

УДК 635. 21: 57. 088. 6: 632. 38

ГОРИЗОНТАЛЬНЫЙ ПЕРЕНОС ЧУЖЕРОДНЫХ ГЕНОВ ПРИ ИСПЫТАНИИ ТРАНСГЕННЫХ ОБРАЗЦОВ С ГЕНОМ БЕЛКА ОБОЛОЧКИ Y-ВИРУСА КАРТОФЕЛЯ В ПОЛЕВЫХ УСЛОВИЯХ

Родькина И.А., Улитина Н.С., Яковлева Г.А.

РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству», Республика Беларусь

E.mail: rodkina@tut.by

РЕЗЮМЕ

*В полевых экспериментах по определению возможности горизонтального переноса чужеродных генов нетрансформированным растениям в качестве источников трансгенной пыльцы использованы образцы картофеля сорта Белорусский 3 с кассетами экспрессии репортерного гена *npt II* и целевого гена белка оболочки Y-вируса картофеля (БО YVK) и их генеративное потомство, отобранное по проявлению маркерного и целевого генов. В качестве растений-ловушек были использованы: растения сорта Росинка, высаженные на расстоянии 0,7–7,0 м от опытных участков трансгенных образцов (2007 г.); растения сорта Дубрава, высаженные на расстояние 0,7–10,5 м (2010 г.). Наличие трансгенных форм в генеративном потомстве растений-ловушек определяли по фенотипическому проявлению маркерного гена *npt II* (укоренение на селективной среде с антибиотиком канамицином) и методом ПЦР. При сопоставлении полученных результатов выявлен факт горизонтального переноса чужеродных генов на расстояние 6,3 м от трансгенных образцов (для растений сорта Росинка, 2007 г.). Доля трансгенных семян составила 5,56%, что свидетельствует о случайном характере переноса.*

Ключевые слова: картофель, трансгенные растения, генеративное потомство, горизонтальный перенос генов, маркерный ген *npt II*, фенотип, ПЦР.

ВВЕДЕНИЕ

Основным экологическим риском, связанным с введением трансгенных растений в селекционный процесс, является горизонтальный перенос генов – передача генов близким и родственным видам (как культурным, так и дикорастущим) [1]. Потенциальная опасность горизонтального переноса заключается в том, что новые привнесенные признаки могут дать дополнительные преимущества диким видам растений, что приведет к их быстрому распространению, и как следствие,

появлению так называемых «суперсорняков» и увеличению засоренности полей.

Правильная оценка возможности горизонтального переноса генов позволяет установить дистанцию при совместном выращивании трансформированных и генетически неизменных растений для предотвращения засорения чистого сорта генетически модифицированным. Особенно высок риск засорения в случае ветроопыляемых растений, когда пыльца может разноситься ветром на расстояние в несколько километров [2]. Высвобождение трансгенных растений картофеля в окружающую среду может произойти несколькими путями. Наиболее очевидный вариант – образование семян от опыления трансгенной пылью на нетрансформированных растениях культурных сортов, либо на растениях других видов *Solanum*, которые могут прорасти на следующий год. Так же потенциальным источником распространения трансгенов в окружающую среду могут быть клубни трансгенных образцов, оставленные на поле после уборки урожая. Однако для трансгенного картофеля (как и для культурных сортов) вероятность стать «сорняком» сводится к минимуму, так как в целом адаптивные возможности картофеля в природной среде весьма ограничены. В условиях умеренного климата, с морозными зимами, только 20% клубней могут прорасти в следующем сезоне [3]. В Новой Зеландии были проведены исследования, в которых показано, что частота прорастания «сорного» трансгенного картофеля меньше, чем культурного и составляет 0,4–2,9 шт. на 1 м² [4]. Даже эти растения сохраняются на поле не более 2 лет, т.к. вытесняются более агрессивными сорными растениями [5].

Исследования по определению расстояния, на которое может распространяться пыльца трансгенного картофеля, проводятся уже более 20 лет, в их основе лежит определение частоты образования трансгенного генеративного потомства у нетрансформированных растений (растения-ловушки пыльцы), выращиваемых на определенном расстоянии от генетически трансформированного картофеля. Одним из обязательных условий экспериментов является синхронизация времени цветения трансгенного картофеля и растений-ловушек [6]. Основной способ размножения картофеля в производстве – размножение клубнями, поэтому исследований по определению расстояния, на которое может переноситься трансгенная пыльца картофеля, проводилось немного.

Для большинства независимых исследований выявлена следующая тенденция: доля трансгенного потомства на близких расстояниях (1–3 м) от опытных трансгенных образцов колеблется от 1% до 24% и резко снижается уже на удалении 3–5 м [7–10]. В тоже время I. Skogsmyr [11] отмечена высокая частота обнаружения трансгенного потомства на расстоянии 1000 м от посадок генетически модифицированного картофеля. Однако, позже A.J. Conner и P.J. Dale показано, что основная часть полученных I. Skogsmyr данных ПЦР имела ложно положительные результаты [12]. Таким образом, большинство исследователей считают

расстояние 20 м оптимальным при коммерческом выращивании трансгенного и генетически неизмененного картофеля [6].

Родственными видами картофеля в умеренных широтах европейской зоны, произрастающими в естественных условиях, являются паслен черный (*S.nigrum*) и паслен сладко-горький (*S.dulcamara*). Eijlander R. с соавторами показали, что перенос трансгенной пыльцы близкородственным видам *Solanum* в полевых условиях маловероятен: для *S.nigrum* полученное генеративное потомство было стерильным, слабым и практически нежизнеспособным [13]. Позже, A.J. Conner провел подобные эксперименты для *S.dulcamara*, в результате которых перенос трансгенной пыльцы не установлен [10]. Следовательно, передача генов от трансгенного картофеля к диким сородичам крайне маловероятна [14].

При определении безопасного расстояния для выращивания генетически модифицированного картофеля от основных посадок кроме данных о горизонтальном переносе генов принимается во внимание цель культивирования посадок картофеля, которые являются предполагаемыми рецепторами трансгенной пыльцы. Это может быть получение чистого семенного материала, получение экологически чистого картофеля либо выращивание для потребительских нужд. Законодательство различных стран, где разрешено выращивать генетически модифицированные культуры, устанавливает свои требования: расстояние между трансгенным картофелем и традиционными сортами: от 3 м (Голландия) до 50 м (Польша); между трансгенным и экологически чистым картофелем от 10 м (Голландия) до 100 м (Латвия) [15].

В Республике Беларусь в 2006 году принят Закон Республики Беларусь «О безопасности генно-инженерной деятельности» № 96-3, и разработаны соответствующие нормативные документы, которые определяют требования безопасности при осуществлении отдельных видов генно-инженерной деятельности. Однако, четких рекомендаций по пространственному размещению посадок трансгенных и нетрансформированных культур законодательно не определено. В тоже время, для таких научных селекционно-семеноводческих учреждений как РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству», где в полевых условиях проводится гибридизация и сбор ботанических семян картофеля, установление безопасного расстояния при полевых испытаниях трансгенных растений безусловная необходимость для предотвращения неконтролируемого высвобождения трансгенных растений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

В качестве источников трансгенной пыльцы были использованы исходные трансгенные образцы картофеля с кассетами экспрессии репортерного гена *npt II* и целевого гена белка оболочки Y-вируса картофеля (БО YVK) и их генеративное потомство, отобранное по

проявлению маркерного и целевого признаков [16,17]. Исходные трансгенные образцы были получены сотрудниками Центра «Биоинженерия» РАН трансформацией сорта Белорусский 3 и в рамках Договора о творческом сотрудничестве переданы в РУП «Институт картофелеводства НАН Беларуси» [18,19].

Распространение пыльцы и перекрестное опыление определяется несколькими факторами: масштабы поля, на котором выращивается генетически модифицированная культура (в литературе существуют исследования, где показана зависимость между площадью испытываемого поля и уровнем перекрестного опыления [20]); наличие насекомых-опылителей (для облегчения перекрестного опыления и самоопыления необходимо присутствие насекомых, в частности, шмели являются хорошими опылителями картофеля; ветер в перекрестном опылении картофеля играет незначительную роль [20]); экологические факторы – расстояние, на которое может рассеиваться пыльца, меняется в зависимости от климатических условий (температура и влажность воздуха, количество света, осадки, скорость ветра), местной растительности, рельефа местности и др. [21]; степень синхронности цветения трансгенных форм и растений-ловушек (периоды цветения растения-донора и рецептора должны совпадать, или хотя бы пересекаться, для обеспечения высокой степени перекрестного опыления).

Испытания трансгенного картофеля проводили на специализированном опытном участке лаборатории биотехнологии, размещенном в селекционном севообороте РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству» вблизи д. Николка, Узденский район, Минская область.

Карта расположения опытного поля для испытания трансгенного картофеля представлена на рисунке 1.



Рисунок 1 – Расположение опытного участка для испытания трансгенного картофеля (стрелка указывает границы опытного поля)

Опытное поле представляет собой огороженный полевой участок трапециевидной формы, общей площадью 1 га. Объект, ориентирован с юга-запада на северо-восток, с трех сторон изолирован лесным массивом; с южной стороны – лесопосадка, шириной не более 10 м, за которой были размещены основные посадки опытного материала лаборатории исходного материала картофеля. Ближайший населенный пункт – деревня Николка, располагается на расстоянии около 1 км.

Полевые эксперименты по определению возможности горизонтального переноса чужеродных генов нетрансформированным растениям в полевых условиях проводились нами в два этапа. В 2007 году в качестве растений-ловушек были использованы растения сорта Росинка, которые были высажены на защитных полосах на расстоянии 0,7–7,0 м. Нетрансформированный сорт Росинка, одной группы спелости с исходным сортом Белорусский 3, соответственно время цветения с трансгенными образцами было синхронизировано. Ягоды от свободного опыления растений-ловушек были собраны на различном расстоянии от участков трансгенных образцов – от 0,7 м до 6,3 м. В зимний период 2007–2008 гг. из ягод были выделены ботанические семена в количестве 3926 шт.

В 2010 году эксперимент был проведен повторно. На защитных полосах опытного участка с посадками трансгенного картофеля с геном БО Y-вируса картофеля и их генеративного потомства были высажены 15 рядов растений-ловушек пыльцы сорта Дубрава, отличающегося высокой способностью образовывать ягоды от свободного опыления (расстояние 0,7-10,5 м). Периоды цветения растений Дубравы и трансгенных образцов с геном БО YVK практически совпадали, так как в посадках 2010 года присутствовали трансгенные гибриды ранней и средней групп спелости.

Растения-ловушки пыльцы были высажены непосредственно за опытными участками с трансгенными растениями, минимальное расстояние – 70 см. Схема посадки в обоих случаях (2007, 2010 гг.) – 30×70 см. С каждого ряда защитной полосы были собраны ягоды и в зимний период 2010–2011 года из ягод были выделены ботанические семена. Ягоды в обоих экспериментах были отмыты вручную от мезги, отделены в воде методом осаждения, высушены на фильтровальной бумаге, расфасованы по отдельным ягодам в бумажные пакетики и оставлены на хранение в сухом проветриваемом помещении. Общее число семян для сорта Дубрава составило 93925 шт.

Цветение, образование ягод и семян у картофеля сильно колеблется в зависимости от условий вегетационного периода. Метеорологические данные (температура воздуха, количество осадков) за вегетационные периоды 2007 и 2010 годов представлены в таблице 1.

В течение вегетационного периода 2007 года отмечены повышенные температуры в мае, июне, августе, недостаток влаги в июне, августе и переизбыток в июле. Температура воздуха в мае превысила среднее многолетнее значение на 2,0⁰С, июне на 2,3⁰С, в августе – на 3,4⁰С

(таблица 1). Количество выпавших осадков в мае превысило среднее многолетнее значение на 11,8% в июле – на 21,4%. В то же время отмечен недостаток влаги в июне и августе на 43,0% и 73,0% соответственно.

Таблица 1 – Метеорологические показатели за май – август 2007, 2010 годы (по данным АС «Минск», п. Самохваловичи Минского района)

Месяц	Температура воздуха, °С			Количество осадков, мм		
	среднее многолетнее	2007 г.	2010 г.	среднее многолетнее	2007г.	2010 г.
Май	12,4	14,4	15,0	61	72,3	103,9
Июнь	16,1	18,4	18,6	81	46,1	161,0
Июль	17,6	17,8	22,9	90	109,3	105,6
Август	16,3	19,7	21,6	83	22,4	70,8

Метеоусловия вегетационного периода 2010 года характеризовались высокой температурой воздуха и переувлажнением в мае – июле. Температура воздуха в мае превысила среднее многолетнее значение на 2,6⁰С, июне – на 2,5⁰С, июле – на 5,3⁰С, в августе – на 5,3⁰С. Количество выпавших осадков в мае превысило среднее многолетнее значение на 70,3%, в июне – на 98,8% в июле – на 17,3% (таблица 1).

Оценку канамицин-устойчивости сеянцев нетрансформированного картофеля проводили в соответствии с методическими указаниями, разработанными в РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству» [22]. Для проведения скрининга по проявлению маркерного признака ботанические семена вводили в культуру *in vitro*. После стерилизации хлорсодержащим раствором семена для проращивания высаживали на чашки Петри с агаризованной средой Мурасиге-Скуга (MS) [23]. У проростков сеянцев размером до 1 см срезали верхушку, которую использовали для анализа на селективной среде. Селектирующий антибиотик канамицин вводили в среду после автоклавирования методом «холодной» стерилизации. Верхушечную часть проростков пассировали в колбы на селективную среду (агаризованная среда MS с канамицином (MS-Km 200–220 мг/л)). Учет фенотипического проявления маркерного гена *npt II* у сеянцев от растений-ловушек проводили на 14 и 30 сутки после пересадки на селективную среду с канамицином. При проведении оценки учитывалось два фенотипических признака: укоренение и окраска сеянцев на селективной среде.

Для выделения ДНК были использованы растения *in vitro*, выращенные на стандартной агаризованной среде MS. Для выделения и очистки геномной ДНК использовались коммерческие наборы «Проба-ЦТАБ» фирмы «ДНК-Технология» (Россия) и «Genomic DNA Purification Kit» фирмы «Fermentas» (Литва) согласно прилагаемому протоколу и модификациями, предложенными в методических рекомендациях Ермишина А.П. и др. [24].

Использовали свежие незамороженные навески листочков 1–2 растений, выращенных *in vitro* на стандартной среде MS (200–300 мг). Наличие гена неомицинофосфотрансферазы определяли методом ПЦР с праймерами (5'–ССТТГСТССТГСССГАГАААГТАТСС, 5'–СГГСААГСАГГСАТСГССАТГТГТС) на ген *npt II* [25]. Олигонуклеотидные праймеры были синтезированы в ИФОХ НАН Беларуси (г. Минск). Реакционная смесь содержала ~50 нг ДНК; буфер Dream Tag фирмы Fermentas, содержащий Mg^{2+} ; 0,4 pmol/ μ l каждого праймера; смесь dNTP фирмы Праймтех (по 200 мкМ каждого нуклеотидтрифосфата); 1,5 ед. Dream Tag полимеразы Fermentas. Объем реакционной смеси составил 20 мкл.

В качестве положительного контроля использовали растения картофеля трансгенного образца d6DII, несущие ген *npt II*; в качестве отрицательного – ДНК нетрансформированных растений *S. tuberosum* (7856376-76) и дигаплоида сорта Ласунок (ЛДГ). ПЦР проводили в термоциклере Veriti 96-Well Thermal Cycler Applied Biosystems by Life Technology, США.

Программа амплификации была следующей: 1) денатурация: 94⁰С – 5 мин.; 2) 35 циклов: денатурация: 94⁰С – 10 сек, отжиг: 58⁰С – 20 сек., элонгация: 72⁰С – 30 сек.; 3) элонгация: 72⁰С – 5 мин. Размеры ампликонов определяли методом горизонтального электрофореза в агарозном геле путём сравнения с маркерными линейными фрагментами ДНК производства Fermentas (Литва).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Фенотипическое проявление признака «канамицин-устойчивость» в генеративном потомстве растений-ловушек сортов Росинка и Дубрава.

Ген *npt II*, часто используемый в генетической инженерии в качестве репортерного гена, контролирует синтез фермента неомицинофосфотрансферазы II, что обеспечивает корнеобразование у трансгенных растений, несущих этот ген – устойчивость на селективной среде с антибиотиком канамицином. После проведения агробактериальной трансформации оценку канамицин-устойчивости для первичных трансформантов проводят по корнеобразованию на селективной среде [26]. Учет укоренения трансформантов проводят на 14 сутки после пассажа на селективную среду. Неустойчивые сеянцы на селективной среде этиолированы, без корней, имеют белый стебель с чешуевидными листьями. Относительно устойчивые сеянцы – единичные маленькие корни, хорошо развитые зеленые стебель и листья. Канамицин-устойчивые сеянцы имеют нормально развитые зеленые листья и стебель, развитую корневую систему [26]. В наших исследованиях при первичном отборе генеративного потомства трансгенных образцов по фенотипическому

проявлению маркерного гена *npt II* учет проведён дважды на 14 и 30 сутки после пассажа на MS-Km среде [22].

В 2007 году в качестве опытного материала были использованы семена от свободного опыления, полученные на нетрансформированных растениях-ловушках пыльцы сорта Росинка, на расстоянии от 0,7 м до 6,3 м. Первоначально для оценки фенотипического проявления гена *npt II* были использованы семена, собранные на расстоянии 1,4 м, затем в эксперимент были введены семена, собранные с расстояния 5,6 и 6,3 м (таблица 2).

Семена были пророщены в культуре *in vitro*, при достижении проростков высоты примерно 1,0 см проводили их декапитацию и пересадку верхушечной части сеянцев в колбы с селективной средой (MS-Km, 200-220 мг/л). Результаты учета канамицин-устойчивости генеративного потомства нетрансформированных растений, полученного на расстоянии 1,4, 5,6 и 6,3 м, на 30 сутки культивирования на селективной среде представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Распределение по фенотипу генеративного потомства растений-ловушек сорта Росинка, высаженных на расстоянии 1,4 м, 5,6 м и 6,3 м от делянок трансгенных образцов с геном БО YVK, на 30-е сутки культивирования на селективной среде (MS-Km, Km 200-220 мг/мл)

Расстояние	Количество сеянцев, шт.	Фенотип сеянцев на селективной среде							
		Зеленые укоренившиеся		Зеленые неукоренившиеся		Мозаичные		Белые	
		шт.	%	шт.	%	шт.	%	шт.	%
1,4 м	111	0	0	35	31,53	27	24,32	49	44,15
5,6 м	147	0	0	43	29,25	84	57,14	20	13,61
6,3 м	36	2	5,56	8	22,22	18	50,00	8	22,22

В соответствии с данными учета на 30-е сутки культивирования генеративного потомства нетрансформированных растений, высаженных на расстоянии 1,4 м от трансгенных образцов, на среде MS-Km были отмечены три фенотипа сеянцев: «зеленые неукоренившиеся», «мозаичные» и «белые», в соотношении 35 : 27 : 49 (расчетное соотношение фенотипов 1,29 : 1 : 1,4). Таким образом, среди генеративного потомства, полученного на расстоянии 1,4 м, не выявлено «укоренившихся» сеянцев.

Отсутствие укоренившихся сеянцев с расстояния 1,4 м обусловило проведение экспериментов с генеративным потомством, полученным на расстоянии 5,6 м и 6,3 м. При культивировании на селективной среде среди генеративного потомства, полученного на расстоянии 5,6 м, также не обнаружено сеянцев с фенотипическим проявлением гена *npt II* (таблица 2). Согласно полученным данным выявлено расщепление 147 сеянцев (расстояние 5,6 м) на три фенотипических класса: «зеленые

неукоренившиеся», «мозаичные» и «белые», в соотношении 43 : 84 : 20 (расчетное – 2,15 : 4,2 : 1).

При культивировании на селективной среде полового потомства, полученного на расстоянии 6,3 м, отмечено распределение 36 сеянцев на четыре фенотипических класса: «укоренившиеся», «зеленые неукоренившиеся», «мозаичные» и «белые». Фактическое расщепление по фенотипу: 2 «укоренившихся»: 8 «зеленые неукоренившиеся»: 18 «мозаичные»: 8 «белые» соответствует расчетному 0,25 : 1 : 2,25 : 1. Полученное фактическое расщепление не соответствует ни одному из возможных вариантов скрещиваний как при моногенной, дигенной, так и при тригенной схемах наследования признака. При объединении классов «зеленые неукоренившиеся» и «мозаичные» расчетное расщепление составляет 0,25 : 3,25 : 1, что так же не укладывается ни в одну из возможных схем.

В соответствии с данными литературы ген *npt II* имеет доминантный характер наследования. Следовательно, если бы произошло опыление нетрансформированных растений сорта Росинка пыльцой трансгенных образцов, то доля сеянцев фенотипа «укоренившиеся» была бы гораздо больше, чем 5,56% и составила бы не менее 30%. Если предположить случайный характер проявления класса «укоренившиеся», как результат переноса пыльцы насекомыми, сельскохозяйственной техникой при проведении уходов, то фактическое расщепление по фенотипу, с примерно одинаковой вероятностью, достоверно соответствует соотношениям фенотипов: а) 1 : 2 : 1 ($\chi^2=0,088$) – теоретическое ожидаемое расщепление при анализирующем скрещивании генотипа – симплекса по двум генам Aa_3Bb_3 ; б) 3 : 1 ($\chi^2=0,039$) – теоретическое ожидаемое расщепление при самоопылении генотипа Aa_3 .

Обнаружение укоренившихся сеянцев в потомстве нетрансформированных растений-ловушек обусловило повторное проведение эксперимента в 2010 году. Для сорта Дубрава характерны хорошее ягодообразование, высокая способность образовывать полноценные семена при свободном опылении, что теоретически увеличивало вероятность перекрестного опыления с трансгенными образцами картофеля. В результате было получено большое количество ягод и значительное количество выполненных семян (в среднем 467 семян на одну ягоду).

В лабораторном эксперименте по выявлению трансгенных форм в качестве контроля были использованы линии *in vitro* (5 линий) нетрансформированного картофеля сорта Дубрава из базисной коллекции сортов белорусской селекции лаборатории оздоровления и клонального микроразмножения картофеля.

Необходимо отметить, что наиболее ценной является информация о максимально возможном расстоянии, на которое способна рассеиваться пыльца от трансгенного картофеля. Эта граница и определяет требования для выращивания опытного материала относительно посадок генетически

неизмененных сортов в полевых условиях для обеспечения минимального риска возможной гибридизации. Поэтому для проведения скрининга по канамицин-устойчивости, в первую очередь, были использованы семена, полученные на самом дальнем расстоянии (10,5 м). Затем, с шагом 1,4 м, определены еще 4 случайных выборки, одна из которых соответствовала расстоянию, на котором был обнаружен перенос трансгенов для сорта Росинка (таблица 3).

Таблица 3 – Общее количество семян нетрансформированного картофеля сорта Дубрава, введенных в культуру *in vitro*

№ ряда	Расстояние от делянок трансгенного картофеля	Кол-во семян, введенных в культуру <i>in vitro</i>
15	10,5	1338
13	9,1	301
11	7,7	302
9	6,3	299
7	4,9	180
Всего		2 420

Процедура введения в культуру *in vitro*, отсадка проростков на селективную среду и учет укоренения сеянцев нетрансформированного картофеля сорта Дубрава не отличалась от методики, использованной в эксперименте с генеративным потомством от сорта Росинка.

Результаты учета канамицин-устойчивости генеративного потомства нетрансформированных растений, полученного на расстоянии 4,9–10,5 м, на 30 сутки культивирования на селективной среде представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Распределение по фенотипу генеративного потомства растений-ловушек сорта Дубрава, высаженных на расстоянии 10,5 м, 9,1 м, 7,7 м, 6,3 м и 4,9 м от делянок трансгенных образцов с геном БО YVK, на 30-е сутки культивирования на селективной среде (MS-Km, Km 200-220 мг/мл)

№ ряда	Расстояние, м	Количество сеянцев, шт.	Фенотип сеянцев на селективной среде					
			Зеленые неукоренившиеся		Мозаичные		Белые	
			шт.	%	шт.	%	шт.	%
15	10,5	755	106	14,04	111	14,70	538	71,26
13	9,1	213	49	23,00	69	32,39	95	44,61
11	7,7	207	37	17,87	40	19,32	130	62,81
9	6,3	210	38	18,10	55	26,19	117	55,71
7	4,9	104	38	36,54	32	30,77	34	32,69

При проведении оценки фенотипического проявления маркерного гена *npt II* у сеянцев нетрансформированного сорта Дубрава также учитывалось два признака: укоренение и окраска сеянцев на селективной среде.

В соответствии с данными учета на 30-е сутки культивирования генеративного потомства Дубравы на селективной среде MS-Km было отмечено три фенотипа сеянцев: «зеленые неукоренившиеся», «мозаичные» и «белые». У некоторых сеянцев фенотипов «зеленые неукоренившиеся» и «мозаичные» было отмечено образование воздушных корней из пазушных почек, расположенных над селективной средой.

Для контрольного варианта (линии *in vitro* сорта Дубравы) на первую дату учета (14 день от посадки на селективную среду) все сеянцы имели фенотип «зеленые неукоренившиеся», на 30-е сутки все растения имели фенотип «белые».

При суммировании результатов по всем проанализированным сеянцам от сорта Дубрава выявлено проявление морфотипов «зеленые неукоренившиеся», «мозаичные» и «белые» в соотношении 1:1:3. Для отдельных рядов получено следующее соотношение морфотипов «зеленые неукоренившиеся», «мозаичные» и «белые» соответственно: 15 ряд (10,5 м) – 1:1:5; 13 ряд (9,1 м) – 1:1:2; 11 ряд (7,7 м) – 1:1:3; 9 ряд (6,3 м) – 1:1:3; 7 ряд (4,9 м) – 1:1:1.

Таким образом, среди генеративного потомства от растений-ловушек сорта Дубрава не обнаружено сеянцев с фенотипическим проявлением гена *npt II* (укоренение на селективной среде), установлена четкая закономерность распределения генеративного потомства на три фенотипа при культивировании на селективной среде.

ПЦР-анализ наличия гена *npt II* в половом потомстве от свободного опыления растений-ловушек

Наличие канамицин-устойчивых сеянцев в генеративном потомстве, полученном от нетрансформированных растений сорта Росинка на расстоянии 6,3 м, а также образование воздушных корней при культивировании сеянцев на селективной среде обусловило необходимость проведения оценки наличия гена *npt II* методом ПЦР. Для выделения ДНК были использованы растения *in vitro*, выращенные на стандартной агаризованной среде MS [23]. Сеянцы фенотипов «мозаичные» и «белые» после культивирования на селективной среде нежизнеспособны. Поэтому при пересадке сеянцев с чашек Петри проростки разрезали на две части: верхушечный черенок высаживали на селективную среду, параллельно на MS среду высаживали черенок с 1–2 пазушными почками.

Наличие гена неомицинофосфотрансферазы II определяли методом ПЦР с праймерами (5'–ССТТГСТССТГСССГАГАААГТАТСС, 5'–СГГСААГСАГГСАТСГССАТГТГТС) на ген *npt II* [25]. В качестве положительного контроля использовали растения картофеля трансгенных образцов с4сI, с12сI, d6DII, несущие ген *npt II*; в качестве отрицательного – ДНК нетрансформированных растений *S. tuberosum* (7856376-76) и

дигаплоида сорта Ласунок (ЛДГ). Ожидаемый размер ПЦР-продукта составлял 264 п.н. [25]. В результате реакции ПЦР фрагмент, который находится в пределах 200-300 п. н., что согласуется с литературными данными, был амплифицирован у исходных трансгенных образцов с4С1, с12С1, d6DII. После проведенных экспериментов были подобраны оптимальные условия проведения ПЦР с праймерами на ген *npt II*.

На рисунке 2 представлены результаты ПЦР-анализа на наличие гена *npt II* для 34 семян, полученных от растений-ловушек сорта Росинка на расстоянии 6,3 м от трансгенных образцов. В соответствии с полученными результатами среди проанализированных семян обнаружены варианты, как с наличием, так и отсутствием гена неоминифосфотрансферазы. По результатам теста, кроме положительного контроля d6DII только 2 из 36 исследуемых семян содержат в своем геноме ген *npt II*.

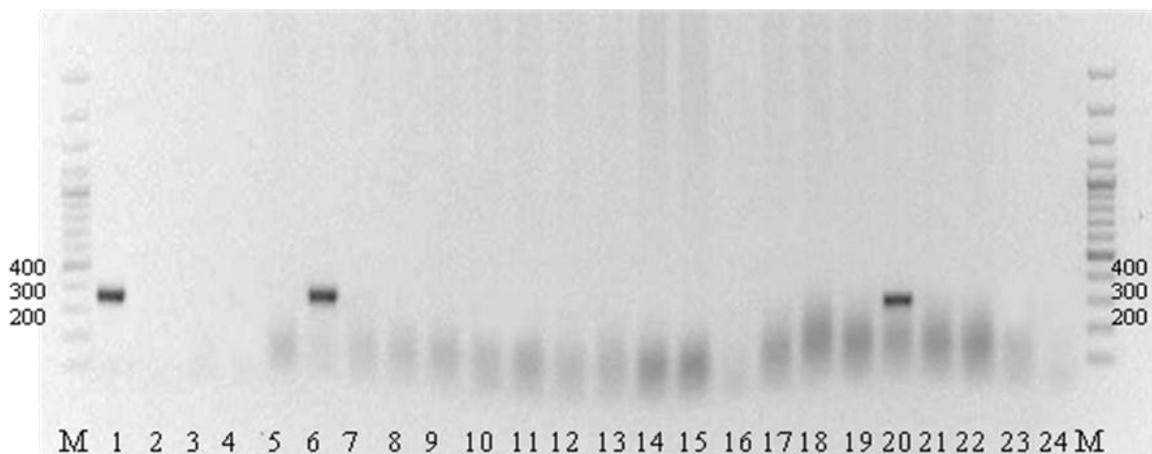


Рисунок 2 – Электрофореграмма разделения ПЦР продуктов семян сорта Росинка (расстояние 6,3 м)

М – маркер; 1 – положительный контроль трансгенный образец с геном *nptII* d6DI; 2 – К- (H₂O); 3 и 4 нетрансформированные растения картофеля.

Сеянцы от сорта Росинка различных морфотипов на селективной среде (MS-Km): 6, 20 – морфотип зеленые с корнями; 14, 19, 12, 23 – морфотип «зеленые без корней»; 5, 7, 8, 10, 13, 15, 16, 22, 24 – морфотип «мозаичные»; 9, 11, 12, 17, 18 – морфотип «белые».

При сопоставлении результатов учета по фенотипу и данных ПЦР-анализа установлено: сеянцы фенотипа «зеленые укоренившиеся» имели положительные результаты ПЦР, т.е. являются носителями гена *npt II*; образование воздушных корней из пазушных почек при культивировании семян на селективной среде с канамицином не связано с наличием и проявлением маркерного гена.

Генеративное потомство растений-ловушек сорта Дубрава также было проанализировано методом ПЦР на наличие маркерного гена. Для

РАЗДЕЛ 3. BIOTEХНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В СЕЛЕКЦИИ И СЕМЕНОВОДСТВЕ КАРТОФЕЛЯ

анализа случайным образом было отобрано 44 сеянца различных фенотипов на селективной среде с расстояния 4,9–10,5 м (таблица 5). Согласно результатам ПЦР-анализа гена *npt II* в отобранных сеянцах не обнаружено (рисунок 3).

Таблица 5 – Количество сеянцев сорта Дубрава различных фенотипов на селективной среде, проанализированных методом ПЦР на наличие гена *npt II* (данные 2012 г.)

№ ряда	Расстояние от трансгенного картофеля, м	Количество сеянцев различных фенотипов			Всего
		Зеленые без корней	Мозаичные	Зеленые с воздушными корнями	
7	4,9	7	1	-	8
9	6,3	7	1	-	8
11	7,7	9	1	-	10
13	9,1	9	-	-	9
15	10,5	6	2	1	9
Итого		38	5	1	44

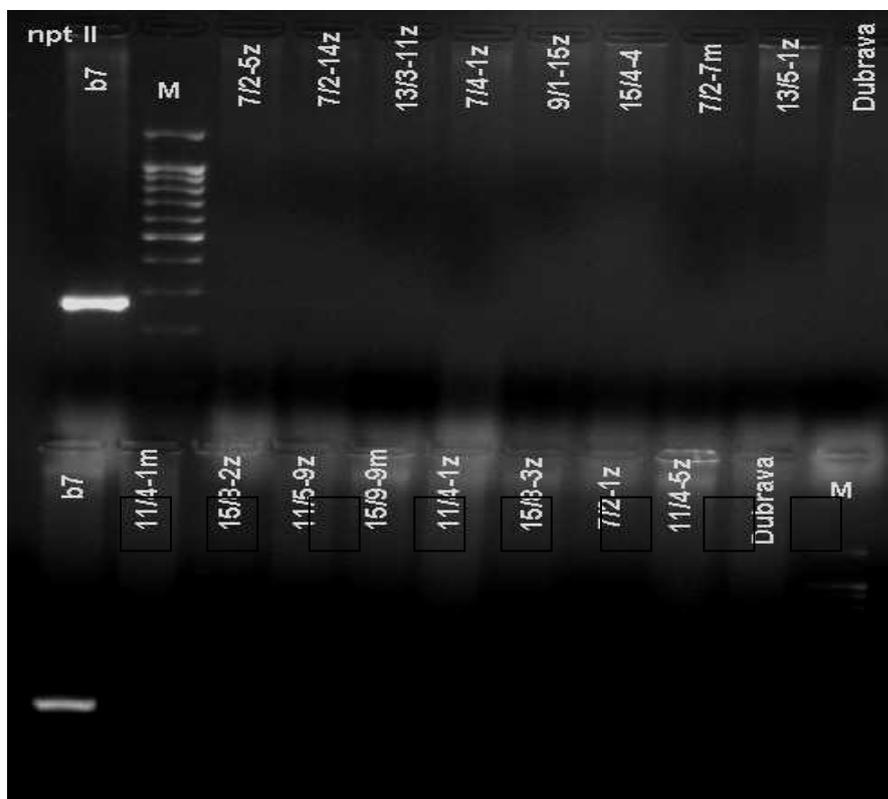


Рисунок 3 – Электрофореграмма разделения ПЦР-продуктов сеянцев от растений-ловушек сорта Дубрава

M – маркер; b7 – положительный контроль трансгенный образец с геном *nptII* b7;

Dubrava – линии *in vitro* нетрансформированного сорта Дубрава;

Обозначение сеянцев от сорта Дубрава различных морфотипов на селективной среде (MS-Km): первая цифра – номер ряда, z – морфотип «зеленые без корней», m – морфотип «мозаичные», без буквенного обозначения – морфотип «белые»; например

15/3-2z – сеянец с 15-го ряда морфотип «зеленые без корней».

Согласно полученным методом ПЦР данным, наличие маркерного гена *npt II* подтверждено только у одного фенотипического класса сеянцев «зеленые укоренившиеся» (растения-ловушки сорта Росинка). При сопоставлении результатов теста на селективной среде с канамицином и наличия гена *npt II* методом ПЦР установлено, что образование воздушных корней у сеянцев от нетрансформированных растений картофеля не связано с экспрессией маркерного гена.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При культивировании на селективной среде генеративного потомства от свободного опыления растений нетрансформированного сорта картофеля Дубрава, высаженных на расстоянии 0,7–10,5 м от трансгенных растений картофеля с маркерным геном *npt II* выявлено расщепление сеянцев на три фенотипических класса: «зеленые без корней», «мозаичные» и «белые»; для генеративного потомства от свободного опыления растений нетрансформированного сорта картофеля Росинка, высаженных на расстоянии 0,7–6,3 м от трансгенных образцов, выявлено четыре фенотипа: «зеленые укоренившееся», «зеленые без корней», «мозаичные» и «белые».

В соответствии с данными ПЦР-анализа проявление фенотипа «зеленые укоренившиеся» в генеративном потомстве нетрансформированных растений сорта Росинка, полученном на расстоянии 6,3 м от трансгенных образцов связано с экспрессией маркерного гена.

Низкая частота трансгенных сеянцев в генеративном потомстве растений-ловушек сорта Росинка свидетельствует о случайном его характере: либо техническим персоналом и сельскохозяйственной техникой при проведении уходов, либо насекомыми-опылителями.

Полученные экспериментальные данные позволили сделать следующие выводы:

– при проведении полевых испытаний трансгенных растений картофеля в научных учреждениях необходим вывод опытного участка из массива селекционных посадок картофеля, где возможно проведение целенаправленной гибридизации на опытных делянках;

– минимальное изоляционное расстояние от основных посадок картофеля должно составлять не менее 10 м.

– кроме пространственной изоляции возможны и некоторые технические способы уменьшения вероятности переноса пыльцы в окружающую среду: ограждение опытного поля, где выращивается трансгенный картофель, для предотвращения несанкционированного проникновения на территорию людей и животных, а также посадка защитных полос картофеля по всему периметру испытываемого трансгенного материала для осаждения пыльцы на близком расстоянии.

Применение этих методов вместе с соблюдением изоляционных мер при выращивании трансгенного и генетически неизменного картофеля определяет минимальную вероятность их скрещивания в полевых условиях.

Литература

1. Conner, A.J. The release of genetically modified crops into the environment: II. Overview of ecological risk assessment / A.J. Conner, T.R. Glare, J.P. Nap // *Plant J.* – 2003. – Vol. 33, № 1. – P. 19-46.

2. Труве, Э. Как оценивать влияние ГМО на окружающую среду / Э. Труве, М. Коппель, Л. Т. Леванди. – Таллин: Мин-во окружающей среды, 2008. – 21 с.

3. Lutman, P.J. Investigations into some aspects of the biology of potatoes as weeds / P.J. Lutman // *Weed Res.* – 1977. – Vol. 17. – P. 123-132.

4. Reader, J.K. Monitoring the invasiveness of volunteer transgenic potatoes following field trials / J.K. Reader [et al.] // *International Association for Plant Tissue Culture and Biotechnology: Abstracts of the 16th Biennial meeting of The New Zealand Branch, Christchurch, February, 2005 / Crop and Food Research.* – Christchurch, 2005. – P. 48.

5. Conner, A.J. Transgenic potatoes versus "traditional" potatoes: What's the difference / A.J. Conner, J.M.E. Jacobs, R.A. Genet // *Commercialization of transgenic crops: risk, benefits and trade considerations.* – Canberra: Cooperative Research Centre for Plant Science and Bureau of Resource Sciences, 1997. – P. 23-36.

6. Conner, A.J. Biosafety Evaluation of Transgenic Potatoes: Gene Flow from Transgenic Potatoes / Conner A.J. // *Ecological and Environmental Biosafety of Transgenic Plants: Proceedings of International Symposium, Taichung, December 7-8, 2006 / Taiwan Agricultural Research Institute.* – Taichung, 2006. – P. 127-140.

7. Tynan, J.L. Low frequency of pollen dispersal from a field trial of transgenic potatoes / J.L. Tynan, M.K. Williams, A.J. Conner // *Journal of Genetics and Breeding.* – 1990. – Vol. 44, № 4. – P. 303-305.

8. Dale, P.J. Gene dispersal from transgenic crops by pollen / P.J. Dale, [et al.] // *The Biosafety Results of Field Tests of Genetically Modified Plants and Microorganisms: Proceedings of the 2nd International Symposium,*

Braunschweig, May 11-14, 1992 / Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft. – Braunschweig, 1992. – P. 73-78.

9. Conner, A.J. Monitoring "escapes" from field trials of transgenic potatoes: A basis for assessing environmental risks / A.J. Conner // Seminar on Scientific Approaches for the Assessment of Research Trials with Genetically Modified Plants: OECD Report, Jouy-en-Josas, April, 1992 / Organization for Economic and Co-Operation Development. – Paris, 1993. – P. 33-39.

10. Conner, A.J. Biosafety assessment of transgenic potatoes: environmental monitoring and food safety evaluation / A.J. Conner // The Biosafety Results of Field Tests of Genetically Modified Plants and Microorganisms: Proceedings of the 3rd International Symposium, Monterey, November 13-16, 1994 / University of California. – Oakland, 1994. – P. 245-262.

11. Skogsmyr, I. Gene dispersal from transgenic potatoes to nonspecifics: a field trial / I. Skogsmyr // Theor. Appl. Genet. – 1994. – Vol. 88. – P. 770-774.

12. Conner, A.J. Reconsideration of pollen dispersal data from field trials of transgenic potatoes / A.J. Conner, P.J. Dale // Theor. Appl. Genet. – 1996. – Vol. 92, № 5. – P. 505-508.

13. Eijlander, R. Biological containment of potato (*Solanum tuberosum*) – outcrossing to its related wild species black nightshade (*Solanum nigrum*) and bittersweet (*Solanum dulcamara*) / R. Eijlander, W.J. Stiekema // Sexual Plant Reproduction. – 1994. – Vol. 7, № 1. – P. 29-40.

14. Goy, P.A. Assessing the environmental impact of gene transfer to wild relatives / P.A. Goy, J.H. Duesing // Biotechnology. – 1996. – Vol. 14, № 1. – P. 39-40.

15. Andersson, M. Gene Flow between Crops and Their Wild Relatives / M. Andersson, M. Carmen de Vicente // The Johns Hopkins University Press. – 2009. – P. 361-380.

16. Родькина, И.А. Отбор урожайных исходных форм для селекции картофеля среди устойчивых к YBK трансгенных образцов и гибридов / И.А. Родькина, Г.А. Яковлева // Картофелеводство: сб. науч. тр. / РУП «Науч.-практ. Центр НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству»; редкол.: В.Г. Иванюк (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2009. – Т. 16. – С. 42 – 53.

17. Родькина, И.А. Наследование чужеродных признаков в генеративном потомстве трансгенных растений картофеля / И.А. Родькина, Н.С. Улитина, Г.А. Яковлева // Картофелеводство: сб. науч. тр. / РУП «Науч.-практ. Центр НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству»; редкол.: С.А. Турко (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2011. – Т. 19. – С. 254 – 266.

18. Пугин, М.М. Влияние 5'-лидера X-вируса картофеля на экспрессию гена белка оболочки Y-вируса картофеля в трансгенных растениях *Solanum tuberosum*. / М.М. Пугин [и др.] // Молекулярная биология. – 1994. – Т.28, Вып.4. – С.752-759.

19. Пугин, М.М. Изучение и применение 5'-лидера геномной РНК Х-вируса картофеля как усилителя экспрессии гетерологичных генов в растениях: автореф. дис. ...канд. биол. наук: 03.00.03/ М.М. Пугин; РАН, Центр «Биоинженерия». – Москва, 1994. – 26 с.

20. White, J.W. Pollination of potatoes under natural conditions / J.W. White // CIP Circular. – 1983. – Vol. 11, No. 1-2. – P. 35-45.

21. Treu, R. Pollen dispersal in the crops Maize (*Zeamays*), Oilseed rape (*Brassica napus spp. oleifera*), Potatoes (*Solanum tuberosum*), Sugarbeet (*Betavulgaris ssp. vulgaris*) and Wheat (*Triticumeastivum*) / R. Treu, J. Emberlin // A Report for the soil association: National pollen research unit. – UK, 2000. – P. 1-54.

22. Родькина, И.А. Методические указания по первичному отбору гибридных семян от трансгенных растений картофеля по маркерному признаку/ И.А. Родькина [и др.] // РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству». – Минск, 2008. – 23 с.

23. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // *Physiol. Plant.* – 1962. – Vol. 15, № 13. – P. 473-497.

24. Оценка исходного материала картофеля для селекции на устойчивость к болезням и вредителям с помощью специфических ПЦР-маркеров: методические рекомендации / А.П. Ермишин [и др.] // Министерство сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь, Национальная академия наук Беларуси, Государственное научное учреждение «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси». – Минск: Право и экономика, 2010. – 60 с.

25. Efficacy of an intron-containing kanamycin resistance gene as selectable marker in plant transformation / G. Libiakova [et al] // *Plant Cell Reports.* – 2001. – Vol. 20. – P. 610-615.

26. Методические указания по получению трансформированных растений картофеля / Рос. акад. с.х. наук, ВНИИКХ. – М., 1995. – 15 с.

GENE TRANSFER BY POLLEN FROM TRANSGENIC POTATOES WITH CP PVY GENE TO NON-TRANSGENIC POTATOES N FIELD TESTS.

RODZKINA INNA A., ULITSINA NATALYA S., YAKOVLEVA GALINA A.

SUMMARY

*The transgenic potatoes with marker gene **npt II** and the target gene of CP PVY have been used as a source of transgenic pollen for the assessment the possibility of horizontal transfer of foreign genes. Field experiments were carried during the two years (2007 and 2010). As a plants-traps of transgenic pollen were used: in 2007 - non-transformed plants of cv. Rosinka that were planted at a distance of 0,7-7,0 m from the transgenic lines, in 2010 - non-transformed plants cv. Dubrava that were planted at a distance of 0,7-10,5 m. The presence of transgenic forms in the generative progeny of untransformed plants-traps was determined by the phenotypic expression of the marker gene (the rooting on selective medium with kanamycin), and the PCR method. After summation of the results, the fact of horizontal transfer of foreign genes at a distance 6.3 m was revealed (for plants cv. Rosinka, 2007). The frequency of transgenic seedlings was low (5.56%) what are indicating to the random nature of the gene transfer.*

Keywords: potato, transgenic plants, generative progeny, gene transfer, a marker gene *npt II*, phenotype and PCR determination.

Поступила в редакцию 29.04.2013 г.