



**ЗАЯВКА НА ПОЛУЧЕНИЕ РАЗРЕШЕНИЯ НА ВЫПУСК  
ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННОЙ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ ДЛЯ  
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ ЦЕЛЕЙ В СООТВЕТСТВИИ С  
ИНСТРУКЦИЯМИ ЕЭС 1992 И 1995 ГГ. О КОНТРОЛИРУЕМОМ  
ВЫПУСКЕ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ОРГАНИЗМОВ В  
ОКРУЖАЮЩУЮ СРЕДУ**

Подана

Московским Представительством Хехст Шеринг АгрЭво ГмбХ

Подготовлено

«10» декабря 1997

Московское Представительство Хехст Шеринг АгрЭво ГмбХ

д.9, стр. 3

Борисоглебский пер.

Москва,

Российская Федерация



## ТАБЛИЦА СОДЕРЖАНИЙ

Часть А Информация, необходимая для уведомления о выпуске генетически  
модифицированных высших растений (ГМВР)  
А/1 (17)

Приложение 1:

Плазмидная карта

Свойства между левой и правой границей

Молекулярные свойства

Последовательность между левой и правой границей

Приложение 2:

Геномная характеристика введенной конструкции:

Текст

Анализ Сазерн 1

Анализ Сазерн 2

Конверсия *PPT*

Приложение 3:

Уменьшенная аминокислотная последовательность гена, кодирующего  
фосфинотрицин-ацетил-трансферазу, из культуры *Streptomyces*  
*viridochromogenes*

Документ №: 55138

Приложение 4:

L-фосфинотрицин N-ацетилтрансфераза: Биохимическая характеристика

Документ №.: 50188

Приложение 5:

Карта места выпуска



**МОСКОВСКОЕ ПРЕДСТАВИТЕЛЬСТВО АГРЭВО:  
ЗАЯВКА НА ПОЛУЧЕНИЕ РАЗРЕШЕНИЯ НА ВЫПУСК ГЕНЕТИЧЕСКИ  
МОДИФИЦИРОВАННОЙ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ ДЛЯ НАУЧНО-  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ ЦЕЛЕЙ В СООТВЕТСТВИИ С ОФИЦИАЛЬНЫМИ  
ИНСТРУКЦИЯМИ ЕЭС 1992 И 1995 ГГ. О КОНТРОЛИРУЕМОМ ВЫПУСКЕ  
ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ОРГАНИЗМОВ В  
ОКРУЖАЮЩУЮ СРЕДУ**

**Информация, необходимая для уведомления о выпуске генетически  
модифицированных высших растений (ГМВР) (*gymnospermae* и *angiospermae*)**

**Часть А**

**Общая Информация**

**1. (а) Заявитель:**

Московское Представительство Хехст Шеринг АгрЭво ГмбХ  
д.9,стр. 3  
Борисоглебский пер.  
Москва,  
Российская Федерация

Тел: (095) 956 13 38

**(б) Лица, ответственные за выпуск**

**общая ответственность за планирование выпуска -**

Д-р Эрнст Шилли, Московское Представительство Хехст Шеринг АгрЭво  
д.9,стр. 3 Борисоглебский пер. Москва  
Андрей Гуров, Московское Представительство Хехст Шеринг АгрЭво, д.9,стр. 3  
Борисоглебский пер., Москва

**Осуществление выпуска**

Место осуществления выпуска определяется Национальным  
Координационным Центром Биобезопасности Республики Беларусь.

**2. Название проекта**

Выпуск в полевые условия сахарной свеклы, устойчивой к глюфосинату  
аммония для научно-исследовательских целей.



**Часть Б**

**Информация касательно (А) реципиента или (Б) (где возможно) родительских растений**

**1. Полное название:**

- а) Семейство : *Chenopodiaceae*
- б) Род : *Beta*
- в) Вид : *vulgaris*
- г) Подвид : *vulgaris var altissima*
- д) Сорта (гибриды) : KBC 0195 и KBC 8191
- е) Общеупотребительное название : сахарная свекла

**2. Информация по репродукции:**

а) Репродукция растения

i) Способ или способы репродукции

Репродукция происходит половым путем аллогамией, в основном за счет опыления ветром, хотя и опыление насекомыми при определенных условиях может оказаться важным.

ii) Факторы, влияющие на репродукцию

Особых факторов, влияющих на репродукцию нет за исключением условий повышенной влажности когда опыление с помощью насекомых приобретает более важное значение.

iii) Длительность цикла размножения

В природных экосистемах время размножения составляет два года.

б) Половая совместимость с другими культурными или дикорастущими видами растений

Существует множество доказательств межвидовой гибридизации и также интрогрессии от дикорастущей или приморской свеклы (*B. maritima*) к сахарной свекле. Доказательства обратной интрогрессии от сахарной свеклы к дикорастущей установить сложнее.

(показательств нет?)  
пока



**3. Способность к выживанию**

а) Способность к формированию структур для выживания или периода покоя

Сахарная свекла представляет собой двулетнее растение, выживает из года в год за счет образования семян, хотя в коммерческой практике запаса семян обычно не остается. Следующий способ выживания – это формирование корнеплода и надземной части (короны), превращающейся в растение, позволяющее выжить на второй год. Обычно подобные остатки культуры разрушаются при культивации и при естественном распаде в почве. В самом худшем случае степень выживаемости вряд ли будет выше 2-3% от первоначальной культуры, и то только при предположительном условии, что превентивных обработок (мониторинга и механического или химической уничтожения остатков) не проводилось совсем.

б) Особые факторы, влияющие на выживаемость

Особых факторов, отрицательно влияющих на выживаемость, нет.

**4. Пространственное распространение растения**

а) Средства и степень распространения

Распространение возможно посредством переноса семян или корнеплодов человеком и животными. Со стороны человека распространение либо контролируемое, когда семена выращиваются специально с целью производства семян либо случайное, вызванное потерями при посевных или уборочных работах или ненадлежащей транспортировкой. Также распространять семена могут звери и птицы.

б) Особые факторы, влияющие на распространение растения  
Специфических факторов нет.

**5. Географическое распределение растения**

Сахарная свекла выращивается по всей Европе и по всему миру, особенно в регионах с умеренным климатом. В России сахарная свекла главным образом выращивается во всех регионах Центрального Черноземья и на Северном Кавказе (Краснодарский и Ставропольский край) и некоторых других.

**6. Естественные места произрастания (для завезенных разновидностей)**

Не существенно.



7. **Потенциально значимое взаимодействие с организмами, отличными от растений**

Данные о взаимодействии с организмами, отличными от растений, в экосистемах, где обычно произрастает сахарная свекла, отсутствуют.

**Часть В**

**Информация, касающаяся генетической модификации**

1. **Описание методов, использованных для генетической модификации**

Стандартная      ослабленная      *Agrobacterium*      –      опосредованная трансформация.

Синтетический ген ФАТ, определяющий устойчивость к обработке гербицидом сплошного действия на основе глюфосината аммония (фосфинотрицин-ацетил-трансфераза, далее в тексте используется англ. название – ПАТ, что также относится и к другим названиям генов, их комбинаций и плазмидов), соединяют с промоутером/ терминатором 35S на плазмиде pUC в *E. Coli*. Данную комбинацию генов ПАТ-35S затем удаляют из плазмиды pUC и встраивают в плазмид pOCA18, широко встречающийся у большого числа растений-хозяев (Olszewski et al, 1988, Nucleic Acids Research 16, 10765-10785), между синтетически полученной левой и правой границами определенных последовательностей плазмиды Ti для *Agrobacterium tumefaciens* с целью получения плазмидного вектора pOCA/Ас. Происходит плазмидный обмен со штаммом *A. tumefaciens*, ослабленным за счет удаления всех формообразующих генов, которым потом инфицируется сахарная свекла. Таким образом происходит перенос гена ПАТ-35S вместе с синтетическими границами и мы получаем ГМР (генетически модифицированное растение), устойчивое к гербициду глюфосинат аммония.

2. **Природа и использованный источник переносчика (вектора)**

Природа : плазмид 2  
Идентификационное название : pOCA 18/Ас  
Организм получен из : *E. Coli*

Вектор получен от плазмиды pRK290, встречающегося на большом количестве растений-хозяев, описанного в литературе (Ditta et al, 1980. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 77, 7347-7351). Плазмиды pRK290 и pOCA18/Ас могут быть мобилизованы только при высокой частоте и только при помощи вспомогательного плазмиды. Способностью к самостоятельному переносу они не обладают. Плазмид pOCA18/Ас все-таки происходит в ходе репликации, полученной из плазмиды Pi AN7 от *E. coli*, но это не содержит сайтовую основу



мобилизации и, следовательно, не может стать подвижным без вспомогательного плазмиды. Это означает, что без вспомогательного плазмиды вектор не может быть перенесен в другие бактерии. Такой вспомогательный плазмид отсутствует в *Agrobacterium*, а сам плазмид отсутствует в трансформированном геноме сахарной свеклы.

Генетическая карта представлена в Приложении 1

### 3. Размер, функции и донор каждого фрагмента вставки

Единственный фрагмент, предназначенный для вставки – это синтетический ген 1.3 kb *pat* и ген-промоутер /терминатор 35S от CaMV; ген *nptII* приводится в действие синтетическим промоутером синтазы нопалина, происхождение репликаций P<sub>IAN7</sub> из сайта *E. coli* cos бактериофага Лямбда вместе с синтетически полученными лево- и правосторонними границами.

#### Часть Г

### Информация касательно генетически модифицированного растения (ГМР)

#### 1. Внедренные/модифицированные признаки и характеристики

Цель модифицирования - вставить определенные последовательности ДНК, кодирующие фермент фосфинотрицин ацетилтрансферазу (ген *pat*) в нетрансгенную селекционную линию сахарной свеклы, передавая ей таким образом выносливость к гербициду глюфосинату и устойчивость к канамицину. Коммерческий гербицид продается в виде соли глюфосинат-аммония под торговым названием Баста для использования в полеводстве и садоводстве (зарегистрирован в России и других странах СНГ и мира)

Все остальные характеристики растения остались без изменения.

#### 2. Вставленная последовательность

##### а) Размер, структура и методы анализа

Одна копия вставки устойчиво интегрирована в геном сахарной свеклы. Это можно проверить при помощи анализа Сазерн Блот. См. Приложение 2

##### б) Удаленные участки

Нет

##### в) Расположение вставки в клетках растения

Интегрирована в хромосомы.



г) Количество копий вставки

Анализ Сазерн Блот показывает, что произведена вставка одной копии гена *pat*. См. Приложение 2

3. **Проявление признаков вставки**

а) Проявление признаков и методов анализа

Вставка ДНК специфична для проявления выносливости к глюфосинату и устойчивости к канамицину. Выносливость легко проверить при простом опрыскивании растений гербицидом глюфосинат-аммония. Выносливые растения могут выдерживать дозу до 1500 г. действующего вещества на гектар, в то время как нетрансгенные растения погибают при дозировке 300 – 1000 г. д. в./га в зависимости от их размера и стадии развития.

б) Местоположение проявления вставки

Выносливость к глюфосинату проявляется во всей лиственной части растения за исключением пыльцы.

4. **Различия между ГМР и родителем**

а) Репродукция

Различий не отмечено

б) Распространение

Растение ведет себя точно также как и нетрансформированные линии и поэтому различий при распространении не ожидается.

г) Выживаемость

Поведение точно такое же, как и у немодифицированной культуры.

5. **Генетическая стабильность вставки**

Описываемое здесь ГМР прошло три генерации в полевых испытаниях и осталось стабильным, что подтвердилось выносливостью к глюфосинату на уровне 99 %.

6. **Потенциальная возможность генетического переноса**

Потенциальная возможность для переноса генетического материала состоит в том, что пыльца может быть перенесена на обычные растения свеклы, выращиваемые в коммерческих целях, и на популяции дикой



свеклы *Beta*. Источником такой пыльцы могут быть либо трансгенные растения, которым позволено дать семена (явление цветущности в первый год развития), либо растения, заново выросшие из случайно оставшихся на поле корнеплодов или корон на следующий год после сбора урожая. Любая пыльца с таких растений может быть перенесена ветром на большие расстояния (по крайней мере на 1000 м.), при этом полной изоляции будет достичь сложно. Ограничить подобный перенос пыльцы можно главным образом за счет предотвращения цветения растений трансгенной свеклы путем тщательного уничтожения зацветших в первый год растений и любых остатков растений после сбора урожая. (Свекла на полях находится только в период вегетации, цветоносы первого года можно легко увидеть и удалить до цветения)

**7. Токсичность/вредоносность модификации**

Модификация основана на введении в растения свеклы вставки генетических элементов *Streptomyces*, *CaMv*, *E. Coli*, *A. tumefaciens* и бактериофага Лямбда. Все они классифицируются как организмы группы 1 (не представляющих вреда для здоровья человека или окружающей среды) в соответствии с инструкцией ЕЭС 90/219/ЕЕС.

**8. Взаимодействие с целевым организмом**

Не относится к данному случаю.

**9. Взаимодействие с не целевыми организмами**

В отсутствие гербицида данные ГМР ведут себя точно так же, как и нетрансформированная сахарная свекла. Модификация не дает им каких-либо конкурентных преимуществ по отношению к другой естественной флоре за исключением тех случаев, когда используется вышеуказанный гербицид. Поэтому взаимодействия с другими организмами не ожидается.

**10. Выявление и методы идентификации ГМ растений**

Растения легко выявить по их выносливости к глюфосинату и канамицину. Для генетической и биохимической идентификации ГМР можно применять методы анализа Southern Blot, PCR, ELISA (ИФА).

**11. Предыдущие выпуски ГМР**

Ранее в ЕЭС выпуск в окружающую среду данного трансформанта осуществлялся под следующими номерами:

|                 |            |             |           |
|-----------------|------------|-------------|-----------|
| Франция:        | 94.02.18   | Нидерланды: | 97/06     |
|                 | 95.02.15   | Испания:    | 97/02     |
|                 | 96.02.16   | Бельгия:    | 96/VSP BA |
| Великобритания: | 95/R 19/4  | Германия:   | 97/63     |
|                 | 96/R 19/9  |             |           |
|                 | 97/R 19/13 |             |           |

**Part Д****Информация касательно места выпуска**

1. **Расположение и размер делянки(ок) для выпуска в окружающую среду:**

Ниже следует

**Пункт 1**

Определяется Национальным Центром Биобезопасности Республики Беларусь

Карта: см. Приложение 5

Размер: максимум 1500 кв. м

2. **Экосистема мест выпуска**

Экосистема всех точек испытания представляет собой обычную флору и фауну характерную для мест возделывания сахарной свеклы

3. **Виды, совместимые по половому признаку в местах выпуска в окружающую среду**

Во всех местах трансгенные участки будут <sup>засеяны</sup> посеяны внутри поля с неродственной культурой.

4. **Приближенность к официально охраняемым территориям или центрам происхождения**

Охраняемых территорий и центров происхождения культуры поблизости нет.



**Part E**

**Информация по выпуску в окружающую среду**

**1. Цель**

Целью настоящего выпуска является проведение испытаний на биобезопасность для сбора данных и осуществления регистрации по использованию гербицида глюфосината аммония (продаваемого как Баста) на трансформированной культуре, начиная с 1999г., и гибрида/сорта сахарной свеклы, начиная с 2000/2001 г.

**2. Сроки**

В каждом месте в апреле/мае будет произведен один выпуск (посев) сроком до уборки урожая в октябре/ноябре. Первые испытания будут выполнены в 1999. Мы хотели бы обратиться за разрешением на проведение испытаний в течение 5 лет. До начала сезона будет предоставлена и соответствующим образом согласована информация о месте расположения опытов.

**3. Способ выпуска**

Во всех местах выпуск будет осуществляться в виде посева с помощью обычной сеялки точного высева, предназначенной для проведения испытаний.

**4. Подготовка и контроль делянок**

На всех делянках почва будет подготовлена обычным способом как и для товарного посева сахарной свеклы. Делянки будут обрабатываться для обеспечения хорошего роста культуры и борьбы с серьезными вредителями или грибковыми заболеваниями. Поскольку целью испытаний является тест на безопасность культуры, а также борьба с сорняками с помощью глюфосината и определение его остаточных количеств, будут применяться различные дозировки в различные сроки. Обработка гербицидом будет производиться вручную специальными мелкоделяночными опрыскивателями. Осенью ко времени уборки весь опытный участок будет подвергнут дискованию или роторной культивации для уничтожения свеклы. Затем поле вспашут и посеют зерновые обычным способом для коммерческих целей. В день обработки глюфосинатом и еще 4 – 5 раз в течение сезона 30-50 растений с каждой делянки будут взяты на анализ. Отобранные экземпляры в упакованном виде отправляются в лабораторию, где они измельчаются до тонкой стружки и подвергаются глубокой заморозке перед отправкой в БелНИИЗР (Белорусский НИИ защиты растений) в лабораторию по определению остаточных количеств. Все отходы после проведения необходимых анализов уничтожаются.

Делянки могут быть использованы для демонстрации ГМ культур и применения глюфосината представителям химических, семеноводческих



компаний, фермерам и журналистам. В этом случае разрешается заходить на делянку, не срывая какие-либо части растений.

#### **5. Количество растений, подлежащих выпуску**

Выпуск трансгенных растений происходит в виде обычных одноростковых семян с нормой посева 13 – 14 семян на кв. м. После появления всходов проводится ручное прореживание для получения обычной плотности растений - 8 на кв. м. Общее максимальное количество семян, высаженных на каждой опытном поле, составит 20.000.

### **Часть Ж**

**Информация по контролю, мониторингу, планированию работы после выпуска в окружающую среду и обращение с отходами.**

#### **1. Меры предосторожности:**

##### **а) Расстояние между совместимыми в половом отношении видами**

В первый сезон свекла достигает только вегетативной стадии, а семена не образуются. Растения с цветоносами легко распознаваемы и должны быть уничтожены до начала цветения. Поэтому специальной защитной границы не предусмотрено.

##### **б) Меры по предотвращению или сведению к минимуму возможного распространения пыльцы и семян.**

Риск распространения трансгенной сахарной свеклы возможен только в момент цветения (при распространении пыльцы) и во время образования семян (при разносе животными). В обоих случаях процесс будет находиться под контролем за счет учета и уничтожения всех цветущих частей растения еще до того момента, как появляется пыльца и семена. К тому же, так как модификация является специфичной для устойчивости к глюфосинату, любая утечка не представляет риска для дикорастущей фауны, поскольку трансгенная культура ведет себя точно так же, как и обычная сахарная свекла за исключением устойчивости к гербициду.

#### **2. Способы обработки земли после выпуска**

По окончании испытаний опытные поля будут обработаны в соответствии с общепринятой технологией (культивация и/или вспашка).

#### **3. Способы обработки материала ГМР**



При уборке надземная часть растений и корнеплоды будут распределены по поверхности земли. Это место будет обработано гербицидом на основе сульфонилмочевины (напр. Глин или Гранстар). Через какое-то время на данном поле будет проведена культивация с последующим высевом в течение трех лет других культур.

### **3. Мониторинг полей и технические приемы**

Делянки будут находиться под постоянным контролем с момента высева семян и до сбора урожая в соответствии с требованиями программы испытаний по разработке регламента применения гербицида глюфосината аммония для использования на данной культуре. В период с июня по август делянки с растениями будут проверяться на наличие цветonoсов. Любые найденные цветущие растения будут удалены из почвы, разрезаны на 3 – 4 части во избежание их повторного произрастания и оставлены на данном поле.

### **5. Чрезвычайные меры**

Планирование чрезвычайных мер необходимо только в случае незапланированного, неожиданного распространения растений, как например, при прорастании случайно просыпанных семян. В этом случае дальнейшее распространение будет предотвращено за счет уничтожения последствий, например путем сбора максимально возможного числа семян, контроля данного места на прорастание семян и физического /химического уничтожения всех возможно появившихся растений.

## **Часть 3**

**Информация о потенциальном воздействии на окружающую среду выпуска генетически модифицированных растений.**

### **1. Персистентность и возможность инвазии ГМР.**

ГМР содержит вставленную ДНК, специально необходимую для выражения выносливости к глюфосинату и устойчивости к канамицину. Поэтому нет причин для того, чтобы ГМР вело себя иначе, чем немодифицированная свекла в отсутствии гербицида. Полевые испытания с ГМР не выявили каких-либо характеристик, которые при отсутствии обработки глюфосинатом дали бы растению какие-либо преимущества по сравнению с обычными растениями. ГМР также остается чувствительным к другим гербицидам сплошного действия, например к глюфосату и параквату.

2. **Избирательное преимущество генетической модификации по отношению к видам, совместимым по половому признаку.**

Единственным избирательным преимуществом генетической трансформации по сравнению с другой культурной свеклой, дикой или морской свеклой является устойчивость к глюфосинату. Так как данный гербицид не применяется для борьбы с этими растениями, то практических преимуществ нет.

3. **Воздействие на окружающую среду возможных взаимосвязей между ГМР и целевыми/ нецелевыми организмами.**

Целевых организмов нет и не установлено взаимосвязей с нецелевыми организмами.