

ДНК-технологии, трансгенез, молекулярное маркирование

УДК 633.111.1:(573.6.086.83+577.21)

АНАЛИЗ ВЕРТИКАЛЬНОГО ПЕРЕНОСА ГЕНОВ ОТ ТРАНСГЕННЫХ К НЕТРАНСГЕННЫМ РАСТЕНИЯМ ПШЕНИЦЫ (*Triticum aestivum L.*)^{*}

Д.Н. МИРОШНИЧЕНКО¹, М.В. ФИЛИППОВ¹, С.В. ДОЛГОВ^{1, 2}

При культивировании трансгенной пшеницы существует возможность вертикального переноса генов от генно-модифицированных к обычным сортам вследствие переноса пыльцы, перепыления и образования семян, гибридных по трансгенам. Использовав в качестве доноров пыльцы трансгенную гомозиготную линию яровой пшеницы сорта Андрос, которая содержит гетерологичные последовательности гена *bar*, придающего устойчивость к гербицидам на основе фосфинотрицина, и гена зеленого флуоресцентного белка *gfp*, мы продемонстрировали вертикальный перенос трансгенов у пшеницы в естественных условиях при удалении нетрансгенных растений того же сорта от генно-модифицированных на расстояние 1, 2 и 3 м. В результате 2-летних исследований показана зависимость частоты переноса трансгенов от направления господствующих ветров и удаления нетрансгенных растений относительно трансгенных. Частота вертикального дрейфа трансгенов в семенах нетрансгенных растений на полевых участках варьировала от 0,000 до 0,797 %. Трансгенный статус гибридных семян был подтвержден устойчивостью к примененному гербициду, флуоресценцией тканей, наличием последовательности трансгенов в геноме растений (данные ПЦР и ПЦР с обратной транскрипцией), а также характерным наследованием трансгенов в следующем семенном поколении. Подобные эксперименты проведены в России впервые.

Ключевые слова: трансгенная пшеница, вертикальный перенос генов, наследование трансгенов, устойчивость к гербициду, флуоресценция тканей.

Keywords: transgenic wheat, crop-to-crop gene flow, transgene segregation, herbicide resistance, GFP fluorescence.

За последнее десятилетие выполнено большое число исследований, посвященных экспрессии различных гетерологичных генов в культурных сортах у твердой и мягкой пшеницы. Хотя генно-модифицированная (ГМ) пшеница пока не возделывается, внедрение трансгенных сортов в широкую практику мирового сельскохозяйственного производства в ближайшие годы представляется вполне реальным, поскольку с 1996 года в разных регионах мира, включая развитые европейские страны, США, Канаду, Японию, Австралию, а также Китай, Мексику и Россию, проведено более 500 полевых испытаний трансгенных форм пшеницы. В этой связи вопросы дрейфа генов при возделывании генетически модифицированной пшеницы имеют немаловажное значение, тем более что пшеница — главная сельскохозяйственная культура в России.

Одной из проблем при внедрении ГМ культур в широкую сельскохозяйственную практику может быть дрейф генов из генома ГМ растений в геном нетрансгенных растений (вертикальный перенос). Проявления последствий вертикального переноса можно ожидать в регионах с перекрывающимися зонами произрастания и синхронизированными периодами цветения ГМ культур и традиционных сортов, а также в регионах произрастания близкородственных сорных или дикорастущих видов.

Пшеница представляет собой однолетнее самоопыляющееся растение, что значительно уменьшает риск дрейфа трансгенов посредством переноса пыльцы. Среди злаковых культур частота переопыления у мягкой пшеницы самая низкая и в зависимости от сорта составляет 0,5-10,0 % (1), что обусловлено ее биологическими особенностями. По сравнению с пыль-

* Завершающие этапы исследований выполнены при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, грант № 16.М04.12.0005.

цой у других злаков у пшеницы пыльцевые зерна достаточно тяжелые, а их количество меньше (2), поэтому приблизительно 90 % пыльцы оседает в радиусе 3 м (3, 4). Однако в отдельных случаях она может переноситься ветром на расстояние до 50-60 м (2, 3). Считается, что жизнеспособность пыльцы у пшеницы достаточно низкая и сохраняется в среднем 20-30 мин (2, 5), хотя у разных сортов она может варьировать от нескольких минут до 2-3 ч (6). Еще одна важная биологическая особенность пшеницы заключается в том, что при цветении колосьев частота раскрытия пыльников колеблется от 61 до 93 % в зависимости от сорта (7).

Вследствие низкой частоты перекрестного опыления в естественных условиях Европейское агентство по окружающей среде (European Environment Agency — EEA) и Европейский научный фонд (European Science Foundation — ESF) рассматривают пшеницу как культуру с очень низким риском вертикального переноса трансгенов в геном дикорастущих родственных видов (8). Несмотря на это, при возделывании пшеницы на полях нельзя исключать вероятность вертикального переноса генов от генно-модифицированных к немодифицированным сортам пшеницы вследствие переноса пыльцы, переопыления и образования гибридных по гетерогенным генам зерновок, что может отразиться на чистоте производимого семенного материала и качестве зерна.

Исследования по вертикальному переносу трансгенов с пыльцой у зерновых культур стали проводиться с конца XX века. При этом более известны работы по анализу вертикального переноса трансгенов, выполненные на сортах кукурузы (9), сорго (10), риса (11) и ячменя (12). На пшенице в основном анализировали дрейф генов с пыльцой у нетрансгенных сортов (13, 14). В единственной известной публикации, посвященной вертикальному переносу трансгенов у пшеницы (15), авторы ограничиваются информацией об образовании гибридных трансгенных форм F_1 при совместном выращивании на делянках нетрансгенных и трансгенных растений с генами *bar* и *gus*, однако данные о частоте переноса трансгенов не приводятся, а анализ факторов, влияющих на эффективность переноса, отсутствует из-за недостаточного объема выборки.

Мы изучили изменение частоты вертикального переноса генов от трансгенных к нетрансгенным растениям мягкой пшеницы в зависимости от направления господствующих ветров, удаления нетрансгенных растений относительно трансгенных, а также проанализировали наследование перенесенных трансгенов в следующем семенном поколении.

Методика. Опыты проводили в течение 2 лет (2004 и 2005 годы). Объектами исследований служили нетрансгенные растения яровой пшеницы сорта Андрос и его трансгенные формы, полученные на станции искусственного климата «Биотрон» (Филиал Института биоорганической химии РАН, Московская обл.) посредством баллистической трансформации векторной конструкцией psGFP-BAR с помощью генной пушки (16). В работе использовали гомозиготное семенное потомство T_3 . Оно было отобрано в результате размножения первичного трансгенного растения А-20, несущего ген ацетилфосфотрансферазы *bar*, который содержал инtron гена *ubi1* кукурузы и находился под контролем промотора *ubi1* кукурузы (17), а также ген зеленого флуоресцентного белка *gfp* (GFP) с инtronом гена *act1* риса под действием промотора *act1* риса (18). Экспериментальный участок закладывали на территории карантинного питомника Всероссийского НИИ селекции плодовых культур (г. Орел). Удаление от промышленных полей, на которых возделываются коммерческие сорта пшеницы, составляло не менее 10 км.

В оба года испытаний трансгенные семена пшеницы высевали внутри круга диаметром 1 м из расчета 500 шт./м². Нетрансгенные семена на участке 1-го года исследований (2004 год) высевали в 2 ряда с междуурядьем 10 см на расстоянии 1 м от внешнего периметра круга, засеянного трансгенными семенами, на участке 2-го года (2005 год) — на расстоянии 1, 2 и 3 м от внешнего периметра. Первый круг нетрансгенных растений-реципиентов был сплошным, второй и третий круг (2-й год испытаний) закладывали в виде восьми секторальных участков (длиной 1 м), ориентированных по сторонам света. Перед уборкой колосьев первый круг также разделяли на восемь равных секторов в соответствии со сторонами света.

Для анализа растений пшеницы F₁ на вертикальный перенос трансгенов семена F₁ от нетрансгенных растений высевали в зимних теплицах на стеллажные столы, заполненные смесью верхового торфа и песка (3:1). После достижения всходами высоты 9–11 см проводили 1-кратную обработку посевов в вечернее время 1 % раствором гербицида Баста («Bayer CropScience», Германия) согласно рекомендациям производителя. Через 1 нед после обработки выжившие растения выкапывали, пересаживали в отдельные горшки и продолжали выращивание. Активность экспрессии гена *gfp* оценивали при флуоресцентном исследовании пыльцы растений F₁ с помощью светового микроскопа ICM 405 («Opton», Германия) со светофильтрами 450–490 нм (длина волны возбуждения) и 515–530 нм (длина волны экстинкции белка GFP).

Геномную ДНК растений F₁, устойчивых к гербициду, экстрагировали согласно описанию (19) с применением 2×СТАВ-буфера, тотальную матричную РНК (мРНК) — в соответствии с приведенной методикой (20). Наличие вставок генов *gfp* и *bar* в геноме растений F₁ анализировали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР); наличие аналогичных фрагментов в кДНК, синтезированной с мРНК растений F₁, — применяя ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Использовали следующие пары праймеров: для гена *bar* — bar for 5'-TGC ACC ATC GTC AAC SAC TA-3', bar rev 5'-ACA GCG ACC ACG CTC TTG AA-3' (размер ожидаемого фрагмента — 310 п.н.); для гена *gfp* — sgfp for 5'-GCG ACG TAA ACG GCC ACA AG-3', sgfp rev 5'-CCA GCA GGA CCA TGT GTG ATC G-3' (размер ожидаемого фрагмента — 600 п.н.). Режим амплификации: старт при 95 °C, 5 мин; денатурация при 94 °C, 45 с; элонгация при 72 °C, 45 с; температура отжига — 60 °C, 40 с (30 циклов). Амплификацию проводили на приборе MasterCycler Gradient («Eppendorf», Германия). Продукты амплификации разделяли в электрофорезной камере («Hoeffer», США) в 1,2 % агарозном геле в 0,5×ТАЕ-буфере с добавлением бромистого этидия, приме-ния маркер M23 («СибЭнзим», Россия).

Наследование трансгенного признака в семенном потомстве оценивали по флуоресценции GFP в молодых зародышах пшеницы в F₂ *in vitro* на 2-е-3-и сут после инициации прорастания.

Статистический анализ результатов проводили с использованием критерия соответствия χ² (21).

Результаты. Схемы размещения трансгенных и нетрансгенных растений на участках приведены на рисунке 1.

На полевых участках 1-го и 2-го года исследований после прорастания семян наблюдали синхронное развитие трансгенных и нетрансгенных растений (кущение, выход в трубку, колошение и цветение). В 1-й год цветение отмечали с 26 июня по 13 июля, во 2-й — с 25 июня по 9 июля.

В период цветения растений пшеницы направление преобладаю-

ших ветров было сходным (западное, северо-западное и северное), однако скорость ветра во 2-й год оказалась ниже, что отразилось на значении суммарного пробега ветра (табл. 1).

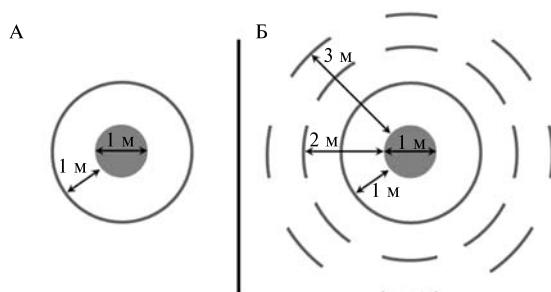


Рис 1. Схематическое изображение опытного участка по изучению вертикального переноса генов от трансгенных к нетрансгенным растениям пшеницы в 2004 (А) и 2005 (Б) году (карантинный питомник Всероссийского НИИ селекции плодовых культур, г. Орел).

вым в предыдущий год (табл. 2). При этом средняя масса 1000 семян уменьшилась на 14 %.

1. Продолжительность цветения (ПЦ) у трансгенных и нетрансгенных растений пшеницы сорта Андрес и климатические характеристики в этот период на полевом участке по годам исследований (60° - 21° , карантинный питомник Всероссийского НИИ селекции плодовых культур, г. Орел)

ПЦ, сут	Средняя температура воздуха, °C	Относительная влажность, %	Суммарный пробег ветра, м	Доля в направлении господствующих ветров, %							
				С	С-В	В	Ю-В	Ю	Ю-З	З	С-З
18	18,1	74,4	3877	18,0	2,3	1,6	4,7	5,5	10,2	25,8	28,1
16	18,5	67,3	2959	27,5	4,2	6,3	2,1	2,1	8,4	24,2	17,9

2004 год
2005 год

П р и м е ч а н и е. С, С-В, В, Ю-В, Ю, Ю-З, З и С-З — соответственно северный, северо-восточный, восточный, юго-восточный, южный, юго-западный, западный и северо-западный ветер.

2. Распределение семян F_1 , содержащих гены *bar* и *gfp*, у нетрансгенных растений пшеницы сорта Андрес в зависимости от их расположения относительно трансгенных растений (карантинный питомник Всероссийского НИИ селекции плодовых культур, г. Орел)

Участок	Число семян F_1 , собранных с нетрансгенных растений пшеницы, шт.				Число устойчивых к гербициду проростков F_1 (bar^+/gfp^+), шт.				Частота вертикального переноса с пыльцой (gene flow), %			
	2004 год		2005 год		2004 год		2005 год		2004 год		2005 год	
	1 м	1 м	2 м	3 м	1 м	1 м	2 м	3 м	1 м	1 м	2 м	3 м
С	8468	5539	3902	3056	8	5	0	0	0,094	0,090	0	
С-В	8020	6312	5967	4930	49	13	4	1	0,611	0,206	0,067	0,020
В	6660	5604	3382	5839	53	13	1	0	0,796	0,232	0,030	0
Ю-В	7404	5571	5945	5311	59	17	1	0	0,797	0,305	0,017	0
Ю	7980	5161	4398	5565	45	11	1	0	0,564	0,213	0,023	0
Ю-З	9071	6613	4748	7860	24	1	2	0	0,265	0,015	0,042	0
З	8400	6352	4712	3500	18	4	4	0	0,214	0,063	0,085	0
С-З	8446	6617	3837	4398	4	0	0	0	0,047	0	0	0
Всего	62221	47669	36891	40459	259	64	13	1	0,416	0,134	0,035	0,002

П р и м е ч а н и е. С, С-В, В, Ю-В, Ю, Ю-З, З и С-З — описание участков с долей господствующих ветров (соответственно северный, северо-восточный, восточный, юго-восточный, южный, юго-западный, западный и северо-западный) см. в таблице 1.

В 1-й год испытаний после того, как все собранные семена F_1 высеяли в зимние теплицы и на 10-е сут обработали всходы гербицидом, произошла гибель более 99,5 % проростков. Однако были также обнаружены

В 1-й год исследований число семян F_1 , собранных с нетрансгенных растений пшеницы на круговом участке, который располагался на расстоянии 1 м от трансгенных, составило 62 221 шт., во 2-й — более 125 тыс. шт. Вследствие того, что климатические условия 2-го года исследований оказались менее благоприятными (год был засушливее), урожай семян нетрансгенных растений снизился по сравнению с таковым в предыдущий год (табл. 2). При этом средняя масса 1000 семян уменьшилась на 14 %.

растения, которые не проявляли признаков повреждения, продолжали успешно расти и формировать листья. Доля устойчивых к гербициду растений F₁, которые получили из семян нетрансгенных форм, произраставших на расстоянии 1 м от трансгенных (при общем числе выживших растений 259 шт.), заметно варьировала в зависимости от того, в каком направлении относительно центрального круга находились растения-реципиенты (см. табл. 2). На северном и северо-западном участках число гибридных семян, давших начало устойчивым к гербициду растениям, составило 1-2 шт. на 2000 семян, тогда как на восточном и юго-восточном — достигло 8 шт. на 1000 семян.

При тестировании на экспрессию гена GFP синтез этого маркерного белка отмечали у всех 259 растений F₁, выживших после обработки гербицидом (для исследования мы использовали пыльцу, которая не содержит хлорофилл, что облегчает визуализацию). Проведенный ПЦР-анализ ДНК (рис. 2, А) полностью подтвердил присутствие последовательности трансгенов в геноме у всех проанализированных гибридных растений F₁, поскольку во всех образцах происходила амплификация фрагментов ожидаемой длины — 310 п.н. (ген *bar*) и 600 п.н. (ген *gfp*). ОТ-ПЦР-анализ экспрессии генов *bar* и *gfp* с использованием тотальной растительной РНК (см. рис. 2, Б) также подтвердил наличие вставки трансгенов, с которых успешно транскрибировались мРНК, необходимые для синтеза ацетилфосфотрансферазы, обеспечившей устойчивость к гербициду, а также маркерного флуоресцентного белка GFP. Как свидетельствуют наши предыдущие исследования (16), в трансгенных растениях — донорах пыльцы гены *bar* и *gfp* наследуются сцепленно, поскольку оба изначально находятся в одной векторной конструкции psGFP-BAR, которая использовалась для получения трансгенных растений линии A-20.

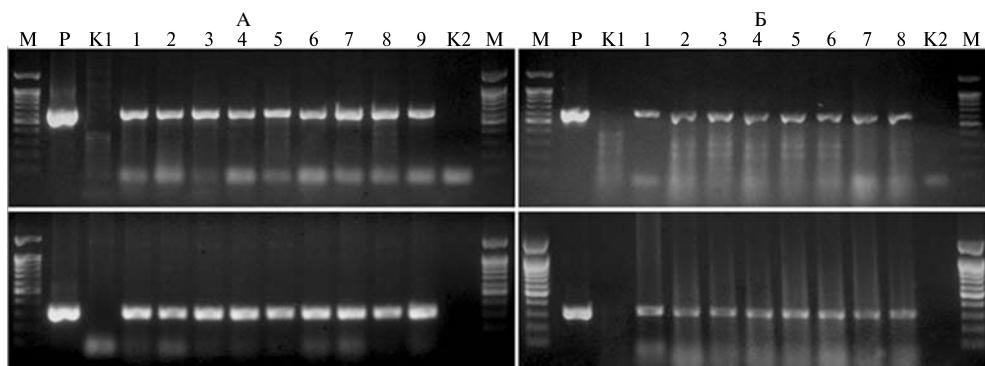


Рис. 2. Типичные электрофорограммы ампликонов, полученных у пшеницы сорта Андрос при анализе тотальной ДНК методом полимеразной цепной реакции (А) и анализе тотальной кДНК методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (Б) на присутствие генов *gfp* (верхний ряд) и *bar* (нижний ряд) в геноме устойчивых к гербициду растений F₁, которые были обнаружены при высеве семян от нетрансгенных растений, выращенных на расстоянии 1 м от трансгенных: М — маркер молекулярной массы (1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 и 100 п.н.); Р — положительный контроль (ДНК плазиды psGFP-BAR, использовавшийся при получении трансгенной линии); К1 — отрицательный контроль (ДНК нетрансгенного растения пшеницы); К2 — реакционная смесь, не содержащая ДНК; 1-9 — гибридные растения F₁ (соответственно 9/2, 1/10, 4/7, 5/15, 4/4, 4/9, 5/12, 4/13 и 17/1); размер ожидаемого фрагмента для гена *bar* — 310 п.н., для гена *gfp* — 600 п.н.

Таким образом, в 1-й год молекулярно-биологический анализ показал, что все выжившие при обработке гербицидом растения представляют собой потомство F₁ со вставкой генов *bar* и *gfp* в геноме, которое получено в полевых условиях на опытном участке в результате естественного переопыления трансгенных и нетрансгенных растений пшеницы.

Во 2-й год исследований нетрансгенные растения-реципиенты дополнительно высадили на расстоянии 2 и 3 м от трансгенных. После обработки всходов семян F_1 гербицидом обнаружили 78 выживших проростков без признаков повреждения. Доля выживших растений F_1 значительно варьировала в зависимости от удаления анализируемых семенных участков от растений — доноров пыльцы. Так, у растений-реципиентов, произраставших на расстоянии 3 и 2 м от трансгенных, устойчивую к гербициду форму F_1 дали соответственно 1 и 13 семян (см. табл. 2). При удалении на 2 м распределение гибридных растений F_1 варьировало от 0 шт. (северный и северо-восточный участки) до 4 шт. (северо-восточный и западный участки). При удалении на 3 м единственное устойчивое растение F_1 было обнаружено на северо-восточном участке. У нетрансгенных растений, размещенных на расстоянии 1 м от трансгенных, устойчивые к гербициду формы F_1 получили от 64 семян, при этом частота вертикального переноса изменялась в зависимости от анализируемого участка: на юго-восточном число таких семян составило 3 шт. на 1000, тогда как на северо-западном их не обнаружили (см. табл. 2).

Флуорометрическое исследование пыльцы у всех 78 растений F_1 подтвердило сцепленный перенос признаков флуоресценции и устойчивости к гербициду. Результаты выполненного молекулярно-биологического анализа (ПЦР и ОТ-ПЦР) совпали с данными физиологического и биохимического тестирования. ПЦР-анализ показал, что в геноме всех анализируемых гибридных растений F_1 присутствовали последовательности генов *gfp* и *bar*, а также наблюдалась их экспрессия на уровне мРНК. Таким образом, отобранные в результате обработки гербицидом растения F_1 трансгены по генам *bar* и *gfp*, перенос которых произошел при переопылении трансгенной пыльцой.

Для подтверждения того, что обнаруженные устойчивые к гербициду формы не являются следствием случайного загрязнения семенами трансгенных растений-доноров, а действительно образовались в результате переноса пыльцы, мы проанализировали наследование приобретенных генов при дальнейшем семенном размножении. В случае опыления нетрансгенных растений трансгенной пыльцой гомозиготных растений линии А-20 гибридные растения F_1 должны представлять собой гетерозиготы по приобретенным генам *bar* и *gfp*. При последующем самоопылении таких растений F_1 наследование будет соответствовать однолокусному характеру встраивания, поскольку гены *bar* и *gfp* имеют регуляторные элементы (промоторы) генов *act1* и *ubi1* риса и кукурузы, определяющих доминантные признаки. Если же эти растения получены из случайно попавших семян гомозиготных трансгенных растений-доноров, то расщепления признаков происходит не должно, а флуоресценция будет наблюдаться во всех растениях-потомках.

Характер наследования экспрессии гена *gfp* изучили для 14 691 зерновки F_2 (табл. 3). Уровень экспрессии *gfp* у трансгенных семян варьировал, однако в потомстве у всех 337 гибридных растений F_1 наблюдалось стабильное наследование приобретенного гетерологичного гена. Статистический анализ по χ^2 -критерию соответствия показал, что для большинства растений, полученных как в 1-й, так и во 2-й год, была характерна однолокусная модель наследования 3:1 (см. табл. 3), несмотря на колебания реального соотношения числа трансгенных и нетрансгенных потомков F_2 , полученных от индивидуальных растений F_1 , от 1:1 до 11:1. Следует отметить, что большинство «необычных» расщеплений наблюдали у растений, сформировавших ограниченное число семян (10-20 шт.). При этом не было

3. Результаты анализа наследования экспрессии гена *gfp* в семенном поколении гибридных растений F₁, полученных в результате вертикального переноса генов от трансгенных к нетрансгенным растениям пшеницы сорта Андроc в зависимости от их расположения относительно трансгенных растений (станция искусственного климата «Биотрон», Филиал Института биоорганической химии РАН, г. Пущино)

Год	А	Б	В	Г	Д
2004	1	259	9970	239	92,3
2005:					
всего		78	4721	68	87,2
в том числе	1	64	3842	57	89,1
	2	13	814	10	76,9
	3	1	65	1	100

П р и м е ч а н и е. А — расстояние между трансгенными и нетрансгенными растениями, м; Б — число *bar⁺/gfp⁺* растений F₁, шт.; В — число зародышей *bar⁺/gfp⁺* растений F₁, проанализированных на экспрессию GFP, шт.; Г — число *bar⁺/gfp⁺* растений F₁, показавших расщепление по *gfp* 3:1 согласно χ^2 , шт.; Д — доля зародышей, показавших расщепление 3:1, %.

обнаружено растений F₁, наследующих флуоресценцию GFP как гомозиготный признак. То, что все устойчивые к гербициду растения F₁ демонстрировали наследование трансгенного признака как гетерозиготного, свидетельствует о факте вертикального переноса генов посредством естественного переопыления трансгенной пыльцой.

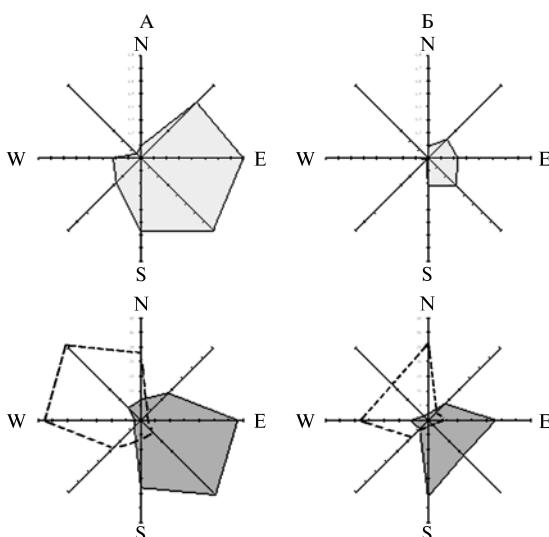


Рис. 3. Частота вертикального переноса генов *bar* и *gfp* (верхний ряд) в зависимости от направления ветра (нижний ряд) при удалении нетрансгенных растений пшеницы сорта Андроc от трансгенных на расстояние 1 м в 2004 (А) и 2005 (Б) году.

В верхнем ряду закрашенная область показывает распределение частоты переноса трансгенов (одно деление — 0,1 %) в зависимости от географического положения нетрансгенных растений относительно центрального кругового участка, засеянного трансгенной пшеницей. В нижнем ряду пунктиром обозначена метеорологическая роза ветров, закрашенная область — роза ветров, обратная метеорологической (карантинный питомник Всероссийского НИИ селекции плодовых культур, г. Орел).

Частота переноса трансгенов в 2005 году (на 23 %) вследствие менее благоприятного водного режима (недостаточное количество осадков).

Разделение анализируемого кругового опытного участка на восемь

Наши исследования показали, что частота вертикального переноса трансгенов *bar* и *gfp* на опытных участках в разные годы варьировала, что может быть обусловлено влиянием различных климатических факторов в период активного цветения колосьев пшеницы. Так, для реципиентных растений, расположенных на расстоянии 1 м от донорных, в 2004 и 2005 году она в среднем составила соответственно 0,416 и 0,134 % (см. табл. 3). Скорее всего, наблюдаемое превышение в 1-й год исследований вызвано тем, что во 2-й год продолжительность цветения в целом была короче, в период выброса пыльников наблюдалась более высокая температура воздуха при более низкой влажности, пыльца хуже мигрировала, поскольку отмечалось снижение суммарного пробега ветра (см. табл. 1). На уменьшение частоты переноса также повлияло общее снижение урожайности в 2005 году (на 23 %) вследствие менее благоприятного водного режима (недостаточное количество осадков).

сегментов в соответствии со сторонами света позволило выявить корреляцию между распределением трансгенных гибридных семян и направлением господствующих ветров в период массового цветения пшеницы. Направление преобладающих ветров в оба года исследований было схожим (западное, северо-западное и северное направления) (рис. 3). Большая часть трансгенных гибридных семян F_1 была обнаружена на четырех участках, находящихся по перечисленным направлениям, а также по юго-восточному направлению. В 1-й год на северо-восточном, восточном, юго-западном и южном участках (относительно центрального круга) обнаружили 206 трансгенных гибридных семян (или 81 % от их общего числа), во 2-й — 45 семян (или 84 % от общего числа). В оба года исследований самую высокую частоту переноса регистрировали у растений, находящихся по направлению северо-западного ветра: в 2004 и 2005 году она составила соответственно 0,797 и 0,305 % (или 59 и 17 устойчивых к гербициду растений).

Совершенно иным было распределение гибридных семян на участках круга нетрансгенных растений, находившихся в направлении южного, юго-восточного, восточного и северо-восточного ветров. В сумме доля гибридных семян, образовавшихся в секторах внешнего круга в этих направлениях, равнялась всего 19 % (2004 год) и 16 % (2005 год) от общего числа обнаруженных гибридных семян. В оба года исследований минимальную частоту вертикального переноса трансгенов регистрировали на северо-восточном участке. Эти данные позволяют утверждать, что общее количество переносимой трансгенной пыльцы в зависимости от направления ветра могло различаться в 4-5 раз, что и привело к наблюдаемым колебаниям.

При увеличении расстояния от трансгенных растений — доноров пыльцы до нетрансгенных происходило очевидное снижение вероятности переноса трансгенов с пыльцой. Так, при удалении на 1 м частота переноса в среднем составила 0,134 %, снизившись при 2-кратном увеличении расстояния почти в 4 раза (0,035 %), при 3-кратном — в 66 раз (0,002 %). Эти данные в целом согласуются с результатами исследований, в которых изучалась частота перекрестного опыления у некоторых сортов мягкой и твердой пшеницы в разных условиях (1, 3, 5, 6, 13, 14).

Выводы, изложенные в нашей работе, основаны на интерпретации экспериментальных данных, которые были получены для выяснения того, насколько велика опасность дрейфа трансгенов с пыльцой в естественных условиях. Подобные данные предоставляют возможность проанализировать эффект различных факторов (удаленность растений-реципиентов, направление господствующего ветра, сезонность и климатические характеристики), что необходимо для определения условий, при которых перенос трансгенных признаков с пыльцой будет сведен к некритическому минимуму или полностью предотвращен. Это позволит избежать засорения нетрансгенного зерна трансгенными примесями (и наоборот), а также обеспечит генетическую целостность сортов пшеницы, возделываемых в хозяйствах, где существует вероятность «соприкосновения» обычных и гено-модифицированных сортов.

Итак, в полевых условиях у пшеницы продемонстрирована возможность вертикального переноса трансгенов при возделывании форм, близких по фенологии. Подобные эксперименты проведены в России впервые. Полученные нами данные показывают, что для обеспечения безопасной изоляции трансгенных посевов от нетрансгенных необходим анализ большей выборки, изучение последствий удаления растений на большие расстояния, учет объема переносимой с ветром трансгенной пыльцы в зависимости

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Lawrence R.G., Matus-Cadriz M.A., Hucle P. Estimating outcrossing rates in spring wheat cultivars using the contact method. *Crop Sci.*, 2006, 4: 247-249.
2. D'Souza V.L. Investigations concerning the suitability of wheat as a pollen-donor for cross pollination by wind as compared to rye, *Triticale* and *Secalotrichum*. *Zeitschrift fur Pflanzenzuchtung*, 1970, 63: 246-269.
3. Khan M.N., Heyne E.G., Arp A.L. Pollen distribution and the seed set on *Triticum aestivum* L. *Crop Sci.*, 1973, 13: 223-226.
4. Virmani S.S., Edwards I.B. Current status and prospects for breeding hybrid rice and wheat. *Adv. Agron.*, 1983, 36: 145-214.
5. De Vries A.P. Flowering biology of wheat particularly in view of hybrid seed production: a review. *Euphytica*, 1971, 20: 152-170.
6. Hedges S.G., Waines J.G. Hybridization and introgression between bread wheat and wild and weedy relatives in North America. *Crop Sci.*, 2004, 44: 1145-1155.
7. Rakki E. Effect on pollination of the amount of pollen on the surface of the stigma. *Növénytermelés*, 1962, 11: 35-44.
8. Eastham K., Swete J. Genetically modified organisms (GMOs): The significance of gene flow through pollen transfer. Environmental Issue (Report № 28), European Environment Agency. Copenhagen, 2002: 75.
9. Ma B.L., Subedi K.D., Reid L.M. Extent of cross-fertilization in maize by pollen from neighboring transgenic hybrids. *Crop Sci.*, 2004, 44: 1273-1282.
10. Schmid M., Bothma G. Risk assessment for transgenic sorghum in Africa: crop-to-crop gene flow in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Crop Sci.*, 2006, 46: 790-798.
11. Messeguer J., Fogher C., Guiderdoni E., Marfa V., Catallia M.M., Baldi G., Mele E. Field assessments of gene flow from transgenic to cultivated rice (*Oryza sativa* L.) using a herbicide resistance gene as tracer marker. *Theor. Appl. Genet.*, 2001, 103: 1151-1159.
12. Ritala A., Nuutila A.M., Aikasalo R., Kauppinen V., Tamminen J. Measuring gene flow in the cultivation of transgenic barley. *Crop Sci.*, 2002, 42: 278-285.
13. Matus-Cadriz M.A., Hucle P., Horak M.J., Blomquist L.K. Gene flow in wheat at the field scale. *Crop Sci.*, 2004, 44: 718-727.
14. Hanson B.D., Mallory-Smith C.A., Shafii B., Thill D.C., Zemtsov R.S. Pollen-mediated gene flow from blue aleurone wheat to other wheat cultivars. *Crop Sci.*, 2005, 45: 1610-1617.
15. Gattford K.T., Basri Z., Edlington J., Lloyd J., Qureshi J.A., Brettle R., Fincherg G.B. Gene flow from transgenic wheat and barley under field conditions. *Euphytica*, 2006, 151: 383-391.
16. Филиппов М.В., Мирошниченко Д.Н., Верниковская Д.И., Долгов С.В. Подбор оптимальных параметров баллистической трансформации генома мягкой пшеницы. С.-х. биол., 2006, 1: 67-73.
17. Christensen A.H., Sharrack R.A., Quail P.H. Maize poly-ubiquitin genes: genes, structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplast by electroporation. *Plant Mol. Biol.*, 1992, 18: 675-689.
18. McCleroy D., Zhang W., Cao J., Wu R. Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. *Plant Cell*, 1990, 2: 163-171.
19. Rogers S., Bendich A. Extraction of total cellular DNA from plants, algae and fungi. In: Plant molecular biology manual /S. Gelvin, R. Schiperoort (eds.). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Boston, London, 1995: Section 7-1.
20. Gehrig H., Winter K., Cushman J., Borlaug A., Tayibi T. An improved RNA isolation method for succulent plant species rich in polyphenols and polysaccharides. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 2000, 18: 369-376.
21. Лакин С.Ф. Биометрия: уч. пос. для биол. вузов. М., 1990.

¹Филиал Института биоорганической химии
имени академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова РАН,

142290 Московская обл., г. Пущино, просп. Науки, 6;

²Всероссийский НИИ сельскохозяйственной
биотехнологии Россельхозакадемии,
127550 г. Москва, ул. Тимирязевская, 42,
e-mail: miroshnichenko@fibkh.serpuhov.su

Поступила в редакцию
24 апреля 2011 года

ANALYSIS OF VERTICAL GENE TRANSFER FROM TRANSGENIC TO NONTRANSGENIC PLANTS OF WHEAT (*Triticum aestivum* L.)

D.N. Miroshnichenko¹, M.V. Filippov¹, S.V. Dolgov^{1, 2}

S u m m a r y

During cultivation of transgenic wheat a vertical gene transfer is possible from genetically modified to usual varieties as a result of pollen transfer, subbing and formation of seeds, hybridous on transgenes. In field trials the authors demonstrated the vertical transfer of transgenes in spring wheat with moving away nontransgenic plants of the Andros variety at a distance of 1, 2 and 3 m from genetically modified plants of the same variety. The transgenic homozygous line used as a pollen donor contains the heterologous sequences of *bar* gene and *gfp* gene which encode resistance to herbicides and green fluorescent protein, respectively. In two-years study it was shown that the frequency of transgenes transfer depends on prevailing wind direction and remoteness of nontransgenic plants from transgenic ones. In the field investigations the frequency of vertical flow of transgenes to seeds of nontransgenic plants varied from 0.000 to 0.797 %. The transgenic status of hybridous seeds was confirmed by the resistance to used herbicide, the tissue fluorescence, the presence of transgene sequence in plant genome (the data of PCR and RT-PCR) and also by the specific inheritance of transgenes in the next seed generation. Such experiments were carried out for the first time in Russia.

Научные собрания

МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ «ХРОМОСОМА 2012»

(г. Новосибирск, 2-7 сентября 2012 года)

Организаторы конференции: Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения РАН (ИМКБ СО РАН), Новосибирское отделение Межрегиональной общественной организации «Вавиловское общество генетиков и селекционеров» (НО ВОГиС), Общество с ограниченной ответственностью «Технологии Биосистем» (ООО «ТБ»)

Конференция «Хромосома 2009», прошедшая в Новосибирском научном центре, по мнению участников, выполнила цель возрождения научных семинаров, идейным вдохновителем и организатором которых была Александра Алексеевна Прокофьева-Бельговская. Собранием участников было принято решение о проведении аналогичных научных форумов на регулярной основе.

Планируемые секции:

- Организация генома, пространственная организация ядра и хромосом
- Специализированные районы хромосом
- Хромосомы митохондрий
- Хромосомы и эволюция
- Хромосомы человека. Хромосомы при патологиях
- Хромосомы в клеточных делениях
- Молекулярно-генетические механизмы инактивации X-хромосомы у млекопитающих
- Политенные хромосомы

Контакты и информация: <http://chromosome2012.mcb.nsc.ru>

IV МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ «МАТЕМАТИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ И БИОИНФОРМАТИКА»

(г. Пушкино, 14-19 октября 2012 года)

Организаторы: Российская академия наук, Научный Совет по математической биологии и биоинформатике, Институт математических проблем биологии Российской академии наук

Конференция посвящена 40-летию Института математических проблем биологии РАН.

Основные научные направления:

- Высокопроизводительные вычисления в моделировании биологических систем
- Математическое моделирование структуры и динамики биополимеров
- Математическое моделирование нанобиоэлектронных систем
- Математическое моделирование генных и метаболических сетей
- Математические модели обработки информации в структурах мозга
- Модели эволюции и развития в биологии
- Математическое моделирование в иммунологии и эпидемиологии
- Популяционное моделирование и вычислительная экология
- Математическая биофизика
- Математические методы обработки и анализа биологических данных
- Биоинформатика

Контакты и информация: icmhb12@impb.ru