

## ОЦІНКА АСПЕКТІВ БІОБЕЗПЕКИ ПРИ ПРОВЕДЕННІ РОБІТ ПО ГЕНЕТИЧНІЙ ТРАНСФОРМАЦІЇ РОСЛИН

Г. П. ПЕТЮХ, Н. В. КАРАЧИНСЬКА

*Національний авіаційний університет, м. Київ*

*В статті обговорюється можливість виникнення ризиків неконтрольованого перенесення генів при проведенні робіт по генетичній трансформації рослин, що є складовою частиною в системі питань про біобезпеку використання генетично модифікованих організмів при їх вивільненні в навколишнє середовище. З метою перевірки подібного феномену автори провели пошукові дослідження по вивченню ймовірності такого перенесення генів з генетичних конструкцій, які знаходяться в клітинах бактеріальних штаблів, що використовували для трансформації рослин, зокрема *Agrobacterium tumefaciens*, у вигляді плазмідної ДНК, та визначають толерантність до антибіотиків, до клітин інших ґрунтових бактерій, зокрема, *Pseudomonas fluorescens*. В експериментах були отримані бактеріальні клітини з перехресною толерантністю до антибіотиків, що дозволяє припустити наявність феномену перенесення генів по горизонтальному механізму. Отриманий результат дозволяє припустити можливість появи непередбачуваних наслідків в агроєкосистемі в результаті дрейфу генів з генетичних конструкцій до мікробіоти ґрунту.*

**Ключові слова:** *біобезпека, генетична трансформація рослин, толерантність до антибіотиків, горизонтальне перенесення генів.*

**Актуальність питання.** Використання сучасних методів для створення нових господарсько-цінних форм рослин є головним напрямком в отриманні так званих «Рослин майбутнього» (програма «Future Plants»). Такий підхід використовується не тільки при створенні високо продуктивних та адаптивних

основних сільськогосподарських культур, а й при використанні так званих «біофармацевтичних рослин», які включені до програм «Biofarming».

Основними методичними прийомами та техніками в таких підходах для створення біотехрослин є методи генетичної трансформації. Відповідно до доповіді міжнародного агентства ISAAA в 2019 році генетично модифіковані рослини вирощувалися в 29 країнах світу, а площі під біотехкультурами в світі займали 190.4 млн. гектарів [1].

Як правило, більшість процедур використання методів генетичної трансформації рослин економічно важливих культур засновані на спільному їх культивуванні (co-cultivation) з бактеріальними клітинами *Agrobacterium tumefaciens*, що несуть різні конструкції векторів з чужорідними генами за використання культури *in vitro*. В той же час, за свідченнями різних авторів, певна частка бактеріальних клітин після процедур трансформації може перебувати у рослинах-трансформантах у вигляді персистуючих форм [2, 3].

При проведенні процедур по генетичній трансформації клітини бактеріального штаму – донора генетичної конструкції мають загинути після передачі плазмідної конструкції в клітини рослин. Це досягається шляхом додавання в поживне середовище при кокультивуванні антибіотика в концентрації, летальній для бактеріальних клітин. Але, насправді, дія такого антибіотика виявляє не летальний ефект, а лише бактеріостатичний ефект, що призводить не до загибелі бактеріальних клітин, а лише до зупинки їх росту і розмноження [4, 5], що, в свою чергу, не зупиняє часткове їх проникнення в рослинні тканини з подальшим відтворенням як персистуючих форм [6]. Подібні форми *A. tumefaciens*, які містили генетичну конструкцію, виявляли в трансформованих культурах *Solanum*, *Brassica* і *Rubus*, при цьому спостерігалась підвищена кількість популяцій бактерій через 12-16 тижнів після трансформації і навіть через 6 місяців після трансформації біля 50 % отриманих рослин містили бактеріальні клітини з даною векторною конструкцією [7].

Враховуючи факт існування персистуючих форм бактерій, зокрема, бактерій-донорів генетичних конструкцій виникають ризики можливого ефекту

неконтрольованого вивільнення елементів генетичних конструкцій в навколишнє середовище шляхом їх горизонтального переносу до ґрунтової мікробіоти, що може призвести до неконтрольованого забруднення агроєкосистем. Подібна точка зору має право на існування, оскільки були отримані факти можливого горизонтального переносу фрагментів генетичних конструкцій від рекомбінантного штаму *Pseudomonas fluorescens* до ґрунтових бактерій [8, 9].

**Матеріали і методи досліджень.** В основу наших досліджень була покладена гіпотеза можливості виникнення ризиків неконтрольованого горизонтального переносу генів при проведенні процедур по генетичній трансформації рослин.

Для реалізації поставленої мети нами було вирішено провести оцінку можливості отримання бактеріальних клітин з ознаками перехресної толерантності до антибіотиків, характерними як для представників ґрунтової мікробіоти, так і для бактеріального штаму *Agrobacterium tumefaciens*, який використовується для перенесення генетичних конструкцій в геноми вищих рослин.

З цією метою при проведенні досліджень ми використали рекомбінантний бактеріальний штам *Agrobacterium tumefaciens* pGV2260 (p35SGUSint), який характеризувався природною толерантністю до антибіотика рифампіцину. Крім того, в клітинах даного штаму підтримували генетичну конструкцію (плазміда p35SGUSINT) [10], яка містила селективний ген толерантності до антибіотика канаміцину, репортерний ген *gus*, а також містила послідовність інтронної ділянки, що дозволяло експресуватися даному гену лише в клітинах рослин картоплі та унеможлиблювало його експресію в бактеріальних клітинах. Даний рекомбінантний штам *A. tumefaciens* нами був також використаний для генетичної трансформації рослин картоплі.

Для оцінки можливості горизонтального перенесення генів генетичної конструкції використовували ґрунтову бактерію *Pseudomonas fluorescens* 7769 з колекції відділу фітопатогенних мікроорганізмів Інституту мікробіології і

вірусології ім. Д.К.Заболотного НАНУ. Даний бактеріальний штам характеризувався природною толерантністю до антибіотика цефотаксиму.

Бактеріальні культури вирощували на рідких поживних середовищах Лурія-Бертрані (LB) при високих концентраціях антибіотиків, зокрема клітини *A. tumefaciens* вирощували при додаванні в поживне середовище 100 мг/л канаміцину і 100 мг/л рифампіцину, а клітини *P. fluorescens* – на середовищі при додаванні 100 мг/л цефотаксиму. Вирощували штами на термостатичній качалці при температурі 28<sup>0</sup>С зі швидкістю обертання 150-200 об/хв., протягом 1–3 доби. Бактеріальну суспензію центрифугували і ресуспендували у стерильній воді для отримання робочої концентрації 8–9 x10<sup>8</sup> кл/мл.

**Результати досліджень і обговорення.** Оскільки в нашому дослідженні проводили оцінку толерантності бактеріальних клітин до антибіотиків канаміцину (рекомбінантний штам *A.tumefaciens GV2260*) та цефотаксиму (природний штам *P.fluorescens 7769*), спочатку провели тестові оцінки кожного зі штамів на реакцію до різних концентрацій кожного з антибіотиків (табл. 1).

Таблиця 1

**Чутливість *A.tumefaciens GV2260* і *P.fluorescens 7769* до канаміцину і цефотаксиму на агаризованих поживних середовищах**

Штам	Канаміцин, мг/л			Цефотаксим, мг/л	
	1	5	10	1	5
<i>A.tumefaciens GV2260</i>	+	+	+	+/-	-
<i>P.fluorescens 7769</i>	+	+/-	-	+	+

Як видно з таблиці, дані штами суттєво відрізнялися по рівню толерантності до досліджених антибіотиків. Низькі концентрації антибіотиків дещо знижують рівні життєздатності бактеріальних клітин, але вже при концентраціях 10 мг/л і вище канаміцину для клітин *P.fluorescens 7769* був відсутній ріст клітин і вони гинули, а клітини *A.tumefaciens GV2260* нормально росли і при концентраціях канаміцину до 100 мг/л – та це і не дивно, оскільки

клітини даного штаму містили плазмиду з відповідним геном, який визначав толерантність до даного антибіотику.

Щодо антибіотика цефотаксиму, спостерігали протилежну реакцію для даних штамів: при концентраціях 5 мг/л і вище у клітин штаму *A.tumefaciens* GV2260 був відсутній ріст і в подальшому вони гинули, а у клітин *P.fluorescens* 7769 спостерігали нормальний ріст і формування колоній при концентраціях 5 мг/л і вище – що також зрозуміло, оскільки в ДНК даного штаму присутній ген, який визначає толерантність до даного антибіотика.

Перед проведенням досліджень по спільному кокультивуванню клітин різних бактеріальних штамів була проведена діагностична оцінка на відсутність антагоністичної активності між досліджуваними штамми методом радіальних штрихів за Єгоровим [11].

Результати тестування рівня антагоністичної активності культур *A.tumefaciens* GV2260 до *P.fluorescens* 7769 продемонстрували відсутність пригнічення взаємного росту клітин даних штамів при спільному культивуванні, що дало нам змогу провести подальші експерименти, використовуючи процедуру кокультивування клітин цих штамів.

З метою оцінки можливості отримання крос-толерантності до антибіотиків для бактеріальних штамів використаний такий підхід: суспензії клітин обох штамів вирощували протягом 1–3 діб на рідких поживних середовищах з додаванням окремих антибіотиків (контрольні варіанти) та на середовищах з додаванням одночасно канаміцину і цефотаксиму у різних концентраціях та на різних субстратах. Після такого субкультивування популяції клітин висівали на тверді поживні середовища, які також містили у своєму складі дані антибіотики, але з різними наборами концентрацій. В подальшому, оцінювали здатність клітин до росту і формування колоній на таких середовищах.

Після декількох пасажів на селективних середовищах проводили ідентифікацію штамів за використання середовищ з високим рівнями концентрацій антибіотиків та проведенням в подальшому молекулярного аналізу штамів для їх ідентифікації.

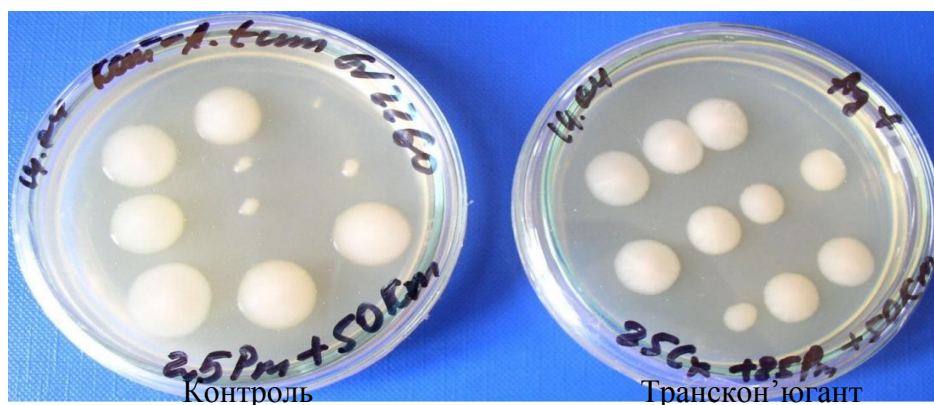
В не стресових умовах (контрольні варіанти) за всіх протестованих концентрацій канаміцину і цефотаксиму відмічали інтенсивний ріст колоній *A.tumefaciens* GV2260 і *P. fluorescens* 7769. В той же час в стресових умовах при додаванні в середовище обох антибіотиків (варіант 1) при культивуванні кожного із штамів спостерігали ріст колоній лише при концентрації 1 мг/л канаміцину і цефотаксиму. При збільшенні концентрації ріст культур припинявся.

При культивуванні даних штамів в стресових умовах з додаванням 50 мг/л цефотаксиму (варіант 2) колонії не утворювались, що свідчило про відсутність життєздатних клітин *P. fluorescens* 7769. Колонії бактерій, що утворились у стресових умовах варіанту 2 належать до рекомбінантних клітин *A.tumefaciens* GV2260 по стійкості до цефотаксиму. Разом з тим при зменшенні концентрації цефотаксиму до 25 мг/л і нижче спостерігали утворення колоній, які належать до *A.tumefaciens* GV2260. При перенесенні отриманих рекомбінантних клітини на середовища з рифампіцином (25 мг/л) і канаміцином (50 мг/л) також спостерігали ріст культур. Це ще раз підтвердило наше припущення, що отримані рекомбінантні клітини належать до *A. tumefaciens*.

Ми підраховали частоту появи колоній клітин з перехресною толерантністю до обох антибіотиків, що дозволило нам встановити частоту переносу генів толерантності. Метод висіву на селективні середовища, дозволив оцінити частоту утворення толерантних до цефотаксиму колоній *A.tumefaciens* GV2260, яка становила від  $4 \times 10^{-6}$  до  $7,5 \times 10^{-8}$ . Отже, можна припустити, що відбулася передача гену толерантності до цефотаксиму від *P.fluorescens* 7769 *A.tumefaciens* GV2260 до за умов їх кокультивування в стресових умовах на середовищі, в складі якого було 10 мг/л канаміцину і цефотаксиму.

За результатами досліджень встановлено, що існує ймовірність утворення клітин транскон'югантів *A. tumefaciens* GV2260 і *P. fluorescens* 7769, які характеризуються перехресною толерантністю до антибіотиків канаміцину і цефотаксиму.

При подальшому аналізі для ідентифікації бактеріальних штамів *A. tumefaciens* GV2260 використали поєднання культивування клітинних колоній, які демонстрували перехресну толерантність до високих концентрацій (100 мг/л) канаміцину та невисоких концентрацій (25 мг/л) цефотаксиму на середовищах з додаванням не селективного для даного штаму антибіотику рифампіцину у високих концентраціях (рис 1.).

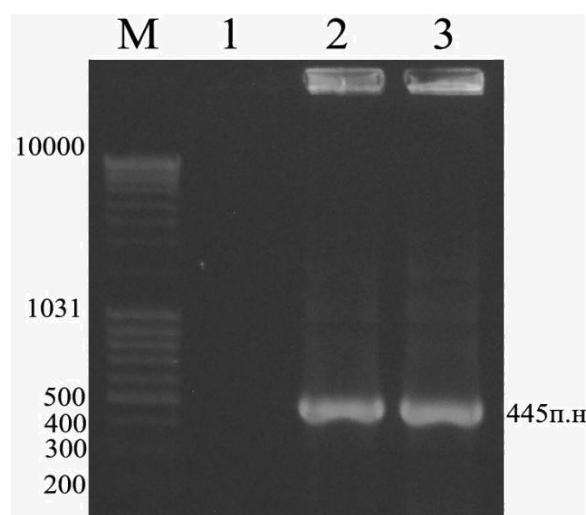


**Рис. 1. Ідентифікація транскон'югантів *A.tumefaciens* на селективному середовищі з додаванням рифампіцину**

Як видно з даного рисунка, на середовищі з додаванням антибіотиків канаміцину і рифампіцину у високих концентраціях спостерігається нормальний ріст бактеріальних клітин. Результати тестування отриманих нами транскон'югантів *A.tumefaciens* GV 2260 на селективному середовищі з рифампіцином свідчать про їх приналежність до *A.tumefaciens*.

При кокультивування живих клітин культури *P.fluorescens* 7769 з вбитими клітинами *A.tumefaciens* GV 2260 в ризосферному ґрунті після вирощування трансгенних рослин утворювались клітини *P.fluorescens* 7769, які характеризувалися толерантністю до канаміцину при концентрації до 30 мг/л даного антибіотика. Частота їх утворення складала  $6,2 \times 10^{-4}$  кл/г сухого ґрунту при внесенні  $10^9$  клітин реципієнтів *P.fluorescens* 7769 на 1 г сухого ґрунту. Утворення форм *P.fluorescens* 7769, стійких до канаміцину, не виявлено при взаємодії живих клітин *P.fluorescens* 7769 з вбитими клітинами *A.tumefaciens* GV 2260 в ризосферному ґрунті з вегетуючими трансгенними рослинами картоплі та на агаризованих поживних середовищах.

З метою встановлення родової приналежності культури транскон'югантів до *P.fluorescens* 7769, здійснено ПЛР-аналіз ДНК бактерії з специфічними праймерами PSM для бактерій роду *Pseudomonas* [12]. На ДНК-матриці бактерії отримано специфічний продукт 445 п.н., який відповідає варіабельній ділянці гена малої субодиниці рибосомної РНК роду *Pseudomonas*, що підтверджувало існування клітин штаму *P.fluorescens* 7769 (рис.2.).



**Рис. 2. Ідентифікація родової приналежності до роду *Pseudomonas* відібраних клітин транскон'югантів *P.fluorescens* 7769. М – молекулярний маркер маси фрагментів ДНК, 1 – контроль реакції, 2 – позитивний контроль (колекційний зразок *P.fluorescens* 7769), 3 – експериментальний зразок - транскон'югант *P.fluorescens* 7769**

## ВИСНОВКИ

Отримані дані дозволяють припустити можливість неконтрольованого перенесення спадкової інформації від рекомбінантних форм бактерій, які використовуються при генетичній трансформації рослин, до природної ґрунтової мікробіоти по горизонтальному механізму перенесення генетичної інформації, що слід відносити до екологічних ризиків використання трансгенних технологій при отриманні трансгенних (генетично модифікованих) форм рослин та їх використання у відкритих природних системах.



## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ:

1. <https://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/55/executivesummary/default.asp>
2. *Agrobacterium*-mediated transformation of five wild *Solanum* species using in vitro microtubers / A. Kumar, M. Miller, P. Whitty [et.al.] // Plant-Cell-Reports. – 1995. – 14, №5. – P. 324–328.
3. Identification of *Agrobacterium* spp. present within *Brassica napus* seed by Taqman PCR - implications for GM screening procedures / S.A. Weller, S.A. Simpkins, D.E. Stead [et.al.] // Arch. Microbiol. – 2002. – V.178. – P.338–343.
4. Leifert C. Microbial hazards in plant tissue and cell cultures / C. Leifert, A.C. Cassells // *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. – 2001. – V.37. – P.133–138.
5. Leifert C. Quality assurance systems for plant cell and tissue culture: the problem of latent persistence of bacterial pathogens and *Agrobacterium*-based transformation vector systems / C. Leifert // *Acta Hort*. – 2000. – V.530. – P.87–91.
6. Van der Hoeven C. Latent agrobacteria detected in transgenic plants / C. van der Hoeven, A. Dietz, J. Landsmann // *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd.* – 1991. – №43. – P.249–251.
7. A risk assessment study of plant genetic transformation using *Agrobacterium* and implications for analysis of transgenic plants / C. Barrett, E. Cobb, R. Mc Nicol [et al.] // *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* – 1997. – V.47. – P.135–144.
8. Lorenz M.G. Natural genetic transformation of *Pseudomonas stutzeri* by sand-dust sorbed DNA / M.G. Lorenz, W. Wackernagel // *Arch. Microbiol.* – 1990. – V.154. – P.380–385.
9. Smit E. Plasmid transfer from *Pseudomonas fluorescens* to indigenous bacteria in soil using bacteriophage fR2f for donor counter selection / E. Smit, J.D. van Elsas, J.A. van Veen, W.M. de Vos // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1991. – V.57. – P.3482–3488.
10. Construction of an intron-containing marker gene: Splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium* mediated

plant transformation / G. Vancanneyt, R. Schmidt, A. O'Connor-Sanchez [et.al] // Mol. Gen. Genet. – 1990. – V.220. – P. 245–250.

11. Егоров Н.С. Выделение микробов-антагонистов и биологические методы учета их антибиотической активности / Н.С. Егоров – М.: МГУ, 1957. – 78 с.

12. Quantitative selective PCR of 16S ribosomal DNA correlates well with selective agar plating in describing population dynamics of indigenous *Pseudomonas spp.* in soil hot spots / K. Jonsen, Q. Enger, C. Jacobsen [et.al.] // App. Envir. Microbiol. – 1999. – V.65, №4. – P.1786–1789.

## **ОЦЕНКА АСПЕКТОВ БИОБЕЗОПАСНОСТИ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ РАБОТ ПО ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ РАСТЕНИЙ**

**Г.П. ПЕТЮХ, Н.В. КАРАЧИНСКАЯ**

Национальный авиационный университет, г. Киев

В статье обсуждается возможность возникновения рисков неконтролируемого переноса генов при проведении работ по генетической трансформации растений, которая является составной частью в системе вопросов о биобезопасности использования генетически модифицированных организмов при их высвобождении в окружающую среду. С целью проверки подобного феномена авторы провели поисковые исследования по изучению вероятности такого переноса генов из генетических конструкций, находящихся в клетках бактериальных штаммов, используемых для трансформации растений, в частности *Agrobacterium tumefaciens*, в виде плазмидной ДНК, и определяют толерантность к антибиотикам, к клеткам других грунтовых бактерий, в частности, *Pseudomonas fluorescens*. В экспериментах были получены бактериальные клетки с перекрестной толерантностью к антибиотикам, что позволяет предположить наличие феномена переноса генов по горизонтальному механизму. Полученный результат позволяет

предположить возможность появления непредсказуемых последствий в агроэкосистеме в результате дрейфа генов из генетических конструкций в микробиоту почвы.

**Ключевые слова:** биобезопасность, генетическая трансформация растений, толерантность к антибиотикам, горизонтальный перенос генов.

## **ASSESSMENT OF BIOSAFETY ASPECTS DURING PROCEDURES OF GENETIC TRANSFORMATION OF PLANTS**

**G. P. PETIUKH, N. V. KARACHINSKA**

National Aviation University, Kyiv

The article discusses the possibility of risks of uncontrolled gene transfer during procedures of plant genetic transformation, which is an integral part of the system of biosafety of the use of genetically modified organisms in their release into the environment. In order to test this phenomenon, the authors conducted research to study the likelihood of such transfer of genes from genetic constructs found in cells of bacterial strains used to transform plants, in particular *Agrobacterium tumefaciens*, in the form of plasmid DNA and determine tolerance to antibiotics and other bacteria cells, in particular *Pseudomonas fluorescens*. Bacterial cells with cross-tolerance to antibiotics were obtained in the experiments, which suggest the presence of the phenomenon of gene transfer by a horizontal mechanism. The obtained result suggests the possibility of unpredictable consequences in the agroecosystems as a result of gene drift from genetic constructs to soil microbiota.

**Keywords:** biosafety, genetic transformation of plants, tolerance to antibiotics, horizontal gene transfer.