

Ocena zagrożenia dla zdrowia ludzi i środowiska w związku z podjęciem działań polegających na zamkniętym użyciu GMM/GMO

Tytuł planowanego zamkniętego użycia GMM/GMO:

Wykorzystanie technik klonowania w celu powielania wybranych fragmentów genomu bądź całego genomu wirusa brązowej plamistości pomidora (tomato spotted wilt virus, TSWV, wg aktualnej nomenklatury: tomato spotted wilt orthotospovirus), badania ekspresji genów oraz analizy patogeniczności.

Podsumowanie oceny zagrożenia w związku z podjęciem działań polegających na zamkniętym użyciu GMM/GMO:

W ramach badań planowane jest wykorzystanie technik klonowania w celu powielenia pełnej długości genomu wirusa brązowej plamistości pomidora typu dzikiego bądź zawierającej mutacje wprowadzone na drodze ukierunkowanej mutagenezy, zrekombinowane pełne długości genomu, lub fragmenty genomu. Prace będą prowadzone na skalę laboratoryjną, w Centrum Badań Organizmów Kwarantannowych, Inwazyjnych i Genetycznie Zmodyfikowanych Instytutu Ochrony Roślin - Państwowego Instytutu Badawczego w Poznaniu.

W przypadku wydostania się GM *E. coli* do środowiska poza pomieszczenia laboratoryjne nie ma ryzyka przeniesienia materiału genetycznego i jego rozprzestrzenienia się. Wykorzystywane do doświadczeń niepatogeniczne, zmodyfikowane szczepy bakterii *E. coli* charakteryzują się niską przeżywalnością w środowisku, a obecność plazmidu z wbudowanym insertem nie wpływa na ich możliwość rozprzestrzenienia się i przetrwania w środowisku. W razie wydostania się GM *A. tumefaciens* do środowiska poza pomieszczenia laboratoryjne (mało prawdopodobna ze względu na stosowane zabezpieczenia) może wystąpić bardzo niskie ryzyko przeniesienia materiału genetycznego bakterii do potencjalnych biorców-roślin wyższych. Jednakże proces ten zajdzie jedynie w sytuacji aktywowania bakteryjnych genów wirulencji i uruchomienia transgenezy w obecności roślinnych elicytorów uwalnianych w momencie mechanicznego uszkodzenia tkanek rośliny.

Przewidziane do użycia w badaniach GMM nie są chorobotwórcze w stosunku do ludzi i zwierząt, nie powodują objawów alergicznych ani skutków toksycznych. GMM nie powoduje żadnych chorób, a zatem nie przewiduje się żadnych niepożądanych efektów wynikających z niemożności leczenia chorób spowodowanych przez GMM.

Ocena zagrożenia dla zdrowia ludzi i środowiska w związku z podjęciem działań polegających na zamkniętym użyciu GMM lub/i GMO

1. Tytuł planowanego zamkniętego użycia GMM/GMO:

Wykorzystanie technik klonowania w celu powielania wybranych fragmentów genomu bądź całego genomu wirusa brązowej plamistości pomidora (tomato spotted wilt virus, TSWV, wg aktualnej nomenklatury: tomato spotted wilt orthotospovirus), badania ekspresji genów oraz analizy patogeniczności.

2. Cechy GMM/GMO

2.1. Charakterystyka biorcy (włączając możliwość zmiany jego cech):

A) *Escherichia coli* (pałeczka okrężnicy) - DH5 α , DH10 β , TOP10, Stellar

B) *Agrobacterium tumefaciens* - GV3101, C58C1

2.2. Charakterystyka insertu

Pełna długość genomu wirusa brązowej plamistości pomidora typu dzikiego bądź zawierająca mutacje wprowadzone na drodze ukierunkowanej mutagenazy, zrekombinowane pełne długości genomu, lub fragmenty genomu.

2.3. Charakterystyka wektorów (dla każdego wektora osobno):

pJET1.2/ pGEM-T EASY - wektory bakteryjne służące do klonowania insertów DNA i ich amplifikacji. Zawierają rozbudowaną sekwencję polilinkerową oraz gen oporności na ampicylinę

pCR-2XL-TOPO/pCR 4-TOPO – wektory służące do klonowania insertów DNA i ich amplifikacji. Zawiera geny oporności na ampicylinę i kanamycynę.

pJL89 – niskokopijny wektor binarny, przydatny do tworzenia zakaźnych klonów cDNA wirusa RNA; stosowany do ekspresji przejściowej białka w roślinach.

2.4. Charakterystyka dawcy (dla każdego dawcy osobno):

Wirus brązowej plamistości pomidora (Tomato spotted wilt virus, TSWV) infekuje wiele gatunków roślin z różnych rodzin należących do zarówno jedno- jak i dwuliściennych. Największe zagrożenie stanowi dla gospodarczo ważnych gatunków roślin uprawnych, w tym pomidora, papryki czy tytoniu, jak również dla roślin ozdobnych (rocznych i bylin) czy licznych chwastów. Przenoszony jest przez wciomastki, jak również mechanicznie. Powoduje zróżnicowane objawy chorobowe w postaci brunatnienia od wierzchołka, nekrotycznych plam, deformacji i przebarwienia owoców, nieregularnych lub okrągłych plam na owocach, zahamowania wzrostu.

2.5. Charakterystyka otrzymanego GMM/GMO:

Bakterie *E. coli* lub *A. tumefaciens* zawierające plazmid z insertem, który może stanowić pełną długość lub fragment wirusa brązowej plamistości pomidora. Są to niepatogeniczne szczepy

laboratoryjne, o zmniejszonej przeżywalności w środowisku ze względu na szereg modyfikacji genetycznych. Bakterie ze względu na obecność plazmidu charakteryzują się opornością na kanamycynę lub ampicylinę.

3. Potencjalne skutki oddziaływania GMM/GMO (prawdopodobieństwo ich wystąpienia oraz ich dotkliwość):

- a. chorobotwórczy wpływ GMM/GMO na ludzi, zwierzęta lub rośliny, w tym objawy alergiczne lub skutki toksyczne
 - otrzymane GMM nie będą wywoływały chorób zakaźnych oraz objawów alergicznych,
 - otrzymane GMM nie będą wywoływały chorób organicznych u zwierząt i ludzi,
 - nie będą posiadały wpływu na patogeny, które są odpowiedzialne za rozprzestrzenianie się chorób zakaźnych ludzi i zwierząt.
- b. niepożądane efekty wynikające z niemożności leczenia chorób spowodowanych przez GMM/GMO lub prowadzenia skutecznej profilaktyki,

GMM nie powoduje żadnych chorób u ludzi, a zatem nie przewiduje się żadnych niepożądanych efektów wynikających z niemożności leczenia chorób spowodowanych przez GMM.

- c. niepożądane efekty wynikające z przedostania się GMM/GMO do środowiska i rozprzestrzeniania się w nim

W przypadku wydostania się GM *E. coli* do środowiska poza pomieszczenia laboratoryjne nie ma ryzyka przeniesienia materiału genetycznego i jego rozprzestrzenienia się. Wykorzystywane do doświadczeń niepatogeniczne, zmodyfikowane szczepy bakterii *E. coli* charakteryzują się niską przeżywalnością w środowisku, a obecność plazmidu z wbudowanym insertem nie wpływa na ich możliwość rozprzestrzenienia się i przetrwania w środowisku. W razie wydostania się GM *A. tumefaciens* do środowiska poza pomieszczenia laboratoryjne (niedostateczna dekontaminacja zawiesiny bakterii GMM) może wystąpić bardzo niskie ryzyko przeniesienia materiału genetycznego bakterii do potencjalnych biorców-roślin wyższych. Jednakże proces ten zajdzie jedynie w sytuacji aktywowania bakteryjnych genów wirulencji i uruchomienia transgenezy w obecności roślinnych elicytorów uwalnianych w momencie mechanicznego uszkodzenia tkanek rośliny.

W celu minimalizacji ryzyka rozprzestrzenienia otrzymanego GMM w środowisku, wszystkie prace będą prowadzone w zamkniętych pomieszczeniach. Pomieszczenia, w których będą prowadzone prace nad GMM jak i potrzebny do pracy sprzęt laboratoryjny są zaprojektowane i usytuowane w sposób ergonomiczny, aby w jak największym stopniu wyeliminować jakiegokolwiek niebezpieczeństwa. Materiał GMM będzie przenoszony tylko w razie konieczności w odpowiednich do tego celu pojemnikach odpowiednio oznakowanych ostrzegawczym symbolem GMM. Podobnie pomieszczenia, jak i sprzęt wykorzystywany do pracy będą oznakowane symbolem GMM, aby zachować szczególną ostrożność.

- d. zdolność naturalnego przenoszenia materiału genetycznego zawartego w GMM/GMO do mikroorganizmów lub organizmów innych niż GMM/GMO.

Otrzymywane GMM (inne niż GMM *A. tumefaciens*) nie mogą mieć nawet teoretycznych negatywnych skutków dla organizmów wyższych, ani negatywnego wpływu na środowisko. Natomiast *A. tumefaciens* posiada naturalną zdolność do przenoszenia materiału genetycznego do roślin wyższych (jedno- oraz dwuliściennych), a właściwości te pozostaną niezmiennie u *A. tumefaciens* GM.

4. Opis działań wykonywanych podczas zamkniętego użycia GMM/GMO oraz ich skala:

Wymienione wektory (pkt.2.3) będą podstawą do uzyskania konstruktów genetycznych niosących sekwencje TSWV, które następnie będą wprowadzane do komórek biorcy za pomocą transformacji, na drodze szoku temperaturowego (ang. *heat shock*) lub metodą elektroporacji. Zmodyfikowane *A. tumefaciens* będą wprowadzane do rośliny gospodarza na drodze infiltracji. Wszystkie odpady (resztki pożywek, niepotrzebne hodowle komórkowe GMM oraz plastiki, szkło laboratoryjne) mające z nimi styczność będą gromadzone w specjalnie oznakowanych pojemnikach i będą na bieżąco autoklawowane. Analogiczne procedury będą stosowane w przypadku bezużytecznych już resztek roślinnych, infiltrowanych GMM.

Prowadzone prace będą miały charakter badań podstawowych. Będą one prowadzone w skali laboratoryjnej. Maksymalna objętość kultur komórkowych podlegających regulacji jednorazowo i w czasie całej procedury– do 1000 ml.

Badania prowadzone będą w specjalnie dostosowanych do tego rodzaju prac pomieszczeniach laboratoryjno-szklarniowych wyposażonych w nowoczesne systemy umożliwiające utrzymanie ściśle kontrolowanych warunków w Centrum Organizmów Kwarantannowych, Inwazyjnych i Genetycznie Zmodyfikowanych Instytutu Ochrony Roślin - Państwowego Instytutu Badawczego w Poznaniu.

5. Opis sposobu postępowania z odpadami oraz ściekami powstającymi podczas zamkniętego użycia GMM/GMO.

Odpady wszystkich hodowli drobnoustrojów na podłożach płynnych i stałych będą autoklawowane na wydzielonych stanowiskach należących do kompleksu pomieszczeń przeznaczonych do pracy z GMM. Zużyty drobny sprzęt jednorazowy będzie gromadzony w specjalnych pojemnikach i również poddany autoklawowaniu. Odpady mające kontakt z antybiotykami będą gromadzone w specjalnych pojemnikach, a następnie autoklawowane i po autoklawowaniu spalane w odpowiednich warunkach. Resztki roślinne będą również poddane autoklawowaniu. Ścieki powstałe w czasie prowadzenia prac badawczych będą dezaktywowane metodą termiczno-chemiczną w oczyszczalni ścieków wyposażonej w dwa zbiorniki – osadnik i komorę reakcyjną. Dekontaminacja odbywa się poprzez zastosowanie podchlorynu sodu oraz podgrzewanie ścieków i osadu (po zapełnieniu zbiornika) do temperatury 70°C przez 2 godziny.