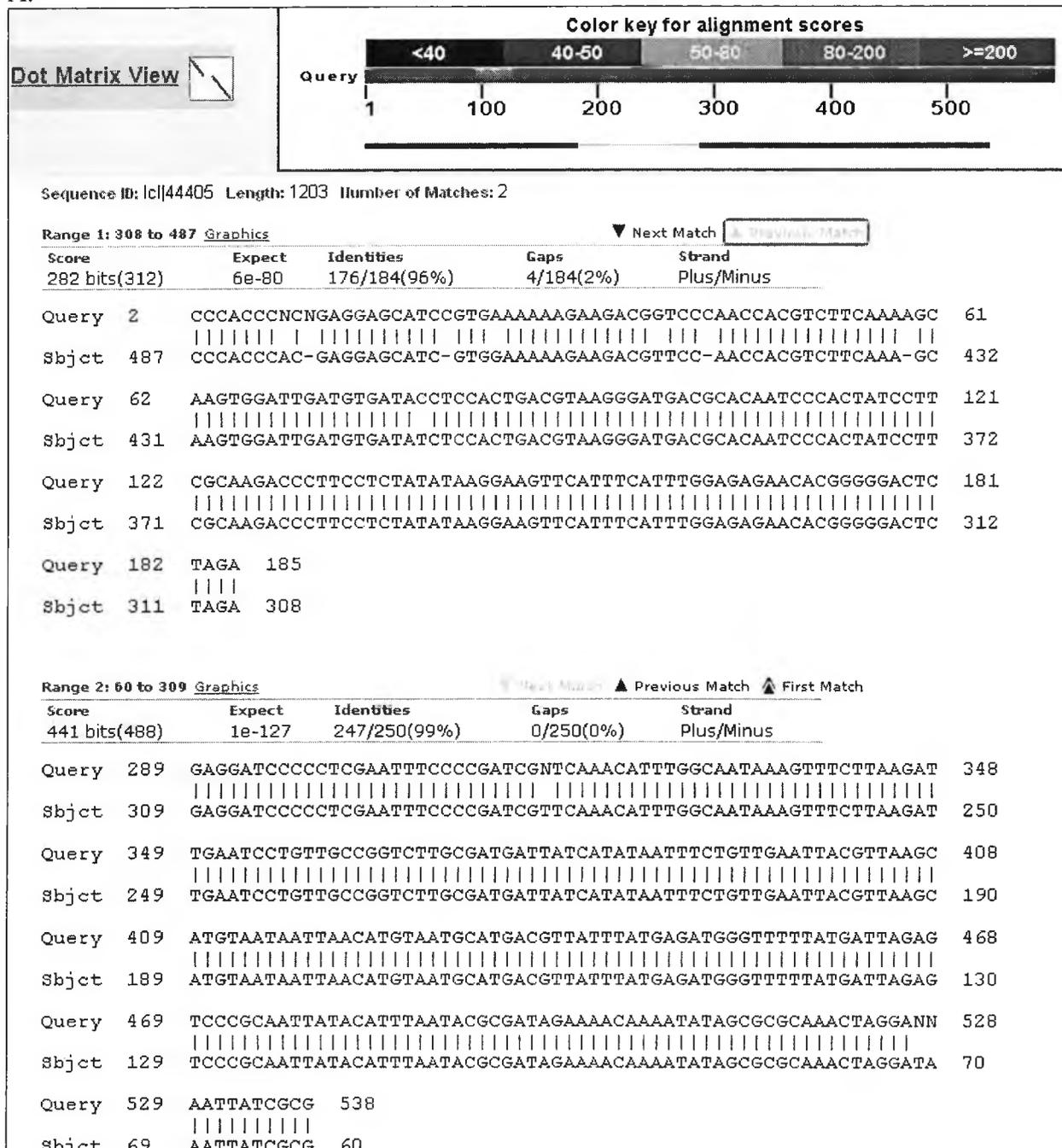
## Приложение

Сравнение результатов секвенирования с теоретическими последовательностями

А – кассеты экспрессии рВΙΔGUS1

Б – последовательности АП MsrA1

A.



Б.

