

© Т. В. Матвеева

Санкт-Петербургский государственный университет

Развитие генной инженерии ставит вопрос о биобезопасности трансгенных организмов. Наибольшие опасения, связанные с негативными последствиями возделывания ГМО, сводятся к возможной утечке трансгенов за счет переопыления нетрансгенных близкородственных форм трансгенной пыльцой. Природно-трансгенные растения представляют собой виды, которые были подвергнуты агробактериальной трансформации и сохранили Т-ДНК-подобные последовательности в своих геномах. Эти виды могут быть рассмотрены как модели для изучения отсроченных экологических рисков, связанных с утечкой трансгенов. Данному вопросу посвящен представленный обзор.

✳ **Ключевые слова:** природно-трансгенные растения; Т-ДНК; распространение трансгенов.

ПРИРОДНО-ТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ, КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ОТСРОЧЕННЫХ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ РИСКОВ ВОЗДЕЛЫВАНИЯ ГМО

ВВЕДЕНИЕ

Прошло более 30 лет с тех пор как людьми были получены первые трансгенные растения (Herrera-Estrella et al., 1983; De Block et al., 1984). Однако с появлением первых коммерческих линий ГМО встал вопрос об их экологической безопасности. Ситуация усложняется тем, что площади посевов, занятые ГМ культурами неуклонно растут, а подавляющее большинство трансгенных линий растений являются устойчивыми к гербицидам и/или насекомым (ISAAA, 2012).

В литературе появляется все больше работ связанных с исследованием экологических рисков ГМ-растений. Суммируя данные исследования (EFSA GMO Panel Working Group on Animal Feeding Trials, 2008; Dunfield, Germida, 2004; Giovannetti, 2003), можно прийти к заключению, что основные опасения связаны со следующими проблемами:

- возможная утечка трансгенов за счет переопыления нетрансгенных сортов и близкородственных видов сорных растений трансгенной пыльцой;
- горизонтальный перенос генов от трансгенных растений почвенным микроорганизмам;
- влияние инсектицидных белков трансгенных растений на нецелевую фауну.

При оценке вероятности потенциального горизонтального переноса генов из трансгенных растений к прокариотам было показано, что она крайне низка и скорее всего не оказывает влияния на эволюцию прокариот (Brigulla, Wackernagel, 2010).

Изучение видового разнообразия в агроценозах показало, что возделывание ГМО не сказывается негативно на нецелевых организмах. Наибольшие опасения связаны с почвенными организмами, поскольку была показана возможность секреции инсектицидных токсинов в почву. Тем не менее фактов, свидетельствующих о снижении видового разнообразия нецелевой фауны, не отмечено. (UNEP, 2006).

Проблему утечки трансгенов начали активно обсуждать с появлением ряда работ, показавших возможность переопыления трансгенных культурных растений семейства *Cruciferae* с культурными и сорными растениями близких видов (Bing et al., 1996; Beckie et al., 2003; Chevre et al., 1994, 2000).

Эксперименты по оценке возможности получения гибридов между трансгенными сортами *Brassica napus* L. и его дикими родственниками *Brassica rapa* L., *Raphanus raphanistrum* L., *Sinapis arvensis* L., и *Erucastrum galli-cum* (Willd.) O.E. Schulz показали что вероятность данного события наиболее высокая в паре *Brassica napus* L.–*Brassica rapa* L. и составляет от 7 до 14 % в различных вариантах опыта. Вероятность образования гибридов *Brassica napus* L. с другими видами стремится к нулю (Warwick et al., 2003).

Исследования популяции *Brassica rapa*, в состав которой входили трансгенные растения, устойчивые к гербицидам, в течение ряда поколений показали, что в отсутствии отбора за 3 года частота встречаемости трансгенных форм сократилась в 40 раз (Warwick et al., 2008).

Таким образом, наибольшего внимания заслуживает изучение рисков, связанных с утечкой трансгенов к нетрансгенным родственным формам растений. В этой связи актуальным является поиск моделей для оценки

Поступила в редакцию 28.05.2015
Принята к публикации 01.06.2015

возможных отсроченных экологических рисков. Одной из них можно считать природно-трансгенные растения. Исследуя их филогению, можно проанализировать, насколько вероятна передача трансгенов и их закрепление в геномах родственных форм, а также исследовать особенности изменения нуклеотидных последовательностей в отсутствие действия отбора и под его действием. В настоящее время природно-трансгенные растения описаны в пределах родов *Nicotiana*, *Linaria* и *Ipomea*. Они содержат в своих геномах последовательности, гомологичные Т-ДНК *Agrobacterium* spp.

Рассмотрим подробнее эти рода растений и обсудим возможности их использования для изучения отсроченных экологических рисков ГМО.

Т-ДНК в растениях *Nicotiana*

В 1983 году Уайт с соавторами (White et al., 1983) обнаружили Т-ДНК подобную последовательность в геноме нетрансформированного *Nicotiana glauca*. Обнаруженная последовательность имела сходство более чем 80 % с Т-ДНК *Agrobacterium rhizogenes* и была названа кл (клеточная)Т-ДНК. Растения табака имели нормальный фенотип, при этом клТ-ДНК присутствовала во всех исследованных растениях данного вида (White et al., 1983). Гибридизацией по Саузерну было показано, что кл-ДНК содержит последовательности ORFs 11 (*rolB*), 12 (*rolC*), 13, 14, и 15 (*rolD*), которые были названы *NgrolB*, *NgrolC*, *NgORF13*, *NgORF14* и *NgrolD* соответственно. Кл-ДНК была представлена несовершенными инвертированными повторами, которые содержали одну копию *NgrolB* гена и по две копии остальных генов. Повторы, гомологичные Т-ДНК *A. rhizogenes*, названные левым и правым «плечём» простираются приблизительно на 10 kb. Фёрнер с соавторами исследовал *Nicotiana glauca*, собранные в географически удаленных районах. Методом гибридизации по Саузерну авторы показали присутствие кл-Т-ДНК во всех исследованных образцах. *N. glauca*. (Furner I. J. et al, 1986).

После данного открытия встал вопрос, существуют ли другие виды *Nicotiana*, содержащие Т-ДНК. Род *Nicotiana* является одним из крупнейших родов пасленовых и содержит 75 видов, которые характеризуются широким спектром вариаций морфологии их вегетативных и генеративных органов (Clarkson et al., 2004). Ряд видов *Nicotiana* представляют собой результат межвидовой гибридизации, что усложняет построение филогении этого рода. Гудспид предположили, что существуют две различные группы видов *Nicotiana*, возникшие из двух исконных линий *prepetunioid* и *precestroid*. Он предположил, что базовое число хромосом рода было 12, и подчеркнул роль удвоения хромосом и гибридизации в эволюции рода. Гудспид разделил *Nicotiana* на три подрода: *Rustica*, *Tabacum* и *Petunioides*, и 14 секций (Goodspeed, 1954). С тех пор, количество подродов *Nicotiana* осталось неизменным, в то время как коли-

чество и состав секций был пересмотрен (Clarkson et al., 2004). Приблизительно 75 % видов табака происходят из Америки и 25 % видов из Австралии (Goodspeed, 1954; Clarkson et al., 2004).

Разным группами исследователей были охарактеризованы виды из всех подродов *Nicotiana*.

Фёрнер с соавторами исследовали 17 видов *Nicotiana* на наличие Т-ДНК и обнаружили ее в 6 видах *N. glauca*, *N. otophora*, *N. tomentosiformis*, *N. tomentosa*, *N. benavidesii*, *N. tabacum*. В геноме *N. tabacum* последовательности, гомологичные *rol* генам *A. rhizogenes*, были названы *trol* гены, или *tORF* (Meyer A. D. et al, 1995, Frundt C. et al, 1998). Была выдвинута гипотеза возникновения этих генов в эволюции рода *Nicotiana* благодаря горизонтальному переносу генов.

Интриери и Буйатти проанализировали распространение и последовательности *rol* генов у большого числа видов рода *Nicotiana*. Была сделана попытка проследить эволюцию *rol* генов у рода *Nicotiana* и оценить их влияние дифференцировку видов этого рода (Intrieri M. C., Buiatti M., 2001).

Для обнаружения присутствия *rol* генов авторами был использован ПЦР анализ. ДНК выделяли из тканей листа и амплифицировали с использованием ПЦР праймеров, последовательности которых находились на границах кодирующей последовательности каждого из четырех генов. То есть с их помощью можно было амплифицировать полноразмерный ген. Важно отметить, что есть определенные противоречия между данными Фёрнера с соавторами (Furner et al., 1986) и результатами Интриери и Буйатти (Intrieri, Buiatti, 2001). Например, Интриери и Буйатти (Intrieri, Buiatti, 2001) показали, что клТ-ДНК присутствует в *N. debneyi* и *N. cordifolia*. Фёрнер с соавторами (Furner et al., 1986) не обнаружили Т-ДНК в этих видах.

Развитие методов геномного секвенирования принесло новые знания в отношении привнесенных в растения агробактериальных последовательностей (Chen et al., 2014). С привлечением этих методов было показано, что в геноме *N. tomentosiformis* присутствует четыре вставки клТ-ДНК, перенесенные туда из различных штаммов *Agrobacterium*. Каждая из них представляет собой несовершенный инвертированный повтор. Вставка, названная ТА, похожа на часть Т-ДНК *A. rhizogenes* 1724 микимопинового типа, но имеет необычные гены *orf14* и *mis*. ТВ несет фрагмент подобный участку Т-ДНК штамма 1724 микимопинового типа: *orf14-mis* и область, контролирующую синтез маннопина и агропина (*mas2'-mas1'-ags*). Ген *mas2'* кодирует активный фермент. ТС сходна с левой частью последовательности штамма А4 *A. rhizogenes* но также содержит последовательность гена сходного с геном октописинтазы *ostopine synthase-like (ocl)* и с-подобные гены, характерные для *A. tumefaciens*. TD имеет множественные перестройки фрагмента Т-ДНК, сходного с правой частью TL-ДНК

штамма A4, и включает ген, подобный orf14 и ген неизвестной функции — orf511 (Chen et al., 2014).

Исследование родственных видов показало присутствие обширных вставок Т-ДНК в геномах *N. tabacum* и *N. otophora*. У *N. tabacum* сорта Vasma/Xanthi выявлена протяженная делеция в центральной части последова-

тельности ТА и отсутствие ТС. У *N. otophora* не выявлено последовательностей ТА, ТВ и TD, но обнаружена другая клТ-ДНК — ТЕ, представляющая собой сложную смесь участков, похожих на Т-ДНК *A. vitis*, *A. tumefaciens* и *A. rhizogenes*. Сведения о Т-ДНК в разных видах табака обобщены в таблице 1.

Таблица 1

Т-ДНК в различных видах *Nicotiana*

Подвид	Секция*	Виды	Гены Т-ДНК	Ссылки
<i>Rustica</i>	<i>Paniculatae</i>	<i>N. paniculata</i>	—	2, 5
		<i>N. knightiana</i>	—	2, 5
		<i>N. solanifolia</i>	—	5
		<i>N. benavidesii</i>	+ (<i>rolC</i>)	2, 5
		<i>N. cordifolia</i>	+ (<i>rolB-ORF14</i>)	2, 5
		<i>N. raimondi</i>	—	5
	<i>Rusticae</i>	<i>N. rustica</i>	—	2, 5
<i>Tabacum</i>	<i>Tomentosae</i>	<i>N. tomentosa</i>	+ (<i>orf3-mis, ags-mas1'-mas2', orf2, ocl, c, orf15, orf511</i>)	2, 4, 6
		<i>N. tomentosiformis</i>	+ (<i>orf3-mis, ags-mas1'-mas2', orf2, ocl, c, orf15, orf511</i>)	2, 4, 5, 6
		<i>N. otophora</i>	+ (<i>orf2-rolB, rolC-ORF14, mas1, mas2, iaaM, iaaH, acs, vis</i>)	2, 5, 6
		<i>N. kawakamii</i>	+ (<i>orf3-mis, ags-mas1'-mas2', orf2, ocl, c, orf15, orf511</i>)	6
		<i>N. setchelli</i>	+ (<i>rolC</i>)	2
	<i>Nicotiana</i>	<i>N. tabacum</i>	+ (<i>orf3-mis, ags-mas1'-mas2', c, orf15, orf511</i>)	2, 4, 5, 6
<i>Petunioides</i>	<i>Undulatae</i>	<i>N. glutinosa</i>	—	2, 5
		<i>N. undulata</i>	—	5
		<i>N. arentsii</i>	+ (<i>rolC</i>)	5
	<i>Trigonophyllae</i>	<i>N. trigonophylla</i>	—	5
	<i>Sylvestris</i>	<i>N. sylvestris</i>	—	5
	<i>Alatae</i>	<i>N. langsdorffi</i>	—	2, 5
		<i>N. alata</i>	—	5
		<i>N. longiflora</i>	—	5
		<i>N. forgetiana</i>	—	5
		<i>N. sanderae</i>	—	5
		<i>N. plumbaginifolia</i>	—	5
		<i>Repandae</i>	<i>N. nesophila</i>	—
	<i>N. stocktonii</i>		—	5
	<i>N. repanda</i>		—	5
	<i>N. nudicaulis</i>		—	5
	<i>Noctiflorae</i>	<i>N. noctiflora</i>	—	5
		<i>N. glauca</i> *	+ (<i>rolB-mis</i>)	1, 2, 3, 4
	<i>Petunioides</i>	<i>N. acuminata</i>	(<i>rolC</i>)	5
		<i>N. pauciflora</i>	—	5
		<i>N. attenuata</i>	—	5
	<i>Bigelovianae</i>	<i>N. bigelovi</i>	+ (<i>rolB</i>)	5
	<i>Polydiclae</i>	<i>N. clevelandii</i>	—	5
		<i>N. umbratica</i>	—	5
<i>N. gossei</i>		+ (<i>rolC</i>)	5	
<i>N. rotundifolia</i>		—	5	
<i>N. suaveolens</i>		+ (<i>rolC</i>)	5	
<i>N. exigua</i>		+ (<i>rolC</i>)	5	
<i>N. goodspeedii</i>		—	5	

* — секции *Nicotiana*, согласно Knapp et al. (2004); 1 — White et al. (1983); 2 — Furner et al., 1986; 3 — Aoki et al., 1994; 4 — Suzuki et al., 2002; 5 — Intriери and Buiatti, 2001; 6 — Chen et al., 2014

Таким образом, к настоящему времени клТ-ДНК обнаружена в пределах каждого подрода *Nicotiana* у американских и австралийских видов (Goodspeed, 1954).

T-ДНК в геномах растений рода Linaria

Вторым описанным в литературе родом растений у представителей которого выявлены последовательности агробактериального происхождения является *Linaria*. В ходе массового скрининга более сотни видов двудольных растений на наличие Т-ДНК-подобных последовательностей методом РВ-ПЦР были обнаружены онкогенноподобные последовательности Т-ДНК *A. rhizogenes* в геноме *L. vulgaris*. Для исследования структуры Т-ДНК был применен метод прогулки по хромосоме, который показал, что геном *L. vulgaris* содержит две копии клТ-ДНК, которые организованы как несовершенный прямой повтор. Анализ копий клТ-ДНК показал, что они обе содержат последовательности, аналогичные генам: *orf2*, *orf3*, *ORF8*, *rolA*, *rolB*, *ORF13*, *ORF14* и *mis*. Левая копия является более протяженной и содержит еще ген агроиноринсинтазы (*acs*) (Matveeva et al., 2012).

L. vulgaris является одним из видов произрастающих в большей части Европы и Северной Азии, и в настоящее время распространена в Северной Америке как инвазивный вид. Это многолетнее растение со стержневой корневой системой и с длинными ползучими побегами. Род *Linaria* относится к семейству Plantaginaceae (Губанов и др., 2003, 2004).

Льнянки (*Linaria* Mill.) представляют собой крупнейший род в трибе *Antirrhineae*. Род *Linaria* включает около 150 видов широко распространенных в Палеарктике, но наибольшее разнообразие представителей рода сосредоточено в Средиземноморье. Возникновение рода относят к эпохе Миоцена перед Мессинским кризисом солености (Fernandez-Mazuecos and Vargas, 2011; Hsu et al., 1977). Согласно последней классификации род *Linaria* включает 7 секций (*Linaria*, *Speciosae*, *Diffusae*, *Supinae*, *Pelisserianae*, *Versicolores*, и *Macrocentrum*) (Sutton, 1988).

Было показано, что клТ-ДНК присутствует в ряде видов льнянок, принадлежащих к секциям *Linaria* и *Speciosae*. У видов за пределами этих секций клТ-ДНК на данный момент не обнаружена. (Matveeva, Lutova, 2014).

Таким образом, природно-трансгенные растения были выявлены не только в пределах рода *Nicotiana*, но и среди представителей рода *Linaria*.

T-ДНК в геноме Ipomoea batatas [L.]

В ходе создания малых интерферирующих РНК и siРНК у *Ipomoea batatas* [L.] были выявлены последовательности агробактериального происхождения (Knydt et al., 2015). С помощью комплекса методов, включающих ПЦР, блот-гибридизацию по Саузерну, конструирование скрининг и секвенирование библиотек ВАС

клонов было выявлено 2 типа вставок клТ-ДНК. Вставка первого типа содержала четыре открытые рамки считывания (ОРС), гомологичные генам триптофан-2-монооксигеназы (*iaaM*), индол-3-ацетамида гидролазы (*iaaH*), С-белка (*C-Prot*), и агроцинопин синтазы (*acs*) *Agrobacterium* spp. *IbT-ДНК1* была обнаружена во всех исследованных 291 культурных разновидностях растений батата (представляющих собой гексаплоидные формы *Ipomoea batatas*) и не была обнаружена в близкородственных диких формах (тетраплоидном *Ipomoea batatas*, *I. tabascanana*, и диплоидах *I. triloba* и *I. trifida*). *IbT-ДНК2* содержит по меньшей мере пять ОРС со значительным уровнем сходства с генами *orf14*, *orf17n*, *rolB*, *rolC*, *orf13* и *orf18* *A. rhizogenes*. *IbT-ДНК2* была обнаружена в 45 из 217 генотипов, которые включали как культивируемые, так и дикорастущие виды различного географического происхождения.

Таким образом, у батата Т-ДНК в геноме является признаком, приобретенным в ходе доместикации (Knydt et al., 2015). Это открытие имеет особую важность, поскольку это первая природно-трансгенная культура, которую люди используют в пищу тысячелетиями без вреда собственному здоровью.

Природно-трансгенные растения для изучения возможности переопыления ГМО с нетрансгенными растениями

Если предположить, что трансгены легко мигрируют посредством перекрестного опыления в родственные таксономические группы, тогда Т-ДНК, присутствующие в табаке, льнянках и батате тысячелетия, или даже миллионы лет, должны распространяться среди родственных видов посредством межвидовой гибридизации. Исследования Т-ДНК-содержащих видов может дать ценную информацию относительно вероятности утечки трансгенов и закрепления их в ходе эволюции. Для этого необходимы филогенетические исследования данных родов. Если трансгенные виды образуют клады в различных частях филогенетического дерева и при этом структура и сайты инсерции Т-ДНК в геном растения совпадают в пределах клады, но различаются между ними, можно говорить о независимых актах трансформации в эволюции рода. Если в различных частях филогенетического дерева присутствуют виды с Т-ДНК сходной структуры, а сайты ее инсерции в геном совпадают, можно говорить о последствиях утечки трансгенов.

Описанные к настоящему моменту природно-трансгенные льнянки образуют монофилетическую группу (Matveeva, Lutova, 2014), поэтому не могут быть использованы в такой работе, в то время как табак и батат могут дать ценную информацию по данному вопросу.

К сожалению, относительно интеграции в геном Т-ДНК у батата известно мало. *IbT-ДНК1* охарактеризована подробно и по структуре и в отношении локализации в геноме. Однако эта вставка присутствует во всех

культурных разновидностях батата, отсутствует у их диких родственников. Следовательно, формы со вставкой образуют монофилетическую группу. За ее пределами *IbT*-ДНК1 не выявлено. *IbT*-ДНК2 охарактеризована слабее, но именно она распространена только в некоторых разновидностях диких и культурных бататов (Kundt et al., 2015), а значит, в последствии может открыть много интересного в отношении того, как появлялись трансгены в разных группах растений в ходе эволюции рода.

Наиболее подробно охарактеризована филогения рода *Nicotiana* и распространение Т-ДНК у различных форм табака. Исследования в этом направлении были начаты около 15 лет назад, когда вышли статьи Интриери и Буйатти (Intrieri, Buiatti, 2001) и Сузуки с соавторами (Suzuki et al., 2002).

Интриери и Буйатти (Intrieri, Buiatti, 2001) анализировали характер изменения нуклеотидных последовательностей ключевых онкогенов у различных видов *Nicotiana*. Анализ нуклеотидных последовательностей показал, что у *N. cordifolia* и *N. glauca* гены *rolB*, *rolC*, *orf13* и *orf14* имеют высокий уровень сходства (93,5–98,5%). Авторы сделали вывод, что данные виды являются родственными, что согласуется с предположением Гудспиды (Goodspeed, 1954), что оба вида должны быть включены в подрод *Rustica* сек. *Paniculatae*. Однако современные филогенетические исследования с использованием молекулярных маркеров относят вид *N. glauca* в секцию *Noctiflorae* подрода *Petunioides* (Knapp et al., 2004). Если принять эту филогенетическую систему и исходить из представлений о высоком сходстве нуклеотидных последовательностей привнесенных трансгенов, то можно говорить о передаче трансгенов между представителями различных секций путем переопыления. Однако более поздние исследования (Chen et al., 2014) хотя и подтвердили наличие в геноме *N. cordifolia* Т-ДНК, но указали на то, что нуклеотидные последовательности ключевых онкогенов отличаются от описанных ранее и их уровень сходства с таковыми у *N. glauca* составляет всего 72%. То есть гипотеза передачи трансгенов между *N. glauca* и *N. cordifolia* за счет переопыления может быть отвергнута.

Высокий уровень сходства нуклеотидных последовательностей Т-ДНК обнаружен между представителями подрода *Tabacum*. Если же сравнивать последовательности клТ-ДНК между представителями подродов *Petunioides* и *Tabacum*, то уровень сходства последовательностей оказывается низким и составляет от 66,3 до 68,6% для *rolC* и от 70,2 до 82,9% для *ORF13* (Intrieri, Buiatti, 2001).

Сузуки с соавторами (Suzuki et al., 2002) исследовали сайты локализации клеточной Т-ДНК в геномах *Nicotiana* методом блот-гибридизации по Саузерну. Их данные можно было интерпретировать с точки зрения независимых актов трансформации представителей подродов *Petunioides* и *Tabacum*. Нашей группой (Хафизова и др., 2014) была со-

здана тест-система, которая методом ПЦР в реальном времени позволяет выявить виды, которые содержат Т-ДНК такой же структуры (в приграничной зоне) и локализации в геноме, что и у *N. glauca*. При проверке *N. tabacum* с использованием данной тест-системы были получены данные о различных местах локализации клТ-ДНК у *N. glauca* и *N. tabacum*. Таким образом, можно говорить о независимых актах трансформации данных видов.

Более глубокое исследование клТ-ДНК методом геномного секвенирования позволяет сказать, что трансформация табаков происходила неоднократно. Поскольку все вставки Т-ДНК представляют собой повторы, можно приблизительно оценить их возраст. Так, самой древней считают вставку ТС, за ней следует клТ-ДНК из *N. glauca*, далее ТВ, ТD и ТA (рис. 1).

В трех сортах *N. tabacum* выявлена полная делеция ТС, включая приблизительно 1 тпо растительной ДНК с каждой стороны. Эта делеция могла возникнуть у растения *N. tomentosiformis* давшего начало *N. tabacum* или могла произойти после гибридизации *N. tomentosiformis* × *N. sylvestris*. Известно, что *N. tabacum* терял различные

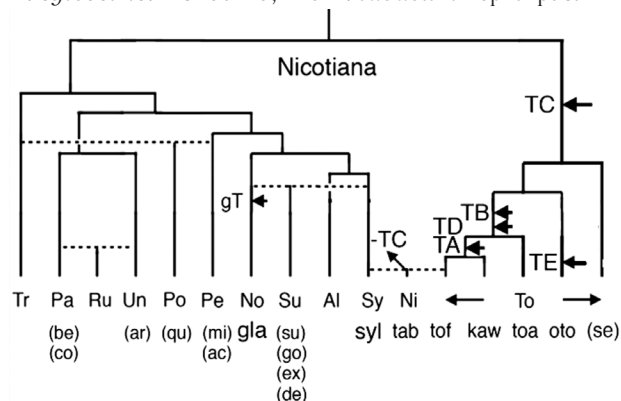


Рис. 1. Модель, иллюстрирующая независимые акты трансформации *Nicotiana* (Chen et al., 2014). Инсерция ТС была первой в эволюции, за ней шли gT, ТВ, 4 ТD и ТA. Относительное время инсерции ТЕ точно не определить, но она имела место после отделения ветви *tomentosiformis/tabacum-kawakamii-tomentosa* от ветви *otophora* поскольку *N. sylvestris*, *N. tomentosiformis* и *N. tabacum* имеют немодифицированный сайт инсерции ТЕ. ТС полностью вана в ветви *tabacum* (-ТС), ТA частично делетирована в некоторых сортах *N. tabacum*. Аббревиатуры секций: Tr: *Trigonophyllae*, Pa: *Paniculatae*, Ru: *Rusticae*, Un: *Undulatae*, Po: *Polydicliae*, Pe: *Petunioides*, No: *Noctiflorae*, Su: *Suaveolentes*, Al: *Alatae*, Sy: *Sylvestres*, Ni: *Nicotiana*, To: *Tomentosae* (секция *Repandae* не показана). Аббревиатуры видов: be: *benavidesii*, co: *cordifolia*, ar: *arentsii*, qu: *quadriovalvis*, mi: *miersii*, ac: *acuminata*, gla: *glauca*, su: *suaveolens*, go: *gossei*, ex: *exigua*, de: *debneyi*, syl: *sylvestris*, tab: *tabacum*, tof: *tomentosiformis*, kaw: *kawakamii*, toa: *tomentosa*, oto: *otophora*, se: *setchellii*. Пунктирные линии указывают на акты межвидовой гибридизации. Рисунок показывает относительное время (не в масштабе)

родительские последовательности после события гибридизации (Volkov et al., 1999, Lim et al., 2004, Lim et al., 2007, Petit et al., 2007, Renny-Byfield et al., 2011 цит по Chen et al., 2014). Потери ДНК были также отмечены у синтетических гибридов *N. tomentosiformis* × *N. sylvestris* (Skalicka et al., 2005, Renny-Byfield et al., 2012 цит по Chen et al., 2014). Центральная часть ТА района была потеряна у восточных сортов *N. tabacum*. Таким образом, клТ-ДНК в отсутствие отбора претерпела сильные изменения. В то же время, отдельные гены сохранили свою функциональность. У табаков это прежде всего *rolC* и *orf13* (Furner et al., 1986, Mohajjel-Shoja et al., 2011, Chen et al., 2014).

В целом, можно отметить накопление все большего количества фактов в пользу неоднократной трансформации агробактериальной Т-ДНК представителей рода *Nicotiana*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Природно-трансгенные растения были описаны более 30 лет назад. Однако в последние годы интерес к ним сильно возрос. До 2012 года в литературе был известен только один четко задокументированный пример горизонтального переноса генов от агробактерий к растениям *Nicotiana*. В 2012 году в нашей лаборатории был описан новый пример горизонтального переноса генов от агробактерий к растениям рода *Linaria* (Matveeva et al., 2012), в 2015 Т-ДНК обнаружена у растений рода *Ipomea* (Kundt et al., 2015).

Представители данных родов могут рассматриваться в качестве моделей для изучения отсроченных экологических рисков возделывания ГМО. Интересно отметить, что у всех детально охарактеризованных видов *Nicotiana* и *Linaria* клТ-ДНК организована в виде инвертированных или прямых повторов (чего стараются избегать при получении коммерческих линий ГМО) (Chen et al., 2014; Furner et al., 1986; Matveeva et al., 2012). Почему такие формы получили преимущество, еще предстоит выяснить.

К сожалению, на данный момент в литературе не достаточно информации в отношении разнообразия вставок Т-ДНК и их распространения среди представителей родов *Linaria* и *Ipomea*. Представители рода *Nicotiana* изучены гораздо глубже. Анализ распространения Т-ДНК в пределах данного рода можно интерпретировать с точки зрения нескольких независимых актов трансформации. Убедительных фактов в пользу распространения трансгенов между видами путем переопыления не выявлено. Вместе с тем, межвидовая гибридизация, как фактор видообразования имела место в эволюции рода. При этом клТ-ДНК передавалась новым видам и претерпевала перестройки.

Работа выполнена при поддержке грантов СПбГУ 1.39.315.2014 и 0.37.526.2013, РФФИ 14-04-01480-а.

ЛИТЕРАТУРА

1. Губанов И.А., Киселева К.В., Новиков В.С., Тихомиров В.Н. (2003, 2004) Иллюстрированный определитель растений средней полосы России. Москва. Т. 2, 3.
2. Хафизова Г.В., Матвеева Т.В. (2014) Изучение сайтов интеграции клеточной Т-ДНК у представителей различных секций рода *Nicotiana*. Молодежный научный форум: естественные и медицинские науки. Электронный сборник статей по материалам XV–XVI студенческой международной заочной научно-практической конференции. — Москва: Изд. «МЦНО». 8–9 (15). URL: [http://www.nauchforum.ru/archive/MNF_nature/8-9\(15\).pdf](http://www.nauchforum.ru/archive/MNF_nature/8-9(15).pdf).
3. Beckie H. J., Warwick S. I., Nair H., Seguin-Swartz G. (2003) Gene flow in commercial fields of herbicide-resistant canola (*Brassica napus*) // Ecological applications. 13 (5): 1276–1294.
4. Bing D. J., Downey R. K., Rakow G. F. W. (1996) Hybridizations among *Brassica napus*, *B. rapa* and *B. juncea* and their two weedy relatives *B. nigra* and *Sinapis arvensis* under open pollination conditions in the field. Plant Breeding. V. 115 (6): P. 470–473.
5. Brigulla M., Wackernagel W. (2010) Molecular aspects of gene transfer and foreign DNA acquisition in prokaryotes with regard to safety issues. Appl Microbiol Biotechnol. V. 86 (4): P. 1027–41.
6. Chen K., Dorlhac de Borne F., Szegedi E., Otten L. (2014) Deep sequencing of the ancestral tobacco species *Nicotiana tomentosiformis* reveals multiple T-DNA inserts and a complex evolutionary history of natural transformation in the genus *Nicotiana*. Plant J. V. 80 (4): P. 669–682
7. Chevre A. M., Eber F., Baranger A., Kerlan M. C., Barret P., Vallée P., Renard M. (1994). Interspecific gene flow as a component of risk assessment for transgenic Brassicas. ISHS Brassica Symposium-IX Crucifer Genetics Workshop. V. 407: P. 169–180.
8. Chevre A. M., Eber F., Darmency H., Fleury A., Picault H., Letanneur J. C. (2000) Assessment of interspecific hybridization between transgenic oilseed rape and wild radish under normal agronomic conditions. Theoretical and Applied Genetics. V. 100 (8): P. 1233–1239.
9. Clarkson J. J., Knapp S., Garcia V. F., Olmstead R. G., Leitch A. R. and Chase M. W. (2004) Phylogenetic relationships in *Nicotiana* (Solanaceae) inferred from multiple plastid DNA regions. Mol. Phylogenet. Evol. V. 33: P. 75–90.
10. De Block M., Herrera-Estrella L., Van Montagu M., Schell, J. And Zambryski, P. (1984) Expression of foreign genes in regenerated plants and their progeny. EMBO J. V. 3: P. 1681–1689.
11. Dunfield K. E., Germida J. J. (2004). Impact of genetically modified crops on soil and plant-associated microbial communities. J. Environ. Qual. V. 33: P. 806–815.

12. EFSA GMO Panel Working Group on Animal Feeding Trials. (2008) Safety and nutritional assessment of GM plants and derived food and feed: the role of animal feeding trials. *Food Chem Toxicol. Suppl* 1. S2–70.
13. Fernandez-Mazuecos M., and Vargas P. (2011). Historical Isolation versus Recent Long-Distance Connections between Europe and Africa in Bifid Toadflaxes (*Linaria* sect. *Versicolores*). *Plos One*. V. 6: P. e22234.
14. Fründt C., Meyer A. D., Ichikawa T., Meins F. (1998a) A tobacco homologue of the Ri-plasmid *orf13* gene causes cell proliferation in carrot root discs. *Mol. Gen. Genet.* V. 259: P. 559–568.
15. Furner, I.J., Huffman, G.A., Amasino, R.M., Garfinkel, D.J., Gordon, M.P. and Nester, E.W. (1986) An *Agrobacterium* transformation in the evolution of the genus *Nicotiana*. *Nature*. V. 319: P. 422–427.
16. Giovannetti M. 2003. The ecological risks of transgenic plants. *Riv. Biol.* V. 96, (2): P. 207–223.
17. Goodspeed T.H. (1954) The genus *Nicotiana*. *Chron. Bot.* V. 16: P. 102–135.
18. Herrera-Estrella L, Depicker A, Van Montagu M, Schell J. (1983) Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature*. V. 1303: P. 209–213.
19. Hsu K.J., Montadert L., Bernoulli D., Cita M.B., Erickson A. (1977). History of the Mediterranean salinity crisis. *Nature*. V. 267: P. 399–403.
20. Intrieri, M.C. and Buiatti, M. (2001) The horizontal transfer of *Agrobacterium rhizogenes* genes and the evolution of the genus *Nicotiana*. *Mol. Phylogenet. Evol.* V. 20: P. 100–110.
21. ISAAA Brief 44–2012: Slides & Tables (<http://isaaa.org/resources/publications/briefs/44/pptslides/default.asp>). Дата обращения 1.05.2015.
22. Knapp, S., Chase, M.W. and Clarkson, J.J. (2004) Nomenclatural changes and a new sectional classification in *Nicotiana* (Solanaceae). *Taxon*. V. 53: P. 73–82.
23. Kyndt T., Quispe D., Zhai H., Jarret R., Ghislain M., Liu Q., Gheysen G., Kreuze J.F. (2015) The genome of cultivated sweet potato contains *Agrobacterium* T-DNAs with expressed genes: An example of a naturally transgenic food crop PNAS (112). P. 5844–5849.
24. Matveeva T.V., Bogomaz D.I., Pavlova O.A., Nester E.W., Lutova L.A. (2012) Horizontal gene transfer from genus *Agrobacterium* to the plant *Linaria* in nature. *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 25: P. 1542–1551.
25. Matveeva T.V., Lutova L.A. (2014) Horizontal gene transfer from *Agrobacterium* to plants. *Frontiers in Plant Science*. V. 5: P. 326.
26. Meyer A.D., Ichikawa T., Meins F. (1995) Horizontal gene transfer: regulated expression of a tobacco homologue of the *Agrobacterium rhizogenes rolC* gene. *Mol. Gen. Genet.* V. 249: P. 265–273.
27. Mohajjel-Shoja H., Clément B., Perot J., Alioua M., Otten L. (2011) Biological activity of the *Agrobacterium rhizogenes*-derived *rolC* gene of *Nicotiana tabacum* and its functional relation to other *plast* genes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 24: P. 44–53.
28. Sutton D.A. (1988). A revision of the tribe Antirrhineae. London. UK: Oxford University Press.
29. Suzuki K., Yamashita I., Tanaka N. (2002) Tobacco plants were transformed by *Agrobacterium rhizogenes* infection during their evolution. *Plant J.* V. 32: P. 775–787.
30. UNEP (2006). Soil Biodiversity Key to Environmentally Friendly Agriculture. UNEP Press Release. 22.03.2006. Available at <http://www.unep.org/Documents.Multilingual/Default.asp?DocumentID=471&ArticleID=5236&l=en>. Дата обращения 10.05.2015.
31. Warwick S.I., Legyre A., Simard M.J., James T. (2008) Do escaped transgenes persist in nature? The case of an herbicide resistance transgene in a weedy Brassica rapa population. *Mol Ecol.* V. 17: P. 1387–1395.
32. Warwick S.I., Simard M.-J., Legere A., Beckie H.J., Braun L., Zhu B., Mason P., Seguin-Swartz G., Stewart C.N. Jr (2003) Hybridization between transgenic *Brassica napus* L. and its wild relatives: *Brassica rapa* L., *Raphanus raphanistrum* L., *Sinapis arvensis* L., and *Erucastrum gallicum* (Willd.) O.E. Schulz // *Theoretical and Applied Genetics*. V. 107: P. 528–539.
33. White F., Garfinkel D., Huffman G.A., Gordon M., Nester E.W. (1983) Sequences homologous to *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA in the genomes of uninfected plants. *Nature*. V. 301: P. 348–350.

NATURALLY TRANSGENIC PLANTS AS A MODEL FOR THE STUDY OF DELAYED ENVIRONMENTAL RISKS OF CULTIVATION OF GMOS

Matveeva T. V.

✿ **SUMMARY:** The development of genetic engineering raises the question of biosafety of transgenic organisms. The greatest concerns about the negative effects of GMO cultivation are reduced to possible leakage of transgenes through cross-pollination of non-transgenic closely related forms by transgenic pollen. Naturally transgenic plants are species which have been subjected to *Agrobacterium*-mediated transformation and retained the T-DNA-like sequence in their genomes. These species can be considered as a model for the study of delayed environmental risks associated with leakage of transgenes. The review is devoted to this problem.

✿ **KEY WORDS:** natural and transgenic plants; T-DNA; the spread of transgenes.

✿ REFERENCES (TRANSLITERATED)

1. Gubanov I.A., Kiseleva K.V., Novikov V.S., Tikhomirov V.N. (2003, 2004) Illyustrirovannyi opredelitel' rasteniy sredney polosy Rosssii [Illustrated keys to plants of an average strip of Russia]. Moskva. T. 2, 3.

2. Khafizova G. V., Matveeva T. V. (2014) Izuchenie saytov integratsii kletchnoy T-DNK u predstaviteley razlichnykh seksiy roda *Nicotiana*. Molodezhnyy nauchnyy forum: estestvennye i meditsinskie nauki [The study of the integration sites of the cellular T-DNA in different sections in the genus *Nicotiana*. Youth scientific forum: natural and medical science]. Elektronnyy sbornik statey po materialam KhV–KhVI studencheskoy mezhdunarodnoy zaochnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii. — Moskva: Izd. «MTsNO». 8–9 (15). URL: [http://www.nauchforum.ru/archive/MNF_nature/8–9 \(15\).pdf](http://www.nauchforum.ru/archive/MNF_nature/8–9 (15).pdf).
3. Beckie H. J., Warwick S. I., Nair H., Seguin-Swartz G. (2003) Gene flow in commercial fields of herbicide-resistant canola (*Brassica napus*) // Ecological applications. 13 (5): 1276–1294.
4. Bing D. J., Downey R. K., Rakow G. F. W. (1996) Hybridizations among *Brassica napus*, *B. rapa* and *B. juncea* and their two weedy relatives *B. nigra* and *Sinapis arvensis* under open pollination conditions in the field. Plant Breeding. V. 115 (6): P. 470–473.
5. Brigulla M., Wackernagel W. (2010) Molecular aspects of gene transfer and foreign DNA acquisition in prokaryotes with regard to safety issues. Appl Microbiol Biotechnol. V. 86 (4): P. 1027–41.
6. Chen K., Dorlhac de Borne F., Szegedi E., Otten L. (2014) Deep sequencing of the ancestral tobacco species *Nicotiana tomentosiformis* reveals multiple T-DNA inserts and a complex evolutionary history of natural transformation in the genus *Nicotiana*. Plant J. V. 80 (4): P. 669–682
7. Chevre A. M., Eber F., Baranger A., Kerlan M. C., Barret P., Vallée P., Renard M. (1994). Interspecific gene flow as a component of risk assessment for transgenic Brassicas. ISHS Brassica Symposium-IX Crucifer Genetics Workshop. V. 407: P. 169–180.
8. Chevre A. M., Eber F., Darmency H., Fleury A., Picault H., Letanneur J. C. (2000) Assessment of interspecific hybridization between transgenic oilseed rape and wild radish under normal agronomic conditions. Theoretical and Applied Genetics. V. 100 (8): P. 1233–1239.
9. Clarkson J. J., Knapp S., Garcia V. F., Olmstead R. G., Leitch A. R. and Chase M. W. (2004) Phylogenetic relationships in *Nicotiana* (Solanaceae) inferred from multiple plastid DNA regions. Mol. Phylogenet. Evol. V. 33: P. 75–90.
10. De Block M., Herrera-Estrella L., Van Montagu M., Schell, J. And Zambryski, P. (1984) Expression of foreign genes in regenerated plants and their progeny. EMBO J. V. 3: P. 1681–1689.
11. Dunfield K. E., Germida J. J. (2004). Impact of genetically modified crops on soil and plant-associated microbial communities. J. Environ. Qual. V. 33: P. 806–815.
12. EFSA GMO Panel Working Group on Animal Feeding Trials. (2008) Safety and nutritional assessment of GM plants and derived food and feed: the role of animal feeding trials. Food Chem Toxicol. Suppl 1. S2–70.
13. Fernandez-Mazuecos M., and Vargas P. (2011). Historical Isolation versus Recent Long-Distance Connections between Europe and Africa in Bifid Toadflaxes (*Linaria* sect. *Versicolores*). Plos One. V. 6: P. e22234.
14. Fründt C., Meyer A. D., Ichikawa T., Meins F. (1998a) A tobacco homologue of the Ri-plasmid *orf13* gene causes cell proliferation in carrot root discs. Mol. Gen. Genet. V. 259: P. 559–568.
15. Furner, I. J., Huffman, G. A., Amasino, R. M., Garfinkel, D. J., Gordon, M. P. and Nester, E. W. (1986) An *Agrobacterium* transformation in the evolution of the genus *Nicotiana*. Nature. V. 319: P. 422–427.
16. Giovannetti M. 2003. The ecological risks of transgenic plants. Riv. Biol. V. 96, (2): P. 207–223.
17. Goodspeed T. H. (1954) The genus *Nicotiana*. Chron. Bot. V. 16: P. 102–135.
18. Herrera-Estrella L, Depicker A, Van Montagu M, Schell J. (1983) Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. Nature. V. 1303: P. 209–213.
19. Hsu K. J., Montadert L., Bernoulli D., Cita M. B., Erickson A. (1977). History of the Mediterranean salinity crisis. Nature. V. 267: P. 399–403.
20. Intriери, M. C. and Buiatti, M. (2001) The horizontal transfer of *Agrobacterium rhizogenes* genes and the evolution of the genus *Nicotiana*. Mol. Phylogenet. Evol. V. 20: P. 100–110.
21. ISAAA Brief 44–2012: Slides & Tables ([http:// isaaa.org/resources/publications/briefs/44/pptslides/default.asp](http://isaaa.org/resources/publications/briefs/44/pptslides/default.asp)). Дата обращения 1.05.2015.
22. Knapp, S., Chase, M. W. and Clarkson, J. J. (2004) Nomenclatural changes and a new sectional classification in *Nicotiana* (Solanaceae). Taxon. V. 53: P. 73–82.
23. Kyndt T., Quispe D., Zhai H., Jarret R., Ghislain M., Liu Q., Gheysen G., Kreuze J. F. (2015) The genome of cultivated sweet potato contains *Agrobacterium* T-DNAs with expressed genes: An example of a naturally transgenic food crop PNAS (112). P. 5844–5849.
24. Matveeva T. V., Bogomaz D. I., Pavlova O. A., Nester E. W., Lutova L. A. (2012) Horizontal gene transfer from genus *Agrobacterium* to the plant *Linaria* in nature. Mol. Plant-Microbe Interact. V. 25: P. 1542–1551.
25. Matveeva T. V., Lutova L. A. (2014) Horizontal gene transfer from *Agrobacterium* to plants. Frontiers in Plant Science. V. 5: P. 326.
26. Meyer A. D., Ichikawa T., Meins F. (1995) Horizontal gene transfer: regulated expression of a tobacco homologue of the *Agrobacterium rhizogenes rolC* gene. Mol. Gen. Genet. V. 249: P. 265–273.
27. Mohajjel-Shoja H., Clément B., Perot J., Alioua M., Otten L. (2011) Biological activity of the *Agrobacterium rhizogenes*-derived *trnK* gene of *Nicotiana ta-*

- bacum* and its functional relation to other *plast* genes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 24: P. 44–53.
28. Sutton D. A. (1988). A revision of the tribe Antirrhineae. London. UK: Oxford University Press.
29. Suzuki K., Yamashita I., Tanaka N. (2002) Tobacco plants were transformed by *Agrobacterium rhizogenes* infection during their evolution. *Plant J.* V. 32: P. 775–787.
30. UNEP (2006). Soil Biodiversity Key to Environmentally Friendly Agriculture. UNEP Press Release. 22.03.2006. Available at <http://www.unep.org/Documents.Multilingual/Default.asp?DocumentID=471&ArticleID=5236&l=en>. Дата обращения 10.05.2015.
31. Warwick S.I., Legyre A., Simard M.J., James T. (2008) Do escaped transgenes persist in nature? The case of an herbicide resistance transgene in a weedy *Brassica rapa* population. *Mol Ecol.* V. 17: P. 1387–1395.
32. Warwick S.I., Simard M.-J., Legere A., Beckie H.J., Braun L., Zhu B., Mason P., Seguin-Swartz G., Stewart C.N. Jr (2003) Hybridization between transgenic *Brassica napus* L. and its wild relatives: *Brassica rapa* L., *Raphanus raphanistrum* L., *Sinapis arvensis* L., and *Erucastrum gallicum* (Willd.) O.E. Schulz // *Theoretical and Applied Genetics.* V. 107: P. 528–539.
33. White F., Garfinkel D., Huffman G.A., Gordon M., Nester E.W. (1983) Sequences homologous to *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA in the genomes of uninfected plants. *Nature.* V. 301: P. 348–350.

✉ Информация об авторе

Матвеева Татьяна Валерьевна — профессор, кафедра генетики и биотехнологии. СПбГУ. 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7/9. E-mail: radishlet@gmail.com.

Matveeva Tat'yana Valer'yevna — Professor, Dept. Of Genetics and Biotechnology. St. Petersburg State University. 199034, Saint Petersburg, Universitetskaya nab., 7/9, Russia. E-mail: radishlet@gmail.com.