

ОЦЕНКА ПЕРЕНОСА ГЕНОВ ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ СОИ

Д.С. НАСОНОВА, асп.; В.А. РАСКАТОВ, д. с.-х. н.; В.Г. ЛУНИН, д. с.-х. н.*

(Кафедра биотехнологии, экологии)

Разработан метод экспресс-диагностики наличия и количественного содержания рекомбинантной ДНК в растительном материале, исключаящий ошибку человека при проведении исследования и интерпретации данных. С использованием этого метода показано, что перенос геной вставки от трансгенной гербицидоустойчивой сои к дикой сое *Glycine Soja* в естественных условиях не происходит. Полученные результаты свидетельствуют о стабильности дикой популяции сои рядом с агропопуляциями. Показано, что вероятность нарушения биоразнообразия в естественных местообитаниях популяций дикой сои в случае выращивания трансгенной сои очень мала.

Согласно существующим в России нормам перед выпуском в окружающую среду каждый трансгенный сорт должен пройти испытания на биобезопасность. Один из основных типов экологического риска, непосредственно сопряженный с трансгенными растениями (ТР) — это перенос с пылью ТР чужеродных генов в исходно нетрансгенные сорта или их дикие сородичи и вызванное этим генетическое загрязнение сортов культивируемых растений и дикоросов, уменьшающее их биоразнообразие (вертикальная утечка генов). Изучение взаимодействий ТР сои с дикими сородичами в агроценозе являлось частью масштабной работы по научно обоснованной оценке биобезопасности выращивания ТР на территории страны и послужит доказательным материалом для экспертов, принимающих решение о разрешении или запрещении регистрации трансгенного сорта в РФ для промышленного выращивания.

Объектом нашего исследования стала генетически модифицированная соя GTS 40-3-2 (Stine 2254 RR — Monsanto Company), устойчивая к гербициду глифосату. Трансгенная соя получена

в результате вставки в растительный геном культурной сои гена, кодирующего фермент синтазу (EPSPS) почвенной бактерии *Agrobacterium tumefaciens*. Район проведения испытаний — Дальневосточный регион РФ, окрестности оз. Ханка. Экологические условия выращивания: почва лугово-черноземовидная, с гумусовым горизонтом мощностью до 30 см и содержанием гумуса 5%, климат умеренный муссонный, годовое количество осадков 550 мм.

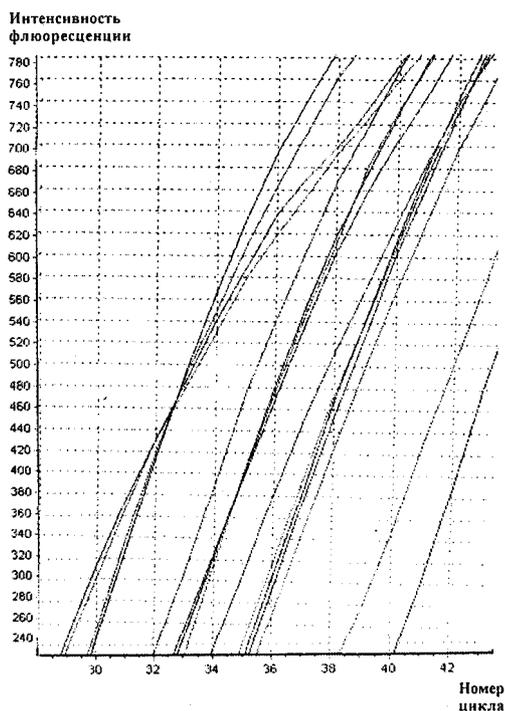
Для проведения исследований нами разработаны методы определения количественного содержания гетерологичных последовательностей чужеродной ДНК (трансгенной вставки) в растительном сырье, основанных на идентификации рекомбинантной ДНК с использованием метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией в режиме реального времени (RealTime PCR). Технология ПЦР в реальном времени объединяет в себе амплификацию (умножение) ДНК с детекцией ПЦР-продукта в одной пробе. Такой формат приводит к существенному снижению риска конта-

* ВНИИСБ.

минации (загрязнения), который возникает при открывании пробирок и манипуляций с реакционной смесью после ПЦР. Накопление продуктов амплификации детектируется непосредственно во время ее проведения. Причем кинетика накопления ампликонов (продуктов ПЦР) напрямую зависит от числа копий исследуемой матрицы, поэтому возможно провести количественные измерения рекомбинантной ДНК. Методы детекции продуктов ПЦР в реальном времени основаны на изменении флуоресценции, которое пропорционально увеличению количества ПЦР-продукта в ходе реакции. Флуоресценция измеряется в течение каждого цикла ПЦР и на основании данных измерения строится график, позволяющий следить за ходом реакции. В основу разработанной нами схемы выявления продуктов амплификации легло сочетание интеркалирующего агента SYBR Green, флуоресценция которого возрастает при внедрении в 2-цепочечные молекулы ДНК, со специфичными для обнаруживаемых последовательностей ДНК-зондами TaqMan Assay, которые дополняют друг друга при построении графиков накопления продуктов ПЦР. Описаны методы отбора проб, подготовки проб к анализу, выделения ДНК с помощью СТАВ (гексадецилтриметиламмоний бромид). Разработаны методы, направленные на выявление регуляторной последовательности промотора 35S из вируса мозаики цветной капусты и NOS-терминатора. Для нашего объекта — трансгенной сои, устойчивой к гербициду глифосат, создана методика дополнительного, подтверждающего анализа в исследуемом материале по идентификации собственно вставки — гена CP4 5-енолпирувиллицимат-3-фосфатсинтазы (EPSPS). Для сравнения и расчета количества ГМИ в общем количестве образца предложено ставить дополнительную реакцию по идентификации ДНК сои в исследуемом материале по

фрагменту гена лектина — запасного белка сои. Для оценки количественного содержания чужеродного гена в соевом сырье был использован специально созданный набор эталонов. Метод адаптирован также для тестирования трансгенной кукурузы линий MON 810 и Vt-176, устойчивых к стеблевому мотыльку, с дополнительной реакцией определения гена зеина, и трансгенного картофеля, устойчивого к колорадскому жуку (ген *csy III A*), с дополнительной реакцией определения гена фосфоенолпируват карбоксилазы.

На рисунке представлены результаты количественного выявления гена EPSPS в 4 образцах растений в 2-кратной повторности, а также результаты реакции, используемые для построения калибровочной кривой (5 разведений в 3-кратной повторности). Наличие линий соответствует положительным резуль-



Апробация метода. Количественное выявление гена EPSPS. Результаты РТ-ПЦР, нормированные по эталону

татам и отражает поведение эталонов, использованных для построения калибровочной кривой, отсутствие линии в вариантах с опытными образцами свидетельствует об отсутствии трансгенной вставки.

Полевой агроэкологический опыт по скрещиванию между двумя видами сои (дикорастущей *Glycine Soja* и культурной генетически модифицированной, устойчивой к гербициду раундап) проводился ВНИИСБ совместно с Центром «Биоинженерия» РАН в условиях свободного переопыления на экспериментальных участках Института сои ДВО РАН в течение трех лет. Согласно схеме опыта, генетически модифицированные растения высаживали так, что каждый рядок чередовался с рядком дикой сои, то есть создавали оптимальные условия для перекрестного опыления. Опыт проведен в 4-кратной повторности на делянках размером 22 м². Образцы растений и их семена подвергали лабораторному анализу методом РТ-ПЦР (полимеразной цепной реакции в реальном времени). В случае, когда донором пыльцы выступала генетически модифицированная культурная соя, в естественных условиях межвидовых гибридов с дикорастущей соей получить не удалось. Однако появление межвидовых гибридов в естественных условиях все же возможно, хотя вероятность его очень мала, поскольку оба вида являются типичными самоопылителями, и свободное переопыление между растениями культурной сои обычно составляет менее 1%. Данные генотипирования подтверждают достаточное генетическое удаление популяций дикой сои от культурных сортов сои. В

наших опытах отсутствие приобретенного признака устойчивости к гербициду у дикой сои подтверждалось путем обработки смешанных посевов культурной гербицидоустойчивой и дикой сои гербицидом раундап, в результате которой происходило полное уничтожение дикой сои. Показано, что в смешанных посевах культурной гербицидоустойчивой и дикой сои влияние фитогенного фактора практически отсутствует и в случае переопыления вероятность появления гибридов, устойчивых к гербициду, крайне низка. Показана стабильность популяций дикой сои рядом с агропопуляциями ТР.

ЛИТЕРАТУРА

1. Семенова А.М. и др. Оценка генетического разнообразия дикорастущей сои (*Glycine soja* Siebold et Zucc.) в Дальневосточном регионе России // Генетика, 2004. Т. 40. № 1. С. 1—8. — 2. Соколов М.С., Марченко А.И. Потенциальный риск возделывания трансгенных растений и потребления их урожая // Сельскохозяйственная биология, 2002. № 5. С. 3-22. — 3. Brookes G., Barfoot P. // PG Economics Ltd., Dorchester, 2005. — 4. Hood M.J., Allen F.L. // Agronomy Abstracts, Proceedings of the American Society of Agronomy, 1980. — 5. Gai J.Y. et al. // Acta Agron. China 26, 2000. P. 513-520. — 6. Li pp M., Brodman P., Pietsch et al. // Journal of AOAC International-1999. V. 82. N.4. P. 923-929. — 7. Meyer R., Jaccaud E. // Proceedings of the EURO FOOD CHEM IX Conference, Interlaken, Switzerland, 1997/ Event № 220 (1). Н. 23-28. — 8. Nakayama Y., Yamaguehi H. // Weed Biology and Management 2, 2002. P. 25-30. — 9. Roseland C.R. // Proceedings of an International Conference. OECD, 2001. P. 55-103, 197—235. — 10. Yap E.P.H., Lo Y. - M.O., K.A. Fleming K.A., McGee J.O'D. // PCR Technology, Current Innovations. Ed. G. Griffin, A.M. Griffin, CRC Press, 1994.