Приложение 1
к Положению о порядке проведения
оценки рисков возможных вредных
воздействий генно-инженерных
организмов на здоровье человека
и окружающую среду

ПЕРЕЧЕНЬ
ИНФОРМАЦИИ О ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫХ ОРГАНИЗМАХ, ОТНОСЯЩИХСЯ К ВЫСШИМ РАСТЕНИЯМ (ГОЛОСЕМЕННЫМ И ПОКРЫТОСЕМЕННЫМ), А ТАКЖЕ О МЕРАХ ПО ПРЕДУПРЕЖДЕНИЮ ВОЗМОЖНЫХ ВРЕДНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНОГО ОРГАНИЗМА НА ЗДОРОВЬЕ ЧЕЛОВЕКА И ОКРУЖАЮЩУЮ СРЕДУ

1. Информация о биологических особенностях реципиентного организма:

1.1 полное название:

семейство - *Solanaceae*;

род - *Solanum*;

вид - *tuberosum*;

сорт/селекционная линия - Прешацвет;

обычное название - картофель;

1.2. информация, касающаяся особенностей размножения:

картофель размножается вегетативным и половым путём. Специфические факторы, влияющие на размножение растений картофеля, отсутствуют. Потомство воспроизводится в вегетационный период – с мая по сентябрь месяц. Для использования в хозяйственной деятельности картофель выращивают в виде клубней. Семенное размножение картофеля ограничено и используется только в селекционной работе. У картофеля полная половая несовместимость с другими культивируемыми видами растений и очень низкая совместимость с дикими видами картофеля. В Беларуси дикие виды картофеля не произрастают;

1.3. выживаемость в окружающей среде:

клубни картофеля после созревания переходят в состояние покоя. Обычно хранятся в специальных хранилищах при плюсовой температуре.

Оставшиеся в почве не убранные во время уборки клубни могут сохраняться и прорастать на следующий год. На выживаемость оказывают влияние температура и степень поражения фитопатогенами;

1.4. рассеивание:

рассеивание картофеля естественным путём практически не происходит. Рассеивание может происходить только с помощью человека. Завязавшиеся семена в процессе уборки картофеля, как правило, уничтожаются вместе с вегетативной массой. Специфические факторы, влияющие на рассеивание, отсутствуют;

1.5. географическое распространение:

культурный картофель широко используется в хозяйственных целях в большинстве стран мира, в т.ч. и в Европе. В Беларуси это одна из основных сельскохозяйственных культур. 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:

для выращивания картофеля наиболее пригодными являются супесчаные почвы, а также лёгкие и средние суглинки. Картофель светолюбивая культура, отзывчива на удобрения, начинает прорастать при температуре 8-10°С тепла. В Беларуси условия для произрастания картофеля вполне благоприятны. Основные болезни картофеля вызываются вирусами, фитопатогенными грибами и бактериями, вироидами и микоплазмами. Наиболее вредоносные болезни: фитофтороз, рак картофеля, различные вирозы, ризктониоз, парша клубней, чёрная ножка и другие. Конкуренты и симбионты отсутствуют;

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:

2.1. полное название:

семейство *Streptococcaceae*

род *Streptococcus*

вид *Streptococcus pyogenes;*

2.2. происхождение организмов доноров:

Streptococcus pyogenes – вид грамположительных аэробных бактерий рода *Streptococcus*. Эти бактерии являются внеклеточными и состоят из неподвижных и не образующих спор кокков (круглых клеток), которые имеют тенденцию связываться в цепочки. *Streptococcus pyogenes* относится к бета-гемолитическим стрептококки группы А;

2.3. биологические характеристики организмов доноров:

S. pyogenes – грамположительный, каталазоотрицательный, оксидазоотрицательный, β-гемолитический стрептококк. Стрептококки - хемоорганогетеротрофы, факультативные анаэробы, лучше всего растущие в среде с 5–10% углекислого газа, образующие точечные колонии на пластинах кровяного агара. Система серологической группировки Лэнсфилда используется для дифференциации стрептококков группы А (GAS) от других стрептококков. Антиген типа А *S. pyogenes* — это полисахарид, состоящий из N-ацетилглюкозамина, прикрепленного к полимерному остову рамнозы [2].

3. Биологические особенности вектора:

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

векторная конструкция обеспечивает интеграцию в геном растений Т-ДНК, содержащую ген эндонуклеазы Cas9 *Streptococcus pyogenes* с регуляторными элементами *CaMV 35S* промотором и *NOS* терминатором, направляющую РНК (гидРНК) для функциональной активности белка Cas9 под регуляцией *OsU3* промотор из риса. Cas9 (англ. CRISPR associated protein 9, CRISPR-ассоциированный белок) — это управляемая при помощи –гидРНК эндонуклеаза, связанная с адаптивной иммунной системой CRISPR (англ. Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats) у ряда бактерий, в частности *Streptococcus pyogenes*. *S. pyogenes* использует Cas9 для запоминания [3], последующей проверки и разрезания чужеродной ДНК с помощью гидРНК [4], например, ДНК бактериофагов или плазмид.

Экспрессия в растениях картофеля T_0 поколения нуклеазы Cas9 и направляющей РНК приводит к нокауту целевой последовательности за счет того, что белок Cas9 содержит два эндонуклеазных каталитических домена: RuvC и С-концевой HNH. Каждый домен расщепляет одну из цепей ДНК, в результате чего образуется двухцепочечные разрывы ДНК [5, 6]. В нашей работе в качестве целевых последовательностей для функциональной активности белка Cas9 использовались нативные гены картофеля *StDMR6-1* и *StCHL1*;

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

для введения в растения картофеля экспрессионных кассет использовали генетические конструкции, созданные на основе бинарного вектора *pRGEB31*, в состав которых входят гидРНК комплементарные протоспейсерам генов *StDMR6-1* и *StCHL1* слитые с gRNAscaffold под регуляцией *U3* промотора и терминатора транскрипции для малых РНК, ген белка Cas9 (Csn1) нуклеазы из *Streptococcus pyogenes* под *CaMV 35S* промотором и *NOS* терминатором (рисунок 3.1).

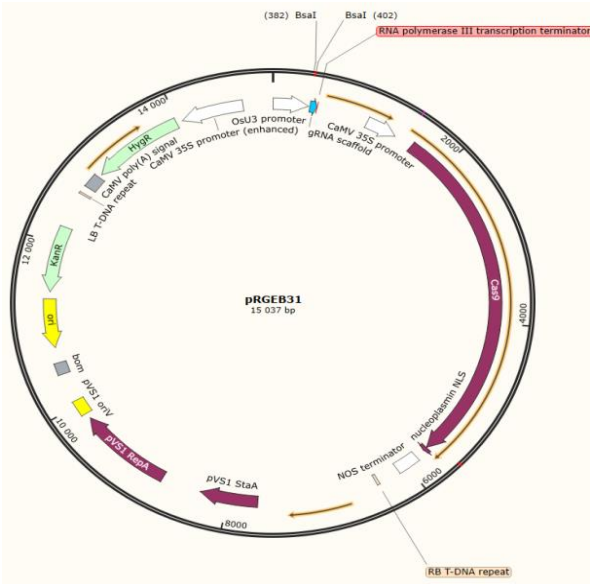

Рисунок 3.1 Бинарный вектор *pRGEB31*: *RB, LB* – правая и левая границы Т-ДНК, Cas9 – Cas9 (Csn1) эндонуклеаза из *Streptococcus pyogenes* Type II CRISPR/Cas системы под *35S* промотором и *NOS* терминатором, *Hyg*– ген устойчивости к гигромицину под *CaMV 35S* промотором, *OsU3* promoter – *OsU3* промотор для гидовой РНК и RNA polymerase III transcription terminator – терминатор для gRNA+gRNA scaffold, *Kan* – ген устойчивости к антибиотику канамицину для отбора бактериальных трасформантов

Основой для создания векторных конструкций являлся бинарный вектор *pRGEB31*. Вектор *pRGEB31* содержит двойной сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции *Bsa*I для клонирования спейсера, последовательность белка Cas9 под *35S* промотором и *NOS* терминатором, gRNAscaffold под контролем *U3* промотора из *Oryza sativa* и терминатора транскрипции для малых РНК, а также ген *Hyg* устойчивости к гигромицину для селекции растений и ген *Kan* устойчивости к канамицину для селекции бактерий. Наличие экспрессионных кассет в векторе *pRGEB31*, содержащих регуляторные элементы для гидРНК слитой с gRNAscaffold и гена нуклеазы Cas9, было показано ПЦР с помощью синтетических олигонуклеотидов, представленных в таблице 1.

Таблица 1 – Последовательность и температура отжига синтетических олигонуклеотидов, использованных при создании векторных конструкций

Олигонуклеотиды	Последовательность олигонуклеотидов, 5' → 3'	Температура отжига, °C
U3-F	agcttaaggaatctttaaacatacgaacagat	59°C
35-R	agtcccccgtgttctctccaaatgaaatgaac	65°C
Cas9-F	gccgacaagaagtacagcatcggcctggaca	69°C
T-nos-R	gctatattttgttttctatcgcgtat	54°C

Теоретически рассчитанные фрагменты, содержащие *OsU3* промотор и терминатор транскрипции для малых РНК для гидРНК+gRNAscaffold и *35S* промотор и *NOS* терминатор для регуляции гена нуклеазы *Cas9*, должны составлять 1 398 п.н. и 4 466 п.о., соответственно (рис.3.2).

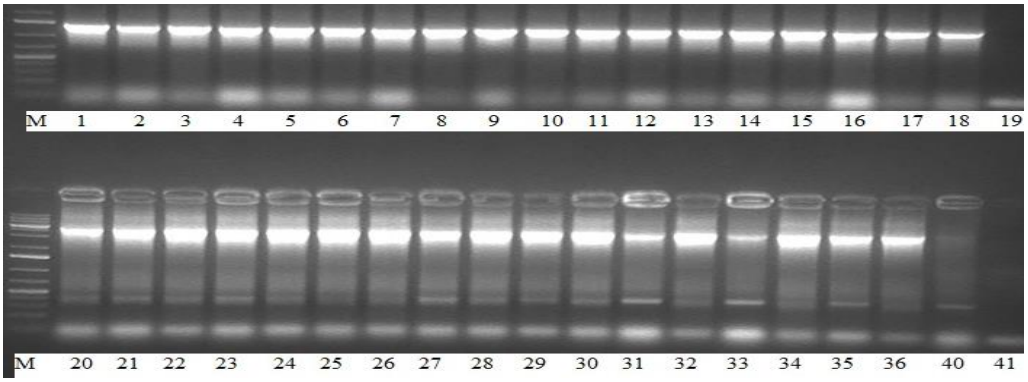

Рисунок 3.2 Электрофореграмма ПЦР-продуктов (1 398 п.н. и 4 466 п.о.), выявленного при амплификации плазмидной ДНК, несущей систему CRISPR/Cas9: M — маркер молекулярного веса GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, США), 1–18, 20–40 — вектор *pRGEB31*, 19, 41 — отрицательный контроль

Способностью к самостоятельному переносу вектор не обладают, без вспомогательной плазмиды pRK2013 вектор не может быть перенесен в другие бактерии. Такая вспомогательная плазмида также отсутствует в *Agrobacterium tumifaciens,* и трансформированном геноме картофеля;

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

данные, подтверждающие способность приобретения мобильности встроенного вектора и переноса его в другие организмы, отсутствуют. Инсерция Т-ДНК в растительном геноме не обладает свойствами мобильности или переноса в другие организмы;

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

Факторы, влияющие на способность вектора адаптироваться в других организмах-хозяевах, не выявлены;

4. Информация, относящаяся к характеру генно-инженерной модификации:

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

для дизайна векторных конструкций *in silico* были использованы следующие программы: SnapGene Viewer 6.0, ApE (A plasmid Editor) и база данных NCBI. Синтезированные спейсерные последовательности, определяющие специфичность системы CRISPR/Cas9, были клонированы в бинарные вектора *pRGEB31* по двойному сайту эндонуклеазы рестрикции *Bsa*I (NEB, США). При создании векторных конструкций использовались общепринятые методики выделения и очистки плазмидной ДНК, ферментативного гидролиза, дефосфорилирования и лигирования рестрицированных фрагментов, выполненные с применением коммерческих наборов реагентов ЗАО «Евроген» (РФ), Thermo Fisher Scientific (США) по методикам изготовителя. Для приготовления компетентных клеток и дальнейшей бактериальной трансформации использовался лабораторный штамм *Escherichia coli XL1-Blue*. *E. coli* относится к микроорганизмам, не обладающим природной компетентностью к поглощению чужеродной ДНК, поэтому перед трансформацией данной бактерии необходимо придать компетентность клеткам для поглощения чужеродной ДНК [7] .

4.2. описание встроенного в геном реципиентного организма фрагмента ДНК, структура и функциональное соответствие встроенного фрагмента ДНК, присутствие в нем известных потенциально опасных последовательностей:

цель генетической модификации – включение в геном реципиентного организма (*Solanum tuberosum* – столовый сорт картофеля белорусской селекции Першацвет) функционально активного гена эндонуклеазы Cas9 из *Streptococcus pyogenes*, обеспечивающего нокаут целевых генов-мишеней *StDMR6-1, StCHL1*, задействованных в процессе устойчивости растения к фитофторозу. Заявляемая трансгенная линия картофеля T_0 поколения содержит, по сравнению с исходным сортом картофеля белорусской селекции Першацвет, вставку Т-ДНК, представляющую собой часть векторной генетической конструкции, которая включает генетический материал следующих организмов (таблица 2). Все перечисленные организмы не являются опасными для здоровья человека (по классификации ВОЗ).

Таблица 2 – Генетические элементы вставки, входящие в состав трансгенной линии картофеля

№ п\п	Генетический элемент	Происхождение	Функция
1	ген эндонуклеазы *Cas9*	*Streptococcus pyogenes*	Целевой ген эндонуклеазы *Cas9*, белковый продукт которого вносит 2-х цепочечные разрывы в цепи ДНК в гены мишени *StDMR6-1*, *StCHL1*
2	гидРНК	*Solanum tuberosum*	Спейсерные последовательности для функциональной активности белка Cas9, комплементарные протоспесерам генов мишеней *StDMR6-1*, *StCHL1*
3	ген *HygR* устойчивости к	*Escherichia coli*	Маркерный ген для отбора трансформантов

	антибиотику гигромицину		
4	*35S*-промотор вируса мозаики цветной капусты (CaMV)	Вирус мозаики цветной капусты	Обеспечивает конститутивную экспрессию целевого и маркерного генов
5	*NOS* терминатор гена нопалин-синтетезы	*Agrobacterium tumefaciens*	Обеспечивает конститутивную экспрессию целевого гена
6	*OsU3* промотором	*Oryza sativa (rice)*	Обеспечивает конститутивную транскрипцию малых РНК в ядре
7	Терминатор транскрипции малых РНК	*растительный*	Обеспечивает терминацию малых РНК в ядре

Маркерный ген устойчивости к антибиотику гигромицину - *HygR* является наиболее часто используемым в практике генетической инженерии. Гигромицин В – аминогликозидный антибиотик, обычно используемый для скрининга резистентности. Он может ингибировать синтез белка, вызывая неправильное считывание шаблонов мРНК, тем самым убивая бактерии, грибы и эукариотические клетки. Фосфотрансфераза гигромицина В, кодируемая геном устойчивости к гигромицину (hyg или hph), полученным из *E. coli*, может превращать гигромицин В в фосфорилированный продукт без биологической активности, тем самым играя роль детоксикации. Поэтому гигромицин В часто используется для скрининга и поддержания прокариотических или эукариотических клеток, которые успешно трансфицировали гены устойчивости к гигромицину [8].

35S-промотор вируса мозаики цветной капусты (CaMV) является одним из наиболее часто используемых для обеспечения экспрессии встраиваемых генов в двудольных растениях. Это конститутивный промотор, ведущий к наработке существенных количеств белка экспрессируемого гена [9, 10].

NOS терминатор гена нопалин-синтетезы из *Agrobacterium tumefaciens* является одним из наиболее часто используемых для обеспечения экспрессии встраиваемых генов в двудольных растениях [11, 12].

Ген рекомбинантной эндонуклеазы Cas9 размером 4101 п.о., выделенный из *Streptococcus pyogenes,* кодирует белок Cas9 слитый на N-конце с сигналом ядерной локализации (NLS) вируса SV40 и на С-конце с двойным сигналом ядерной локализации (nucleoplasmin NLS). Эндонуклеаза NLS-Cas9-nucleoplasmin NLS в комплексе с направляющими РНК слитой с единой sgRNA, подставляющей собой объединённые crRNA и tracrRNA, осуществляет сайт-специфический гидролиз фосфодиэфирной связи в двухцепочечной ДНК. Разрыв происходит в цепи ДНК между третьим и четвертым нуклеотидами от последовательности PAM с образованием «тупых концов». Такая конструкция позволяет синтезировать полностью функциональный белок Cas9 *Streptococcus pyogenes*, слитый с дважды повторяющимся NLS вируса SV40.

OsU3 промотор из Oryza *sativa (rice)* является одним из наиболее часто используемых промоторов для обеспечения повышенной эффективности CRISPR/Cas9 системы в клетке. Относится к природным промоторам для РНК полимеразы III, которые определяют уровень экспрессии гидРНК CRISPR/Cas9 системы [13].

Таким образом, созданная и встроенная в геном растений картофеля генетическая конструкция 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 встроенной ДНК каких-либо неизвестных последовательностей и информация о том, в какой степени вставка ограничена ДНК, необходимой для осуществления предполагаемой функции:

во встроенной Т-ДНК каких-либо неизвестных последовательностей не имеется. Т-ДНК содержат только последовательности, содержащиеся в переносимых генетических конструкциях, необходимые для осуществления устойчивости растений картофеля к фитофторозу и для отбора трансформантов;

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

модификации реципиентного генома происходит путем интеграции Т-ДНК из бинарного вектора *pRGEB31* в растительный геном методом *Agrobacterium*-опосредованной трансформацией листовых дисков и частей стебля асептической культуры картофеля. Вставка происходит в геномную ДНК по гомологичным повторам, фланкирующим Т-ДНК, рандомно. Перенос Т-ДНК методом *Agrobacterium*-опосредованной трансформации происходит исключительно в ядро растительного организма, подверженного корончатому галлу, в соответствии с механизмами заражения агробактерией и переноса Ti-плазмиды. Инкорпорации в пластидный геном невозможно – другие способы доставки генетического материала и механизмы его передачи в растительном организме;

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

стабильность инкорпорации/наследовании привнесенной ДНК можно судить на основании данных, полученных при изучении T_0-T_4 поколений;

4.6. количество копий трансгенов:

количество копий трансгенов при *Agrobacterium*-опосредованной трансформации составляет не более 3, что может быть подтверждено как молекулярно-генетическими методами, так и при изучении семенного потомства в T_0-T_4 поколениях;

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

для обнаружения и идентификации элементов встроенной Т-ДНК использовался метод ПЦР анализа с синтетическими олигонуклеотидами, специфическими к экспрессионной кассете, содержащей гена эндонуклеазы Cas9 и регуляторные элементы, представленными в таблице 3. При этом синтетические олигонуклеотиды были разработаны и апробированы *in silico* в программе SnapGene Viewer 6.0 и базе данных NCBI.

Таблица 3 – Последовательность и температура отжига синтетических олигонуклеотидов, использованных для анализа событий трансгенеза в трансгенных растений картофеля поколения T_0

Олигонуклеотиды	**Последовательность синтетических олигонуклеотидов, 5'→3'**	**Температура отжига, °C**
U3-F	agcttaaggaatctttaaacatacgaacagat	59
35-f	tcaacaaagggtaatatccggaaacctcctcgga	66
35-R	agtcccccgtgttctctccaaatgaaatgaac	65

Объем смеси для амплификации одного образца составлял 25 мкл, в смесь входили следующие реагенты: 100–200 нг ДНК, 2,5 мкл 10X Taq Turbo буфера (ЗАО Евроген, РФ), 2,5 мкл 0,4 мМ смеси нуклеотидов (dNTP) (ООО «Артбиотех», РБ), 2 мкл 25 мМ MgCL2 (ОДО «Праймтех», РБ), 2,5 мкл каждого из праймеров, 0,2 мкл 5 ед. Taq ДНК-полимеразы (ОДО «Праймтех», РБ), 10,7 мкл H2O. Амплификацию проводили в амплификаторе «BioRad» с использованием следующей программы: денатурация — 94oC 4 мин; отжиг праймеров — 94°C 30 сек; 56°C 45 сек, 72°C 1 мин, 35 циклов; ренатурация — 72°C 7 мин; 4°C ∞ мин (в зависимости от нуклеотидной последовательности и размера амплифицируемого фрагмента температура отжига праймеров и время элонгации варьируют). Продукт реакции разделяли в 1% агарозном геле с бромистым этидием в электрическом поле с помощью камеры для горизонтального электрофореза фирмы «BioRad». Фрагмент после электрофореза визуализировали с помощью системы BioRad GelDoc2000.

Чувствительность метода соответствует стандартной методике детекции определения последовательностей ДНК с помощью ПЦР и электрофореза в агарозном геле (рис. 4.1, 4.2);

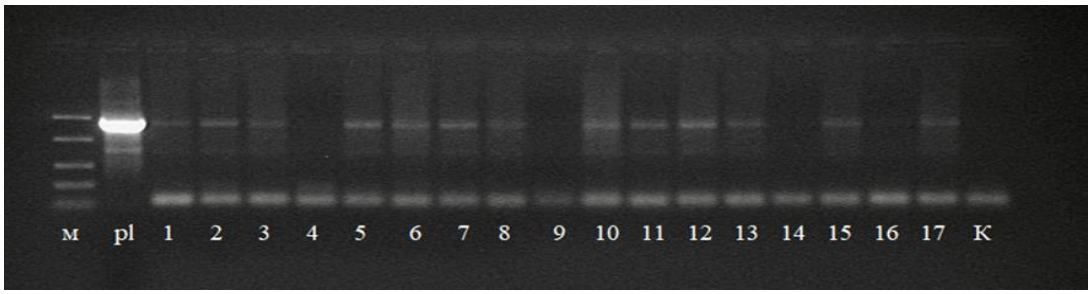

Рис. 4.1. Электрофореграмма ПЦР-продукта (1398 п.н.) геномной ДНК трансгенных растений картофеля T_0 поколения: м – маркер молекулярного веса FastRuler DNA Ladder Low Range (Thermo Fisher Scientific), pl – *pRGEB31*, 1-17 – ДНК анализируемых растений картофеля, к – контрольные (нетрансгенные) растения картофеля

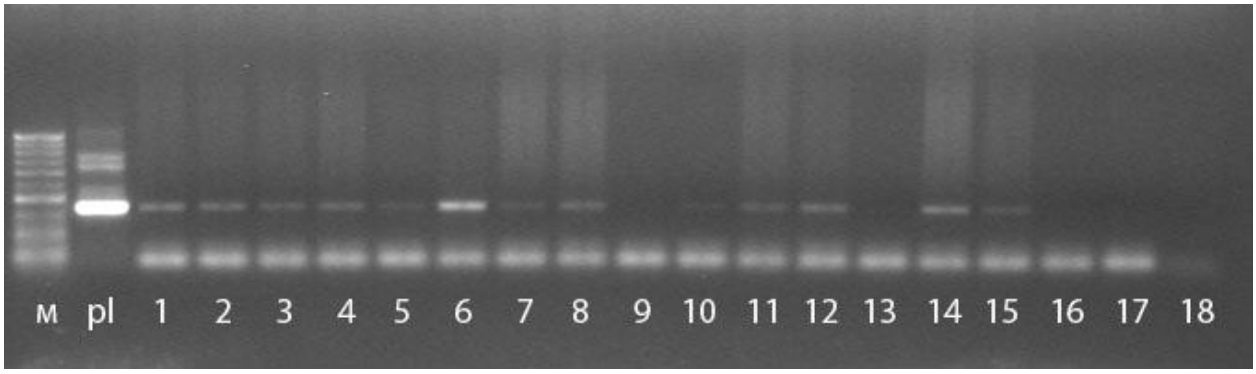

Рис. 4.2. Электрофореграмма ПЦР-продукта (346 п.н.) геномной ДНК трансгенных растений картофеля T_0 поколения с праймерами 35-f и 35-R: М – маркер молекулярного веса DNA Ladder MP 100bp (Праймтех), pl – *pRGEB31*, 1-16 – ДНК анализируемых растений картофеля, 17 – контрольные (нетрансгенные) растения картофеля, 18 – контроль реакции

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 заявляемая трансгенная линия отличаются от реципиентного организма наличием инсерции Т-ДНК в своем геноме, приобретенной в процессе *Agrobacterium*-опосредованной трансформации. Состав Т-ДНК представлен в таблица 2. Каких-либо морфологических изменений у трансгенной линии не выявлено;

5.2. генетическая стабильность ГИО:

генетическая стабильность трансгенной линии может быть оценена на основании данных, полученных при изучении T_0-T_4 поколений;

5.3. Степень и уровень экспрессии трансгена, метод оценки экспрессии трансгена, его чувствительность:

не изучалось;

5.4. Активность и свойства протеинов, кодируемых трансгенами:

уровень функциональной активности белков не изучался;

5.5 части растения, в которых трансгены экспрессируются:

у трансгенной линии, созданной на основе сорта картофеля белорусской селекции Першацвет, элементы экспрессионной кассеты находятся под конститутивными промоторами, следовательно, ген эндонуклеазы Cas9 и ген устойчивости к гигромицину экспрессируются во всех частях растения;

5.6. история прежних генно-инженерных модификаций ГИО:

в качестве реципиентного растения при получении заявляемой трансгенной линии картофеля были использованы интактные (немодифицированные) растения асептической культуры картофеля сорта белорусской селекции Першацвет. Белок Cas9 из *Streptococcus pyogenes* (англ. CRISPR associated protein 9, CRISPR-ассоциированный белок), управляемый при помощи гидовой РНК, связанный с адаптивной иммунной системой CRISPR (англ. Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats) у ряда бактерий [4, 14, 15]. Нуклеаза Cas9 содержит два каталитических домена: RuvC и С-концевой HNH. Каждый домен расщепляет одну из цепей ДНК, в результате чего образуются двухцепочечные разрывы ДНК на 3 п. о. выше мотива PAM [5, 6]. В эукариотических клетках репарацию двухцепочечных

разрывов обеспечивают два основных механизма – NHEJ (nonhomologous end joining – негомологичное соединение концов) и HDR (homology directed repair – репарация на основе гомологичной рекомбинации) [16]. При репарации по типу NHEJ в месте разрыва могут происходить инсерции или делеции небольшой длины – до нескольких десятков пар нуклеотидов. Если место разрыва приходится на кодирующую область гена, возможен сдвиг рамки считывания, приводящий к его нокауту. Данный механизм действует на протяжении всего клеточного цикла и обладает высокой способностью к репарации, так как не требует шаблона репарации (сестринской хроматиды или гомолога) или интенсивного синтеза ДНК. NHEJ восстанавливает большинство типов поломок на порядок быстрее, чем HDR. В основном благодаря данному механизму происходит восстановление целостности нуклеотидной последовательности, нарушенной системой CRISPR/Cas9 [17-19]. Технология редактирования генома на основе системы CRISPR/Cas9 – относительно простой, но эффективный и высокоспецифичный инструмент, с помощью которого в определенные участки растительного генома можно вносить изменения, такие как инсерции, делеции, замены нуклеотидов [20]. В результате может происходить нокаут генов, изменение их аллельного состава и уровня экспрессии. На сегодняшний день данная технология применяется для редактирования генома более 30 видов сельскохозяйственных растений, включая такие важнейшие культуры, как рис, соя, пшеница, кукуруза и картофель [21-24].

При выращивании данных растений отрицательных эффектов на окружающую среду и человека не показано.

5.7. характеристика ГИО в связи с безопасностью для здоровья человека: токсические или аллергенные эффекты ГИО или продуктов, полученных из ГИО:

Анализ гомологии нуклеотидных последовательностей и их аминокислотных продуктов заявляемой трансгенной линии, созданной на

основе сорта картофеля белорусской селекции Першацвет, выявил полную идентичность (100%) с известными последовательностями нуклеотидными последовательностями и их белковых продуктами, представленными в базе данных NCBI.

На основании данных о нуклеотидной и аминокислотной последовательностях продуктов экспрессии трансгенной вставки заявляемой линии картофеля был проведен поиск на присутствие возможных аллергенов и токсинов с помощью базы данных T3DB. Проведенное исследование показало отсутствие гомологии нуклеотидных и аминокислотных последовательностей трансгенной вставки с известными аллергенами и токсинами. Таким образом, в результате проведенных исследований по оценке биобезопасности трансгенной линии картофеля показано, что молекулярно-генетические характеристики продуктов встроенных генов характеризуют их как не представляющие опасности для здоровья человека и животных.

5.8. предлагаемые методы обнаружения и идентификации ГИО, их точность, чувствительность, надежность:

для выявления и идентификации трансгенных растений наиболее надёжным, точным и чувствительным методом является применение ПЦР анализа ДНК растений с использованием ДНК-праймеров к гену эндонуклеазы Cas9 и регуляторным элементами с электрофоретическим разделением продуктов амплификации в 1% агарозном геле.

6. Информация о потенциальной принимающей среде:

6.1. местоположение участка, где будет осуществляться высвобождение:

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

6.2. близость к заповедникам, заказникам и другим природоохранным объектам, и территориям:

в районе расположения опытного поля и поблизости каких-либо природоохранных объектов и территорий нет;

6.3. описание участка:

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 рецепиентных организмов с предполагаемым местом высвобождения ГИО:

место предполагаемого высвобождения заявляемых трансгенных линий картофеля представляет собой отведённый участок земли на экспериментальном поле Института 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 ГИО (по сравнению с интактными реципиентными организмами), которые могут оказывать влияние на

выживаемость, размножение, распространение в потенциальной принимающей среде:

трансгенная линия с инсерцией Т-ДНК, созданная на основе сорта картофеля белорусской селекции Першацвет T_0 поколения, по своим биологическим свойствам ничем не отличаются от реципиентных растений картофеля. Поэтому какого-то специфического воздействия принимающей среды на выживаемость, размножение и распространение трансгенной линии картофеля не предполагается. Положительное свойство трансформантов – возможная устойчивость к фитофторозу будет способствовать повышению выживаемости и урожайности трансгенного картофеля по сравнению с исходным сортом в случае отсутствия контроля за этим патогеном со стороны человека;

7.2. известные и прогнозируемые условия потенциальной принимающей среды, которые могут оказать влияние на выживаемость, размножение и рассеивание ГИО:

на выживаемость и урожайность трансгенной линии, 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 рассеивание трансформантов не будет происходить;

7.3. конкурентное преимущество ГИО (по сравнению с интактными реципиентными организмами):

заявляемая трансгенная линия не отличаются от исходного сорта по морфологии куста, мощности растений. Благодаря устойчивости к фитофторозу трансгенные растения могут превосходить исходный сорт по конкурентоспособности в силу лучшей выживаемости и урожайности в случае отсутствия контроля за патогеном со стороны человека;

7.4. вероятность проявления у ГИО в потенциальной принимающей среде нежелательных свойств, признаков:

вероятность проявления нежелательных свойств и признаков у трансформантов картофеля несущественная;

7.5. вероятность резкого увеличения численности популяции ГИО в потенциальной принимающей среде:

картофель – культурное растение, которое размножается преимущественно вегетативно и не обладает способностью к выживанию вне культурных биоценозов в климатических условиях Беларуси. Заявляемая трансгенная линия не обладает свойствами, которые позволили бы ей 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 ГИО, вероятность переноса трансгенов от ГИО 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. Ранее проведенный эксперимент по опылению кастрированных цветков паслена смесью пыльцы трансгенной линии картофеля, содержащей гена эндотоксина Cry3A (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 является геном картофеля *Solanum tuberosum*, а именно гены St*CHL1* и St*DMR6-1,* задействованные патогеном в колонизации и заражении растительного организма *Phytophthora infestans;*

7.8. предполагаемый механизм и результат взаимодействия ГИО с организмами мишенями:

мишенью для функциональной активности белка Cas9 являются интактные гены картофеля St*CHL1* и St*DMR6-1*, а именно их протоспейсерные последовательности. Данные гены являются регуляторами защитных реакций растения, задействованных патогеном в колонизации и заражении растительного организма *Phytophthora infestans*. Воздействие эндонуклеазы Cas9 на протоспейсерные последовательности данных генов у растений может вызывать устойчивость к фитофторозу без изменения признаков архитектоники;

7.9. идентификация и описание организмов, не являющихся мишенями продуктов трансгенов, которые могут быть подвержены влиянию ГИО:

Нет организмов, не являющихся мишенями продуктов трансгенов;

7.10. другие потенциально возможные взаимодействия ГИО с окружающей средой:

каких-либо других специфических потенциально возможных взаимодействий трансгенных растений с окружающей средой нет;

7.11. информация, касающаяся предполагаемого вида использования ГИО, включая новый измененный вид по сравнению с организмом-реципиентом:

созданная трансгенная линия картофеля отличаются от реципиентного картофеля экспрессией Т-ДНК, несущей ген эндонуклеазы Cas9 и гидРНК под регуляторными элементами (табл. 2). По всем другим биологическим свойствам и признакам трансформанты не отличаются от реципиентного картофеля.

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

8.1. информация о высвобождении генно-инженерных организмов:

целью посадки, созданной на основе сорта картофеля белорусской селекции Першацвет, трансгенной линии, на специальном опытном поле,

является получение семенного поколения, размножение, а также изучение устойчивости растений к грибному патогену *Phytophthora infestans*, оценка их урожайности в сравнении с контрольным сортом 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. Посадка будет осуществляться в оптимальные для посадки картофеля сроки, т.е. в начале мая 2027 года. Поблизости от участка никаких диких и культурных родственных видов, способных к гибридизации с трансгенным картофелем, нет. Посадка обычного картофеля не будет производиться на опытном поле ближе 50 м.

Высвобождение генетически редактированных организмов в окружающую среду предполагается произвести впервые в Беларуси;

8.2. методы мониторинга:

в течение вегетационного периода будет проводиться мониторинг степени повреждения трансгенных и реципиентных (контрольных) растений картофеля фитофторой (таблица 4). После уборки осенью будет дана оценка урожайности трансгенной линии. Будет изучена стабильность созданной трансгенной линии молекулярно-генетическими методами. Растения трансгенной линии 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 ГИО:

для предотвращения рассеивания пыльцы и семян может быть применено удаление цветков или семян путём их обрыва и сжигания в крематоре для трансгенных растений. Однако в нашем случае в конце вегетационного периода вся надземная часть растения будет срезаться и уничтожаться путём сжигания в крематоре.

Трансгенные растения будут высаживаться на специальном опытном поле, 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:

по завершении вегетационного периода вся надземная часть растения будет сожжена в крематоре, а клубни будут тщательно выбраны и перенесены в хранилище и использоваться в дальнейших исследованиях. Участок будет вспахан и заборонован.

Таблица 4 Календарный план экспериментов

№№ п/п	Сроки обследования участка	Показатели	Единица измерения
1	1 фаза –появления всходов (через 20-25 дней после посадки)	Количество проростков на поверхности земли, количество правильно сформированных листьев	1 растение, шт.
2	2 фаза – бутонизация (через 20-25 дней после появления всходов)	Количество бутонов Средний балл поврежденности ботвы фитофторой	1 растение, шт. Баллы
3	3 фаза – начало цветения (через 25-28 дней после появления всходов)	Количество цветков на растении Средний балл поврежденности ботвы фитофторой	1 растение, шт. Баллы

4	4 фаза – формирования зеленых ягод (плодов)	Количество зеленых ягод на растении Средний балл поврежденности ботвы фитофторой	1 растение, шт. Баллы
5	5 фаза –максимальный прирост массы клубней (продолжительность 45-70 дней)	Средний балл поврежденности ботвы фитофторой	Баллы
6	уборка урожая (весь срок созревания 90-120 дней)	количество клубней (шт.), средняя масса клубня (г), масса клубней с растения (г), количество ягод на растении	шт., г

8.5. план действий в чрезвычайных ситуациях, связанных с непредвиденным распространением ГИО:

использование специального опытного поля 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 посторонними лицами, это не может иметь неблагоприятных последствий, так как имеющиеся данные указывают на безопасность заявляемой трансгенной линии 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. Cunningham, MW. Pathogenesis of group A streptococcal infection / MW. Cunningham // Clin Microbiol Rev. – 2000. –Vol. 13, № 3. – P. 470-511. https://doi.org/10.1128/CMR.13.3.470.
3. Cas9 specifies functional viral targets during CRISPR-Cas adaptation / R. Heler, P. Samai, JW. Modell [et al.] // Nature. – 2015. – Vol. 519, № 7542. – P. 199-202. https://doi.org/ 10.1038/nature14245.
4. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity / M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara [et al.] // Science. – 2012. – Vol. 337, № 6096. – P. 816-21. https://doi.org/ 10.1126/science.1225829.
5. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA / H. Nishimasu, F. Ann Ran, Patrick D. Hsu [et al.] // Cell. – 2014. –Vol. 156, № 5. – P. 935-949. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.001.
6. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation / M. Jinek, F. Jiang, David W. Taylor // Science. – 2014. – Vol. 343, № 6176. – P. 1247997. https://doi.org/10.1126/science.1247997.
7. Шишлова-Соколовская, А. М. Создание векторных конструкций, несущих CRISPR/CAS9 систему, для направленного мутагенеза генов *CHL1* и *DMR6-1 Solanum tuberosum* / А. М. Шишлова-Соколовская, О. Ю. Урбанович // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. / Ин-т генетики и цитологии НАН Беларуси; редкол.: А. В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2025. – Т. 38. – С. 25–36.
8. Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* / L. Gritz, J. Davies // Gene. – 1983. – Vol. 25, № 2-3. – P. 179-88. https://doi.org/10.1016/0378-1119(83)90223-8.
9. Efficient inoculation with CaMV 35 S promoter-driven DNA clones of the tobravirus PEBV / SA. MacFarlane, D. Gilmer, JW. Davies // Virology. – 1992. Vol. 187, № 2. – P. 829-31. https://doi.org/10.1016/0042-6822(92)90488-b.

10. Chimeric vector construction for higher-plant transformation / E. Balázs, S. Bouzoubaa, H. Guilley // Gene. – 1985. – Vol. 40, № 2-3. – P. 343-8. https://doi.org/10.1016/0378-1119(85)90059-9. PMID: 3007300.
11. Expression of the Brazil nut methionine-rich protein and mutants with increased methionine in transgenic potato / HM. Tu, LW. Godfrey, SS. Sun // Plant Mol Biol. – 1998. – Vol. 37, № 5. – P. 829-38. https://doi.org/10.1023/a:1006098524887. PMID: 9678578.
12. Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence / A. Depicker, S. Stachel, P. Dhaese [et al.] // J Mol Appl Genet. 1982. – Vol. 1, № 6. – P. 561-73.
13. RNA Pol III promoters-key players in precisely targeted plant genome editing / SD. Kor, N. Chowdhury, AK. Keot [et al.] // Front Genet. – 2023. – Vol. 13. – P. 989199. https://doi.org/10.3389/fgene.2022.989199.
14. Cas9 specifies functional viral targets during CRISPR-Cas adaptation / R. Heler, P. Samai, JW. Modell [et al.] // Nature. – 2015. – Vol. 519, № 7542. – P.199-202. https://doi.org/10.1038/nature14245.
15. Xu, L. Viral detection using Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated protein and Argonaute nucleases / L. Xu, X. Wu // Clinica Chimica Acta. – 2026. – Vol. 578. – P. 120526. https://doi.org/10.1016/j.cca.2025.120526.
16. Devkota, S. The road less traveled: strategies to enhance the frequency of homology-directed repair (HDR) for increased efficiency of CRISPR/Cas-mediated transgenesis / S. Devkota // BMB Rep. – 2018. – Vol. 51, № 9. – P. 437–443. https://doi.org/10.5483/BMBRep.2018.51.9.187.
17. Jasin, M. The democratization of gene editing: Insights from site-specific cleavage and double-strand break repair / M. Jasin, J. E. Haber // DNA Repair (Amst.). – 2016. – Vol. 44. – P. 6–16. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2016.05.001
18. Shrivastav, M. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice / M. Shrivastav, L. P. De Haro, J. A. Nickoloff // Cell Res. – 2008. – Vol. 18, № 1. – P. 134–147. https://doi.org/10.1038/cr.2007.111

19. Pfeiffer, P. Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations / P. Pfeiffer, W. Goedecke, G. Obe // Mutagenesis. – 2000. – Vol. 15, № 4. – P. 289–302. https://doi.org/10.1093/mutage/15.4.289
20. Modern trends in plant genome editing: an inclusive review of the CRISPR/Cas9 toolbox / A. Razzaq, F. Saleem, M. Kanwal [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2019. – Vol. 20, № 16. – P. 4045. https://doi.org/10.3390/ijms20164045
21. Applications of CRISPR/Cas9 technology for modification of the plant genome / S. Deb, A. Choudhury, B. Kharbyngar, R. R. Satyawada // Genetica. – 2022. – Vol. 150. – P. 1–12. https://doi.org/10.1007/s10709-021-00146-2.
22. Van Eck, J. Applying gene editing to tailor precise genetic modifications in plants / J. Van Eck // The Journal of biological chemistry. – 2020. – Vol. 295, №38. – P. 13267–13276. https://doi.org/10.1074/jbc. REV120.010850.
23. The CRISPR/Cas9 system and its applications in crop genome editing / A. Bao, D. J. Burritt, H. Chen [et al.] // Crit Rev Biotechnol. – 2019. – Vol. 39, №3. – P. 321-336. https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1554621.
24. Xie, K. RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR-Cas system. / Xie K, Yang Y. // Mol Plant. – 2013. – Vol. 6, № 6. – P. 1975-83. https://doi.org/10.1093/mp/sst119