

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Вятский государственный университет»
Биологический факультет
Кафедра микробиологии

Рекомендовано к использованию
в учебном процессе
Протокол заседания кафедры
№ _____ от _____
Заведующий кафедрой
доктор медицинских наук, профессор
_____ И.В. Дармов

Потенциальные риски распространения и использования трансгенных растений

Учебно-методическое пособие

Киров
2012

Допущено к изданию методическим советом биологического факультета ФГБОУ ВПО «ВятГУ» в качестве учебно-методического пособия для студентов направлений 020400 «Биология» и 240700 «Биотехнология» всех уровней подготовки, всех профилей подготовки, всех форм обучения

Потенциальные риски распространения и использования трансгенных растений / Сост. И.А. Лундовских. - Киров: ФГБОУ ВПО «ВятГУ», 2012. – 29 с.

Учебно-методическое пособие предназначено для студентов направлений 020400 «Биология» и 240700 «Биотехнология» всех уровней подготовки, всех профилей подготовки, всех форм обучения для самостоятельной работы и подготовки к практическим занятиям по курсам «Генная инженерия», «Современные проблемы биологии».

Содержание

Введение.....	4
1 Источники потенциальных рисков при распространении и использовании трансгенных растений.....	7
2 Потенциальные риски использования трансгенных растений.....	12
2.1 Пищевые риски и другие негативные воздействия на здоровье человека и животных	12
2.2 Экологические риски	19
2.3 Агротехнические риски	22
Список использованных источников	24

Введение

Трансгенные (генетически модифицированные) организмы можно определить как организмы, генетический материал которых изменен способом, недостижимым естественным путем в ходе скрещивания или рекомбинации [1, 2]. С развитием методов генетической инженерии и технологий создания рекомбинантных ДНК появилась возможность внедрять в живые организмы гены других организмов либо искусственно созданные генетические конструкции с целью направленного изменения целевых признаков организма. На ранних этапах развития генетической инженерии растений создание трансгенных культур было направлено на получение высокоурожайных сортов сельскохозяйственных культур, при этом в растения вводили гены, обеспечивающие их устойчивость к неблагоприятным условиям среды, вирусам, гербицидам, насекомым-вредителям, а также гены, замедляющие старение и улучшающие питательные свойства [3-4]. В настоящее время стоит задача создания на основе растений «биореакторов» для крупномасштабного синтеза новых соединений, используемых в медицине, химическом производстве и других областях: особых жирных кислот, новых полимеров, полезных белков с высоким содержанием незаменимых аминокислот, модифицированных полисахаридов, съедобных вакцин, антител и других белков медицинского назначения [3-8].

Процедура создания трансгенных растений является многостадийным процессом, включающим следующие этапы: перенос трансгенной генетической конструкции, несущей целевой ген, в растительные клетки (трансформация); стабильная интеграция чужеродного материала в геном растительной клетки, обеспечивающая достаточный уровень экспрессии трансгена; отбор трансформантов и регенерация полноценных трансгенных растений. Генетическая конструкция, вводимая в растительную клетку при создании трансгенных линий, обычно содержит экспрессионную каскаду целевого гена, включающую белок-кодирующую структурную после-

довательность и регуляторные элементы транскрипции и трансляции; а также маркерный ген и участки, направляющие интеграцию трансгенной конструкции в геном растительной клетки. Отдельные элементы экспрессионной кассеты могут быть различного происхождения (выделены из различных организмов – вирусов, бактерий, растений, животных).

Для трансформации растений применяют как биологические системы доставки трансгенных конструкций (векторы на основе плазмид агробактерий и вирусов растений), так и методы прямого введения трансгенов в растительные клетки. Наиболее широко используемыми технологиями переноса генетических конструкций при создании трансгенных растений являются трансформация с применением векторов на основе плазмид грамотрицательных почвенных бактерий рода *Agrobacterium* и бомбардировка растительных клеток микрочастицами (биологическая баллистика, биолистика) [9-15].

При агробактериальной трансформации растений используют рекомбинантные векторы на основе Ti-плазмид *Agrobacterium tumefaciens*, содержащие T-ДНК сегмент, в составе которого экспрессионные кассеты целевого и маркерного генов окружены правым (RB) и левым (LB) концевыми повторами. В процессе трансформации T-ДНК переносится в клетки растения и стабильно встраивается в ядерный геном. В геном растения могут включаться одна и более копий T-ДНК. Множественные копии T-ДНК способны образовывать тандемные повторы либо быть интегрированными в различные, преимущественно активно транскрибируемые участки генома растения; при этом сайты интеграции неспецифичны по отношению к нуклеотидным последовательностям [15-17].

Метод «биолистической» трансформации, включающий биологические и баллистические технологии, является одним из самых эффективных методов введения молекул ДНК в клетки растений, в том числе однодольных, устойчивых к агробактериальной трансформации. Микрочастицами, несущими чужеродную ДНК, заряжают генную пушку, обеспечивающую

ускорение частиц, которые пробивают клеточные стенки и проникают внутрь клетки; чужеродная ДНК, в конечном итоге, оказывается в ядре либо в пластидах растительной клетки [18-20]. Генетические конструкции, вводимые методом биологической баллистики (биолистики), могут представлять собой кольцевые или линейные векторы, либо линейные фрагменты ДНК, содержащие целевой и маркерный гены в составе экспрессионных кассет, функционирующих в растительных клетках. Трансформация клеток линейными фрагментами, включающими трансгенные экспрессионные кассеты, называемая «чистой генной технологией», исключает возможную интеграцию векторных последовательностей в геном растений [21]. В клетке молекулы ДНК, введенные методом биолистики, рекомбинируют между собой и геномной ДНК и интегрируются случайным образом в геномы растительных клеток в индивидуальном или, чаще, в мультимерном виде. Как и другие методы прямого введения ДНК в клетки растений, биолистическая трансформация характеризуется высокой частотой формирования различных комбинаций встроенных трансгенных структур, том числе интеграцией множества копий трансгена в геном растения, что может повлиять на экспрессию трансгена в растительных клетках и инициировать механизм сайленсинга (замолкания) генов [22].

Низкая эффективность используемых в настоящее время технологий введения и интеграции чужеродных фрагментов ДНК в геном растений делает необходимым включение в состав трансгенных конструкций маркерных генов, экспрессия которых позволяет проводить идентификацию и отбор трансформантов [23]. После завершения стадии селективного отбора трансгенных растений дальнейшее присутствие маркерных генов и их продуктов в клетках растений не является необходимым, более того, создает потенциальный риск проявления незадаанных эффектов и может оказать неблагоприятное воздействие на человека, животных и окружающую среду. В настоящее время активно разрабатываются различные технологии создания безмаркерных трансгенных растений, в том числе методы элими-

нации маркерных генов из геномов генетически модифицированных культур после стадии селективного отбора трансформантов. Для создания безмаркерных трансгенных растений используют три основных подхода: трансформация и отбор генно-модифицированных растений без применения селективных маркерных генов; ко-трансформация целевого и маркерного генов в составе двух различных ДНК-фрагментов и последующая сегрегация трансгенов в процессе скрещивания регенерированных трансформантов; удаление маркерного гена из генома трансгенных растений методами транспозиции, гомологичной и сайт-специфической рекомбинации после селективного отбора трансформантов [24-30].

Распространение и использование трансгенных растений в качестве продовольственного сырья и суперпродуцентов соединений промышленного и медицинского назначения требует тщательной медико-биологической оценки безопасности генетически модифицированных культур, которая включает проведение домаркетинговой экспертизы безвредности и потенциальных рисков использования трансгенного растения, регистрацию трансгенных культур и пострегистрационный мониторинг за обращением трансгенных растений [31-38].

1 Источники потенциальных рисков при распространении и использовании трансгенных растений

Потенциальные риски, связанные с распространением и использованием трансгенных растений, обусловлены несовершенством применяемых в настоящее время технологий введения чужеродных генетических конструкций в геном растений, не обеспечивающих точную интеграцию трансгенных фрагментов в заданные локусы генома растения и контролируемую экспрессию трансгенов. Молекулярный механизм интеграции чужеродных генетических конструкций в геном растительной клетки вызывает непредсказуемые изменения, мутации и структурные перестройки как

в участке интеграции, так и за его пределами, независимо от того, какая генетическая конструкция встраивается в геном растения. Регенерация из трансформированных клеток полноценных фертильных трансгенных растений, как правило, проходит через стадию культивирования клеток и тканей, что также способствует возникновению дополнительных мутаций в геноме растения. В результате этого геном трансгенной культуры может содержать до 2-4 % нуклеотидных замен по сравнению с геномом исходного растения [39].

Активно разрабатываемые в настоящее время технологии создания безмаркерных трансгенных растений, основанные на удалении маркерного гена после завершения стадии селективного отбора трансформантов, позволяют уменьшить содержание чужеродного генетического материала, не участвующего в проявлении целевых признаков, в составе интегрированных в геном растения конструкций, и снижают риск распространения маркерных генов устойчивости к антибиотикам и гербицидам в окружающей среде. Однако подходы к созданию безмаркерных трансгенных растений не снимают проблему рисков проявления незадаанных эффектов вследствие дестабилизации генома растения при интеграции и перестройке трансгенных конструкций.

Процессы гомологичной рекомбинации, а также ферментативно регулируемые реакции транспозиции и рекомбинации для удаления маркерного гена из интегрированной в геном трансгенной конструкции связаны с разрывом и перевоссоединением цепей ДНК, что может активировать системы рекомбинации и репарации растительных клеток и вызвать дополнительные перестройки в участке интеграции и других участках генома растения. Присутствие мобильных элементов в составе интегрированной трансгенной конструкции для удаления маркерного гена в ходе транспозиции создает дополнительный потенциальный риск проявления незадаанных эффектов вследствие дестабилизации генома. Транспозиция (перемещение) мобильного элемента может вызвать перестройки в соседних хромо-

сомных локусах (делеции, дупликации, инверсии, транслокации, хромосомные разрывы и воссоединения и т.п.), и нарушение экспрессии генов. Встраивание *Ac*- и *Ds*-элементов, несущих трансгенные конструкции, в геном растительной клетки сопровождается дупликацией сайта-мишени размером 8 п.н. При утрате или транспозиции мобильного элемента дублированный участок в геноме растения сохраняется. Вырезание мобильного элемента из сайта-мишени также происходит неточно. Способность удаляемых мобильных элементов к реинтеграции в геном растения усложняет отбор и снижает частоту получения безмаркерных трансформантов [40-41].

Для получения безмаркерных трансгенных растений в настоящее время активно используют системы сайт-специфической рекомбинации: *Cre/loxP* систему бактериофага P1 *E. coli*, *R/RS* систему плазмиды SR1 *Zygosaccharomyces rouxii* и *FLP/FRT* систему 2-микронной плазмиды *Saccharomyces cerevisiae* [29-30]. Рекомбинация между двумя ориентированными в одном направлении сайтами, расположенными на одной молекуле ДНК, вызывает удаление сегмента, лежащего между сайтами рекомбинации. Тем не менее, вероятность реинтеграции удаленного сегмента ДНК в случайные участки генома растения в результате незаконной рекомбинации остается, что необходимо учитывать при анализе создаваемых трансгенных культур растений [42]. Анализ структуры геномов хлоропластов транспластомных культур, полученных с применением *Cre/loxP* системы сайт-специфической рекомбинации, выявил в составе пластидной ДНК два псевдо-*loxP* участка (*lox-psbA* и *lox-rps12*), имеющих некоторую степень гомологии с сайтами *loxP* и узнаваемых рекомбиназой *Cre*. Экспрессия гена рекомбиназы *Cre* для удаления экспрессионной кассеты маркерного гена индуцирует делеции между данными участками в составе ДНК пластид [43].

Создание безмаркерных трансгенных растений на основе технологий удаления маркерных генов, связанных с дополнительными перестройками чужеродных генетических конструкций в составе генома растения, не от-

меняет процедуру оценки безвредности безмаркерных трансгенных растений для регистрации получаемых трансгенных культур.

Потенциальные риски отрицательного влияния трансгенных культур на окружающую среду, а также на здоровье человека и животных, определяются природой модификации растительного генома (структурой интегрированной трансгенной конструкции) и пути осуществления модификации (участком интеграции трансгенной конструкции и технологией встраивания). Объективные причины наличия биологических рисков при распространении и использовании трансгенных растений могут быть следующими [1-2, 44].

1. Непредсказуемость участка интеграции трансгенной ДНК в растительный геном и числа встроенных копий трансгена. Вследствие этого невозможно предвидеть последствий подобной модификации генома и ее проявления на уровне индивидуальных генов (регуляторных или структурных), метаболизма, функционирования и выражения фенотипических признаков растения.

2. Слабая изученность структуры, механизмов функционирования и регуляции экспрессии генома высших растений, не позволяющая осуществлять направленные модификации и учитывать их возможные последствия.

3. Плейотропный эффект встроенного гена. Экспрессия интегрированного чужеродного гена, а также экспрессия окружающих его генов в геноме растения, во многом зависит от того, в какой участок генома встраивается трансген. Случайно встроенный фрагмент ДНК может вызвать активацию или замолкание индивидуальных генов, индуцировать эндогенные системы рекомбинации, что делает вероятным изменение работы генетического аппарата клетки, модификацию клеточного метаболизма (направление изменений которого заранее невозможно предвидеть), синтез токсичных или аллергенных соединений, ранее не свойственных растительным клеткам.

4. Нарушение стабильности генома и изменение его функционирования вследствие самого факта переноса чужеродного фрагмента ДНК. Исследования показывают, что даже коммерческие линии трансгенных растений, прошедшие процедуру лицензирования и регистрации, не сохраняют генетической стабильности и, следовательно, являются потенциально опасными для здоровья человека и окружающей среды.

5. Нарушение стабильности встроенного в геном чужеродного фрагмента ДНК. Клетки высших растений имеют сложные и эффективные системы распознавания и подавления функционирования чужеродного генетического материала.

6. Наличие во встраиваемом фрагменте ДНК «технологического мусора», включающего гены устойчивости к антибиотикам, другие фрагменты ДНК, не участвующие в проявлении целевого признака, вирусные промоторы, прежде всего 35S-промотор, и бактериальные терминаторы, то также может привести к нежелательным последствиям.

7. Аллергические и токсические эффекты чужеродного белка, кодируемого трансгеном.

8. Плейотропное действие белка, кодируемого чужеродной ДНК, вследствие взаимодействия данного белка с белками растительной клетки. Что способно вызвать неопределенные изменения клеточного метаболизма.

Все перечисленные выше, а также ряд других недостатков, связанных с несовершенством технологий получения трансгенных растений, являются источниками реальных или потенциальных биологических или экологических рисков, которые нельзя не принимать во внимание. Отсюда следует, что широкомасштабное коммерческое использование трансгенных растений и полученных из них продуктов питания и других соединений медицинского и промышленного назначения допустимо лишь тогда, когда производитель предоставит исчерпывающую информацию по биологической безопасности трансгенной культуры.

2 Потенциальные риски использования трансгенных растений

К настоящему времени накоплено немало фактов потенциального риска распространения и использования трансгенных растений с точки зрения медико-биологических и экологических позиций [1, 2, 45-48].

Негативные последствия от распространения и использования трансгенных растений можно объединить в три группы: пищевые, экологические и агротехнические риски [1-2].

2.1 Пищевые риски и другие негативные воздействия на здоровье человека и животных

Угнетение иммунитета, возможность острых нарушений функционирования организма, таких как аллергические реакции и метаболические расстройства, в результате непосредственного действия трансгенных белков. Одной из наиболее спорных проблем, связанных с использованием и распространением трансгенных растений, стала проблема потенциального влияния на здоровье человека продуктов, полученных из трансгенных культур или содержащих их ингредиенты. В связи с неблагоприятной экологической обстановкой, изменением традиционного рациона питания и применением современных технологий пищевой промышленности, приводящими к повышенному содержанию в пище химических добавок и консервантов, распространенным явлением среди населения развитых стран стала аллергия на продукты питания.

Модификация генома растения при создании трансгенных культур может снизить безопасность продуктов питания, если при попадании в организм с пищей чужеродный белок, синтезируемый растительными клетками на основе интегрированной трансгенной конструкции, окажется токсичным или вызовет развитие аллергической реакции. Широко известным примером является перенос гена, кодирующего известный аллерген бра-

зильского ореха 2S-альбумин, в геном исходно безопасного сорта сои. При тестировании аллергенности трансгенной сои сыворотка пациентов с аллергией к бразильскому ореху перекрестно реагировала с белком трансгенной сои [49]. Плоды трансгенного растения папайи, устойчивого к одному из вирусных заболеваний, оказались сильными аллергенами. Трансгенная соя, устойчивая к гербициду раундапу, также может вызывать аллергию у людей. Кукуруза сорта StarLink, синтезировавшая Bt-токсин (Cry9C), была разрешена к использованию в качестве лишь кормовой культуры по причине высокой аллергенности чужеродного белка [50-51].

Как правило, аллергенным или токсическим действием обладают трансгенные белки, обеспечивающие устойчивость растений-реципиентов к поражению различными видами насекомых, грибковыми или бактериальными заболеваниями [1]. К настоящему времени накоплено достаточно много данных, свидетельствующих о значительной токсичности или аллергенности данного класса белков при их введении перорально. Выраженной токсичностью для млекопитающих обладают многие лектины; ингибиторы рибсомальных белков (RIPs), сериновых и цистеиновых протеаз, альфа-амилазы; хитиназа и др. [45]. Установлено, что длительное воздействие на организм крыс соевых ингибиторов протеаз в качестве пищевой добавки приводило к гипертрофии и гиперплазии поджелудочной железы, вплоть до неопластических новообразований и карциномы [51]. Подобное действие ингибиторов эндопептидаз сои на поджелудочную железу отмечено и для человека [52]. Белки лектины были одними из первых трансгенов при формировании устойчивости к насекомым-вредителям. Связываясь с поверхностью клеток, они приводят к их слипанию и нарушению физиологических функций организма. Однако, проводимые работы с трансгенными инсектицидными лектинами бразильского ореха (*Bertholletia excelsa*) были прекращены в связи с их высокой аллергенностью. В ряде публикаций обсуждается аллергенное действие трансгенных белков хитиназ, способных разрушать хитиновые стенки вредителей (насекомых и

грибов). Генами хитиназы модифицированы различные сорта риса, картофеля, пшеницы и других культур [44].

Сравнительный анализ частоты заболеваний, связанных с качеством продуктов питания, был проведен в США и странах Скандинавии. Население этих стран имеет достаточно высокий уровень жизни, качественно близкую продуктовую корзину, сопоставимые медицинские услуги. Оказалось, что за несколько последних лет в США в 3,5 раз была выше частота пищевых заболеваний, чем в странах Скандинавии. Единственным существенным различием в качестве питания является активное употребление в пищу ГМ продуктов населением США и их практическое отсутствие в рационе народов Скандинавии. В России до появления импортных ГМ продуктов, по данным отечественных аллергологов, уровень аллергических заболеваний был в 5,7 раз ниже, чем в США. За последние годы эта разница практически нивелировалась. Эти косвенные данные позволяют предполагать, что повышение уровня аллергических заболеваний связано с увеличением в пищевом рационе ГМ продуктов [2].

Система оценки безопасности трансгенных растений основное внимание концентрирует на исследовании белка, кодируемого целевым трансгеном. Этот белок сравнивается по аминокислотному составу с известными белковыми токсинами и аллергенами из коллекции баз данных и на основании проведенного анализа делается вывод о степени сходства. Дальнейшая оценка белка включает определение острой токсичности на лабораторных животных, скорости разрушения белка в модельном желудочном и кишечном соке, распаде при приготовлении пищи и потенциальной аллергенности. Если показано, что белок медленно расщепляется в процессе пищеварения и имеет в своей структуре участки, характерные для известных белковых токсинов и аллергенов, то проводятся длительные токсикологические исследования. При отсутствии токсичности и аллергенности белка продукты питания и корма, полученные на основе трансгенной куль-

туры, признаются такими же безопасными, как и традиционный продукт [32, 34-35].

Приобретение растением способности синтезировать токсичные для человека метаболиты вследствие интеграции трансгенной конструкции. Незапланированный эффект трансгеноза отмечен у растений картофеля, рапса, риса, пшеницы и сои. Появившиеся фенотипические и физиолого-биохимические изменения этих растений авторы исследований объясняют плеiotропным действием трансгенов, которое заключается в модификации и изменении экспрессии части генов растения-реципиента. При этом обнаружено отрицательное действие трансгеноза на растения и их урожай. Сопутствующие отрицательные явления проявились в нарушении метаболизма, увеличении содержания гликоалколоидов, негативном изменении строения клубня, индукции некрозов и фитотоксичности, повышение содержания лигнина, растрескивании стебля, а также снижении урожайности, причём три последние признака были обусловлены генами, детерминирующими биохимические показатели урожая [37]. Выявлять появление новых токсичных соединений, синтезируемых трансгенной культурой вследствие плеiotропного действия трансгена, исключительно трудно, так как невозможно заранее предсказать ни возможность синтеза таких веществ, ни их химическую природу.

Ряд трансгенных сортов кукурузы, табака и помидоров, устойчивых к насекомым вредителям, вырабатывают лигнин – вещество, препятствующее поражению растений. Он может разлагаться на токсичные и мутагенные фенолы и метанол. Поэтому увеличение содержания лигнина в плодах и листьях растений опасно для человека. В работах по созданию трансгенных растений с устойчивостью к неблагоприятным факторам среды и для увеличения урожайности используется ген, кодирующий синтез фермента аргининдекарбоксилазы. Результатом усиленного синтеза этого фермента у трансгенных табака и риса является повышенное содержание

агматина и вторичных продуктов его разложения. Эти вещества способны влиять на деление клеток и способствуют образованию опухолей [44].

Для оценки пищевых рисков распространения и использования подобных трансгенных культур необходимо осуществление длительных тестов, которые не всегда проводятся.

Риски, опосредованные накоплением гербицидов и их метаболитов в устойчивых сортах и видах сельскохозяйственных растений. Устойчивые к гербицидам трансгенные растения не повреждаются высокими дозами сельскохозяйственных химикатов, но при этом приобретают способность их аккумулировать. Однако, практически все пестициды токсичны для человека. Например, широко используемый пестицид глифосат является канцерогеном и вызывает образование лимфомы. В литературе имеются данные, что при обработке глифосатом устойчивых к нему сортов сахарной свеклы, растения накапливают токсичные метаболиты глифосата [53]. Показана способность репродуктивных тканей хлопчатника, устойчивого к глифосату, к очень высокому накоплению этого гербицида [44].

Негативные воздействия на здоровье животных и человека ГМ продуктов при их длительном и неконтролируемом употреблении. Известны лишь отдельные данные по негативному влиянию длительного употребления ГМ-продуктов питания, например трансгенного картофеля, на организм животных. Так, было экспериментально продемонстрировано, что длительное скармливание животным трансгенного картофеля вызывает у них изменения внутренних органов, в частности слизистой оболочки кишечника, частичную атрофию печени и изменение тимуса. Подобные данные по влиянию трансгенного картофеля на организм животных получил также директор Института питания РАМН академик В.А.Тутельян. Животным скармливали вареный картофель нормальный или устойчивый к колорадскому жуку (Рассет Бербанк Ньюлиф) в течение 1 или 6 месяцев. Включение в рацион крыс трансгенного картофеля на протяжении 6 месяцев приводило к статистически достоверному снижению концентрации ге-

моглобина. Изменения печени встречались в 3 раза чаще, чем у животных, которым скармливали контрольный картофель, измененные гепатоциты обнаруживались во всех долях печени; одновременно наблюдались признаки жировой дистрофии, статистически достоверное увеличение абсолютной массы почек, чаще встречались макроскопические изменения органов [2].

Риски горизонтального переноса трансгенных конструкций, в первую очередь в геном симбионтных для человека и животных бактерий. Помимо целевых генов в составе трансгенной конструкции в геном растения интегрируются и не участвующие непосредственно в проявлении целевого признака последовательности, в частности, гены устойчивости к антибиотикам. Существует опасение, что широкое применение в качестве селективных маркеров генов устойчивости к антибиотикам может способствовать распространению устойчивых к ним новых штаммов болезнетворных бактерий. В настоящее время запрещено использовать в коммерческих масштабах сорта трансгенных растений, в которых присутствуют гены устойчивости к антибиотикам или вирусные промоторы. Тем не менее в подавляющем большинстве случаев продолжается выращивание подобных трансгенных культур. Создание безмаркерных трансгенных растений ограничивает риск распространения генов устойчивости к антибиотикам в окружающей среде и передачу данных генов бактериям желудочно-кишечного тракта человека.

Опасность появления новых вирусных патогенов. Регуляторные элементы, выделяемые из вирусных ДНК, активно используются для регуляции экспрессии чужеродных генов в трансгенных растениях. Вирусные ДНК-конструкции иногда используются также в качестве целевых генов для формирования у растений устойчивости к вирусам-вредителям. Некоторые специалисты считают, что возможное взаимодействие вирусных фрагментов ДНК в составе интегрированной трансгенной конструкции с геномами родственных вирусов дикого типа необходимо учитывать при

проведении оценки риска с целью выяснения степени вероятности возникновения новых штаммов вирусов в ходе процесса рекомбинации. Встроенные в геном растения гены вирусов могут соединяться с генами инфекционных вирусов, что может сделать их более агрессивными и менее видоспецифичными (с широким кругом хозяев).

Риски производства препаратов медицинского назначения с помощью трансгенных растений. На современном этапе развития генетической инженерии растений основной задачей является создание трансгенных культур – суперпродуцентов соединений промышленного и медицинского назначения. В настоящее время создаются и проходят лабораторные испытания трансгенные сорта риса и кукурузы, способные вырабатывать биологически активные вещества, в том числе: вакцины, гормоны роста, факторы свёртывания крови, используемые в промышленности ферменты, человеческие антитела, контрацептивные белки, подавляющие иммунитет цитокины и т.п. Существуют следующие потенциальные риски неконтролируемого использования такой продукции [1]:

- угроза переопыления и неконтролируемого распространения таких сортов среди пищевых растений и заражения диких растений;
- риск неконтролируемого распространения вакцин в составе пищевых продуктов;
- распространение вакцин и биоактивных веществ, выделяющихся из гниющих растительных остатков, через почвенные и поверхностные воды.

Таким образом, при длительном и неконтролируемом использовании пищевых продуктов на основе трансгенных культур нельзя исключить их негативного влияния на здоровье человека. Рассмотренные потенциальные риски являются результатом изменения метаболизма трансгенного растения вследствие дестабилизации генома, плеiotропного характера действия чужеродного гена и его эпистатического действия на гены растения-реципиента. Разработка новых методов направленной интеграции

трансгенных конструкций в заданные участки генома растения и контролируемая экспрессия трансгена позволят уменьшить вероятность проявления незадаанных эффектов и повысят безопасность трансгенных культур.

2.2 Экологические риски

Неконтролируемый (горизонтальный) перенос трансгенов в биоту и возникновение организмов с мутантными свойствами. Неконтролируемый перенос трансгенов, определяющих различные типы устойчивости к гербицидам, вредителям и болезням растений, неблагоприятным условиям среды вследствие переопыления с дикорастущими родственными видами, может привести к снижению биоразнообразия дикорастущих предковых форм культурных растений, нарушению равновесия биоценозов и формированию «суперсорняков» в результате развития гербицид- и инсектицид-устойчивости сорных растений [48]. Возможность скрещивания трансгенных растений с их сородичами выявлена для целого ряда перекрёстноопыляемых культур (рис, рапс, подсолнечник, кукуруза, сахарная свёкла и др.). Это зависит от близости видов, с которыми трансгенные растения могут скреститься. Показано, что при возделывании трансгенного рапса вероятность скрещивания и получения жизнеспособного потомства весьма высока. Причем не только от опыления традиционных (нетрансгенных) сортов рапса, но и крестоцветных сорняков (рода *Brassica*), поскольку признак устойчивости к глифосфату является доминантным [54]. Отдаленные экологические последствия подобного трансгенного загрязнения агроландшафта предсказать трудно. Помимо этого, сохранение в почве семян трансгенных растений и их последующее распространение самосевом (падалицей), а также непреднамеренный перенос посевного материала животными в другие районы или даже страны может привести к загрязнению агроландшафта и изменению аборигенной природной флоры.

Трансгенные культуры, имеющие преимущества в развитии в естественных условиях сами могут стать суперсорняками и распространяться на другие территории, вытесняя другие культуры или скрещиваясь с ними. Увеличение использования специфических гербицидов на полях возделывания трансгенных культур может привести к появлению гербицидоустойчивых форм сорных растений. Уже известно более 40 видов сорных растений, которые быстро приобрели устойчивость к производным гербицида сульфонилмочевины. Зарегистрирован ряд видов злаковых и бобовых сорняков, устойчивых к глифосату. Среди последних примеров - возникновение резистентности к глифосфату у *Conyza canadensis*, являющегося постоянным компонентом агроценозов сои в США. Всего за 3 года бессменного возделывания трансгенной глифосфатустойчивой сои мелколепестник канадский увеличил устойчивость к этому гербициду в 8-13 раз [44, 54].

Поражение нецелевых видов растений, насекомых, других животных, бактерий продуктами экспрессии трансгена и нарушение трофических цепей. Трансгенные растения с генами Bt-токсинов способны не только прямо воздействовать на жизнеспособность и поведение многих видов насекомых и клещей, питающихся растительным соком и пыльцой, но и косвенно нарушать сложившиеся биоценотические отношения путем передачи своих токсинов в целый ряд других организмов по трофической цепи [2, 55-56]. Так, при изучении косвенного влияния CryIAb-токсина, продуцируемого трансгенными растениями, в системе хищник (златоглазка обыкновенная) - жертва-фитофаг (кукурузный мотылёк) обнаружено негативное влияние энмотоксина на рост и развитие личинок энтомофага [54].

Сорта растений, модифицированные с помощью методов генной инженерии, могут стать непривлекательными для вредителей (например, картофеля, синтезирующий Bt-токсин), что может подтолкнуть вредителей к освоению новых, ранее массово не поражаемых таксономически близких

видов растений (для колорадского жука - других паслёновых - томатов, перца, баклажанов).

В природе у каждого вида есть естественные враги и паразиты, не позволяющие этому виду чрезмерно размножаться. Воздействие токсинов трансгенных растений на хищных и паразитических насекомых может привести к серьезным нарушениям в экосистемах, в том числе к неконтролируемым вспышкам численности одних видов и вымиранию других. Известны случаи нарушения процессов роста и жизнедеятельности представителей одного вида божьих коровок, основной пищей которых являлись личинки, выращенные на трансгенном картофеле [44].

Появление устойчивости к трансгенным токсинам у насекомых-фитофагов, бактерий, грибов и других вредителей. В 90-х годах появились первые сообщения о возникновении устойчивости к *Bt*-препаратам в природных популяциях капустной моли. В 1993 г. в США было установлено, что после обработки в полевых условиях *Bt*-препаратом популяций колорадского жука и последующего отбора устойчивых особей в лабораторных условиях в популяции из Мичигана через 12 поколений возникает 60-кратная устойчивость к энтомотоксину, а в популяции из Мериленда через семь генераций - 8-кратная [54].

Истощение и нарушение естественного плодородия почв. Трансгенные культуры с генами, ускоряющими рост и развитие растений, в значительно большей степени, чем обычные, истощают почву и нарушают её структуру. В результате подавления токсинами трансгенных растений жизнедеятельности почвенных беспозвоночных, почвенной микрофлоры и микрофауны происходит нарушение естественного плодородия почв.

Создание устойчивых к гербицидам трансгенных сортов растений увеличивает расход химикатов и обостряет проблему химического загрязнения окружающей среды.

В настоящее время убедительно доказано наличие экологических рисков при выращивании трансгенных культур, которые касаются прежде

всего утраты и уменьшения разнообразия генофонда диких растений, животных и микроорганизмов; появления суперсорняков, формирования новых устойчивых к токсинам популяций насекомых, загрязнения и полной (безвозвратной) потери ценных традиционных сортов важнейших сельскохозяйственных культур, а также загрязнения окружающей среды химикатами, прежде всего гербицидами [2].

2.3 Агротехнические риски

Использование трансгенных растений в сельском хозяйстве создает значительные агротехнические риски.

Снижение сортового разнообразия традиционных сельскохозяйственных культур. Распространение трансгенных растений, полученных из ограниченного набора родительских сортов, ведёт к вытеснению других сортов, а значит к снижению сортового биоразнообразия. Это разнообразие является основой устойчивого сельского хозяйства.

Сокращение видового разнообразия. Производство трансгенных растений приводит к сокращению видового разнообразия растений, животных, грибов и микроорганизмов, обитающих на полях, где они выращиваются и вокруг них. Быстрорастущие виды трансгенных организмов могут вытеснить обычные виды из естественных экосистем. Распространение использования гербицидов широкого спектра может вызвать обеднение видового состава полезной энтомо- и орнитофауны (насекомых и птиц) и разрушение агробиоценозов.

Обесценивание альтернативных форм сельского хозяйства, в первую очередь наиболее перспективного на сегодняшний день органического (экологичного) земледелия. Натуральные сельскохозяйственные культуры вследствие переопыления с трансгенными аналогами также станут трансгенными. Сохранить свои сорта от генетического загрязнения, для работников сельского хозяйства, ориентированного на выращивание

экологически безопасной продукции, будет фактически невозможно. Перенос генов от трансгенных культур в культуры традиционной селекции уже зарегистрирован для всех трансгенных культур, особенно для рапса, сои, кукурузы [1].

Непредсказуемые изменения целевых (обусловленных трансгенной конструкцией) и нецелевых признаков модифицированных сортов. Создаваемые в настоящее время трансгенные культуры часто характеризуются неэффективной трансгенной устойчивостью. Через несколько поколений трансгенная культура изменяет (иногда утрачивает) приобретенные свойства, что может быть связано с адаптацией нового гена в составе растительного генома, проявлением новых плейотропных эффектов и замолканием генов.

Сверхзависимость покупателя семян трансгенных растений от фирмы-производителя – одна из самых больших опасностей трансгенных технологий. Монопольное владение биотехнологическими компаниями трансгенными растениями, семенами и химикатами может привести фермера к сверхзависимости от производителя посевного материала. Особую опасность для покупателя представляют так называемые терминаторные технологии, при которых продаваемые биотехнологической фирмой семена дают лишь один урожай (одно поколение, F1). Попытка использовать часть

урожая для посева на следующий год приводит к тому, что семена или не прорастают, или гибнут сразу после прорастания. Все это делает любого покупателя семян (фермера, предприятие или государство) абсолютно зависимым от компаний, производящих семена генетически модифицированных растений, гербициды и инсектициды [1-2].

Таким образом, независимо от структуры интегрируемой в геном растения трансгенной конструкции, существуют потенциальные биологические риски при распространении и использовании трансгенных культур

растений и полученных из них продуктов питания. Эти риски являются следствием несовершенств технологий введения и интеграции трансгенных конструкций в геном растений и недостатком знания механизмов регуляции и функционирования генома растения. Очевидно, что необходимость исключения потенциальных рисков проявления незадаанных эффектов и неблагоприятного воздействия трансгенных культур на человека, животных и окружающую среду будет способствовать реализации генетически модифицированных растений, трансгенный элемент которых содержит лишь последовательности, необходимые для улучшения целевого признака растения.

Список использованных источников

1. Кузнецов В. В. Генетически модифицированные организмы и биологическая безопасность / В. В. Кузнецов, А. М. Куликов, И. А. Митрохин, В. Д. Цыденданбаев // Федеральный вестник экологического права ЭКОСинформ. – 2004. – № 10. – С. 1-64.
2. Кузнецов В. В. Возможные биологические риски при использовании генетически модифицированных сельскохозяйственных культур / В. В. Кузнецов // Вестник ДВО РАН. – 2005. – № 3. – С. 40-54.
3. Handbook of plant biotechnology / eds. P. Christou, H. Klee. – Wiley-VCH., 2004. – 1488 p.
4. Глик, Б. Р. Молекулярная биотехнология: принципы и применение: учебник / Б. Р. Глик, Д. Пастернак; пер. с англ. Н. В. Баскаковой [и др.]; под ред. Н. К. Янковского. – М.: Мир, 2002. – 589 с. : ил. – (Лучший зарубежный учебник).
5. Artsaenko O. Potato tubers as a biofactory for recombinant antibodies / O. Artsaenko [et al.] // Mol. Breed. – 1998. – V. 4. – P. 313-319.

6. Teli N. P. Recent developments in the use of transgenic plants for the production of human therapeutics and biopharmaceuticals / N. P. Teli, M. P. Timko // Plant Cell Tissue Organ Culture. – 2004. – V. 79. – P. 125-145.
7. Fischer R. Plant-based production of biopharmaceuticals / R. Fischer [et al.] // Curr. Opin. Plant Biol. – 2004. – V. 7. – P. 152-158.
8. Ma I. K. C. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants / I. K. C. Ma, P. M. W. Drake, P. Christou // Nat. Rev. Genet. – 2003. – V. 4. – P. 794-805.
9. Пирузян Э. С. Основы генетической инженерии растений / Э. С. Пирузян. – М.: Наука, 1988. – 304 с.
10. Veluthambi K. The current status of plant transformation technologies / K. Veluthambi, A. K. Gupta, A. Sharma // Current Science. – 2003. – V. 84. – P. 368-380.
11. Darbani B. Dna-delivery methods to produce transgenic plants / B. Darbani [et al.] // Biotechnology. – 2008. – V. 7. – P. 385-402.
12. Li L. An improved rice transformation system using the biolistic approach / L. Li [et al.] // Plant Cell Rep. – 1993. – V. 12. – P. 50-55.
13. De la Riva G. A. *Agrobacterium tumefaciens*: A natural tool for plant transformation / G. A. De la Riva [et al.] // Elect. J. Biotechnol. – 1998. – V. 1. – P. 118-133.
14. Racoczy-Trijanowska M. Alternative methods of plant transformation / M. Racoczy-Trijanowska // Cell. Mol. Biol. Lett. – 2002. – V. 7. – P. 849-858.
15. Stanton B. G. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: The biology behind the gene-jockeying tool / B. G. Stanton // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2003. – V. 67. – P. 16-37.
16. van Attikum, H. Non-homologous end-joining proteins are required for *Agrobacterium* T-DNA integration / H. van Attikum, P. Bundock, P. J. J. Hooykaas // EMBO J. – 2001. – V. 20. – P. 6550-6558.
17. Komori T. Current Status of Binary Vectors and Superbinary Vectors / T. Komori [et al.] // Plant Physiology. – 2007. – V. 145. – P. 1155-1160.

18. Sanford I. C. Optimizing the biolistic process for different biological applications / I. C. Sanford, F. D. Smith, I. A. Russell // *Methods Enzymol.* – 1993. – V. 217. – P. 483-509.
19. Southgate E. M. Factors affecting the genetic engineering of plants by microprojectile bombardment / E. M. Southgate [et al.] // *Biotechnol. Adv.* – 1995. – V. 13. – P. 631-651.
20. Taylor N. J. Microparticle bombardment as a tool in plant science and agricultural biotechnology / N. J. Taylor, C. M. Fauquet // *DNA Cell Biol.* – 2002. – V. 21. – P. 963-977.
21. Fu X. Linear transgene constructs lacking vector backbone sequences generate low-copy-number transgenic plants with simple integration patterns / X. Fu [et al.] // *Transgenic Res.* – 2000. – V. 9. – P. 11-19.
22. Dai S. Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment / S. Dai [et al.] // *Mol. Breed.* – 2001. – V. 7. – P. 25-33.
23. Miki B. Selectable marker genes in transgenic plants: application, alternatives and biosafety / B. Miki, S. McHugh // *J. Biotechnology.* – 2004. – V. 107. – P. 193-232.
24. Puchta H. Marker-free transgenic plants / H. Puchta // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* – 2003. – V. 74. – P. 123-134.
25. Darbani B. Methods to produce marker-free transgenic plants / B. Darbani [et al.] // *Biotechnol. J.* – 2007. – V. 2. – P. 83-90.
26. Yoder J. I. Transformation systems for generating marker-free transgenic plants / J. I. Yoder, A. P. Goldsbrough // *Biotechnology.* – 1994. – V. 12. – P. 263-267.
27. Hohn B. Elimination of selection markers from transgenic plants / B. Hohn, A. A. Levy, H. Puchta // *Curr. Opin. Biotech.* – 2001. – V. 12. – P. 139-143.
28. Ebinuma H. Systems for the removal of a selection marker and their combination with a positive marker / H. Ebinuma [et al.] // *Plant Cell Rep.* – 2001. – V. 20. – P. 383-392.

29. Ow D. W. Recombinase-directed plant transformation for the post-genomic era / D. W. Ow // *Plant Mol. Biol.* – 2002. – V. 48. – P. 183-200.
30. Gidoni D. Site-specific excisional recombination strategies for elimination of undesirable transgenes from crop plants / D. Gidoni, V. Srivastava, N. Carmi // *In Vitro Cell. and Devel. Biology – Plant.* – 2008. – V. 144. – P. 457-467.
31. Романов Г. А. Генетическая инженерия растений и пути решения проблемы биобезопасности / Г. А. Романов. // *Физиология растений* – 2000. – Т. 47. – № 3. – С. 343-353.
32. Guidance document of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed // *The EFSA Journal.* – 2006. – V. 99. – P. 1-100.
33. Медико-биологическая оценка безопасности генно-инженерно-модифицированных организмов растительного происхождения [Электронный ресурс] / Методические указания МУ 2.3.2.2306-07. – Режим доступа: www.cgsen.udm.net/downloads/chief-doctor-rf/postanov80.doc – 12.09.2009.
34. Safety and nutritional assessment of GM plants and derived food and feed: The role of animal feeding trials / EFSA GMO Panel // *Food and Chemical Toxicology.* – 2008. – V. 46. – P. S2-S70.
35. König A. Assessment of the safety of foods derived from genetically modified (GM) crops / A. König [et al.] // *Food and Chemical Toxicology.* – 2004. – V. 42. – P. 1047-1088.
36. Nutritional and Safety Assessments of Foods and Feeds Nutritionally Improved through Biotechnology [Электронный ресурс] / A Task Force Report by ILSI // *CRFSFS.* – 2004. – V. 3. – P. 38-104. – Режим доступа: ucbrep.ucdavis.edu/PDFs/EU%20Commission%20Report.pdf – 11.09.2009.
37. Kuiper H. A. Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods / H. A. Kuiper [et al.] // *Plant J.* – 2001. – V. 27. – P. 503-528.
38. Daniell H. Molecular strategies for gene containment in transgenic crops / H. Daniell // *Nat. Biotech.* – 2002. – V. 20. – P. 581-586.

39. Bao P. H. Evidence for genomic changes in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) recovered from protoplasts / P. H. Bao [et al.] // *Transgen. Res.* – 1996. – V. 5. – P. 97-103.
40. Сингер М. Гены и геномы: в 2-х т. Т. 2. / М. Сингер, П. Берг; пер. с англ. Е. А. Кабановой, А. А. Лушниковой; под ред. Н. К. Янковского. – М.: Мир, 1998. – 391 с. : ил.
41. Yan H. Transposition-Based Plant Transformation / H. Yan, C. M. Rommens // *Plant Physiology*. – 2007. – V. 143. – P. 570-578.
42. Srivastava V. Rare instances of Cre-mediated deletion product maintained in transgenic wheat / V. Srivastava, D. W. Ow // *Plant Mol. Biol.* – 2003. – V. 52. – P. 661-668.
43. Corneille S. Identification of functional lox sites in the plastid genome / S. Corneille [et al.] // *Plant J.* – 2003. – V. 35. – P. 753-762.
44. Генетически модифицированные организмы и обеспечение биологической безопасности. – Кишинев: Экоспектр-Бендеры, 2007. – 60 с.
45. Куликов А. М. ГМО и риски их использования / А. М. Куликов // *Физиология растений*. – 2005. – Т. 52. – С. 115-128.
46. Монастырский О. А. Продовольственная безопасность России: вчера, сегодня, завтра / О. А. Монастырский // *Экос-информ.* – 2004. – № 4. – С. 1-64.
47. Семенюк Е. Г. Агроэкологические аспекты использования генетически модифицированных сельскохозяйственных культур / Е. Г. Семенюк // *Агрохимия*. – 2001. – № 1. – С. 80-93.
48. Соколов М. С., Марченко А. И. Потенциальный риск возделывания трансгенных растений и потребления их урожая / М. С. Соколов, А. И. Марченко // *С.-х. биология*. – 2002. – № 5. – С. 3-22.
49. Nordlee J. A. Identification of a Brazil-nut allergen in transgenic soybean / J. A. Nordlee [et al.] // *New Eng. J. Med.* – 1996. – V. 334. – P. 688-692.

50. U.S. Environmental Protection Agency. *Bacillus thuringiensis* subspecies *tolworthi* Cry9C protein and the genetic material necessary for its production in corn; exemption from the requirement of a tolerance / U.S. Environmental Protection Agency / U.S. Fed. Reg. – 1998. – V. 63. – P. 28258-28261.
51. Liener I. E. Effect of a trypsin inhibitor from soybeans (Bowman-Birk) on the secretory activity of the human pancreas / I. E. Leiner [et al.] // *Gastroenterology*. – 1988. – V. 94. – P. 419-427.
52. Liener I. E. Possible adverse effects of soybean anticarcinogens / I. E. Leiner // *J. Nutr.* – 1995. – V. 125. – P. 744S-750S.
53. Muller B. P. Metabolism of the herbicide glufosinate-ammonium in plant cell cultures of transgenic (rhizomania-resistant) and non-transgenic sugarbeet (*Beta vulgaris*), carrot (*Daucus carota*), purple foxglove (*Digitalis purpurea*) and thorn apple (*Datura stramonium*) / B. P. Muller [et al.] // *Pest. Manag. Sci.* – 2001. – V. 57. – P. 46-56.
54. Разбаш О. А. Проблема ГМО: безопасность, наука, общество / О. А. Разбаш, А. С. Баранов, О. Н. Кревер // [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.agronews.ru/articleview.php?AId=1042>. – 9.10.2009.
55. Conner A. J., Glare T.R., Nap J.P. The release of genetically modified crops into the environment. Pt 2. Overview of ecological risk assessment / A. J. Conner, T. R. Glare, J. P. Nap // *The Plant J.* – 2003. – V. 33. – P. 19-46.
56. Medvinsky A. B. Modeling the invasion of recessive Bt-resistant insects: an impact on transgenic plants / A. B. Medvinsky // *J. Theoretical Biology*. – 2004. – V. 231. – P. 121-127.