

Transfer gena odgovornih za tolerantnost na herbicide sa useva na divlje srodnike

Dragana Božić, Darko Stojićević, Markola Saulić, Sava Vrbničanin*
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Nemanjina 6, 11080 Beograd-Zemun
*e-mail: sava@agrif.bg.ac.rs

REZIME

Usled sve učestalijeg gajenja useva tolerantnih na herbicide, bilo da su dobijeni klasičnim metodama oplemenjivanja (netransgeni usevi) ili primenom genetičkog inženjeringa (transgeni tj. genetički modifikovani (GM) usevi), interesovanje za proučavanje transfera gena sa useva na divlje srodnike je poraslo u poslednje dve decenije. U ovom radu je dat pregled rizika povezanih sa gajenjem useva tolerantnih na herbicide, pri čemu je najviše pažnje posvećeno transferu gena odgovornih za tolerantnost putem polena. Takođe, sagledane su i potencijalne barijere za sprečavanje ove pojave. S obzirom da se kod nas gaje hibridi suncokreta tolerantni na imidazolinone i tribenuron-metil, razmotreni su i potencijalni rizici od transfera gena sa ovih hibrida na divlje srodnike.

Proučavanje transfera gena odgovornih za tolerantnost na herbicide do sada je uglavnom bilo ograničeno na hibridno potomstvo F1 generacije. Ipak, istraživanja u ovoj oblasti u budućnosti treba usmeriti na proučavanje dugotrajnih efekata ove pojave.

Ključne reči: barijera, hibridi usev-korov, polen, rizik, transfer gena, usevi tolerantni na herbicide.

UVOD

Osnovni cilj oplemenjivanja biljaka je stvaranje novih sorti i hibrida što omogućava prevazilaženje različitih problema u savremenoj poljoprivrednoj proizvodnji. Najnovija dostignuća u molekularnoj genetici, biohemiji i fiziologiji stvorila su mogućnost za stvaranje biljaka sa dodatnim agronomskim svojstvima kao što su tolerantnost na herbicide, rezistentnost na patogene ili štetočine, tolerantnost na sušu, parametri koji poboljšavaju kvalitet hrane i dr.

Zahvaljujući saznanjima o mehanizmu i primarnom mestu delovanja herbicida na molekularnom nivou, kao i razvoju novih metoda biotehnologije, omogućeno je oplemenjivanje useva tolerantnih na herbicide. Rad na stvaranju ovakvih useva započeo je vrlo brzo nakon

otkrića prvih korova rezistentnih na herbicide, a prvi tolerantni usevi su bili tolerantni na inhibitore biosinteze aminokiselina. U početku su za oplemenjivanje ovakvih useva korišćene metode kao što su selekcija individualnih ćelija u kulturi tkiva, mutageneza i upotreba rezistentnih populacija korova kao polaznog materijala za stvaranje useva tolerantnih prema sulfonilureama i imidazolinonima. Do sada je stvoren veći broj hibrida različitih gajenih vrsta tolerantnih prema herbicidima ALS (acetolaktat sintetaza) inhibitorima, ali i drugim herbicidima. S obzirom da je tolerantnost useva prema imidazolinonima i sulfonilureama postignuta tradicionalnim metodama oplemenjivanja biljaka i da u ove useve nisu introdukovani strani geni (iz druge vrste organizama npr. bakterija), ova grupa tolerantnih useva se ne smatra transgenim i prihvaćena je u zemljama u kojima nije dozvoljeno gajenje GM (genetički modifikovanih) useva.

Uprkos brojnim prednostima gajenja useva tolerantnih na herbicide, njihovo gajenje je praćeno i izvesnim rizicima. Kada su u pitanju rizici povezani sa suzbijanjem korova u ovakvim usevima, jedan od najznačajnijih je rizik od transfera gena odgovornih za tolerantnost sa ovih useva na divlje srodnike ili samonikle useve iste vrste. Naime, kao rezultat transfera ovih gena, nastaju hibridi usev-korov rezistentni na herbicide čije suzbijanje predstavlja veliki problem za poljoprivrednu proizvodnju. Stoga je cilj ovog rada bio da se sagledaju rizici i mogući putevi transfera gena odgovornih za tolerantnost na herbicide sa tolerantnih useva na divlje srodnike, kao i potencijalne barijere za sprečavanje ove pojave. Posebna pažnja je posvećena rizicima od transfera gena sa hibrida suncokreta tolerantnih na herbicide ALS inhibitore na korovski suncokret, usled toga što se ovi hibridi gaje i kod nas, a u područjima njihovog gajenja su konstatovane velike populacije korovskog suncokreta (weedy sunflower, odnosno *Helianthus annuus* L.).

Rizici povezani sa gajenjem useva tolerantnih na herbicide

Brojne prednosti gajenja useva tolerantnih na herbicide su očigledne, ali, gajenje ovih useva, bilo da su dobijeni metodama genetičkog inženjeringa ili klasičnim metodama oplemenjivanja, praćeno je rizicima koji mogu biti sa ozbiljnim ekonomskim i ekološkim posledicama. Za razliku od tolerantnih useva dobijenih klasičnim metodama oplemenjivanja, gajenje GM useva je izazvalo mnogo polemika, koje se odnose na zdravstvenu bezbednost proizvoda dobijenih od ovih useva i ugroženost životne sredine. Najveću zabrinutost izazivaju pitanja koja se odnose na: 1) direktne i indirektne toksične efekte produkata modifikovanih gena na neciljane organizme (npr. opravišavače kao što su pčele i drugi insekti), 2) uticaj modifikovanih gena i GM biljaka na biodiverzitet, ekosistem i zemljišne mikroorganizme, i 3) transfer gena sa GM useva na njihove divlje srodnike i ekološke posledice te pojave (Oliveira i sar., 2007; Mercer i sar., 2007). Nasuprot tome, u slučaju useva tolerantnih prema herbicidima koji su dobijeni klasičnim metodama oplemenjivanja, najverovatniji rizik je transfer gena na srodne korovske ili divlje vrste (Marshall i sar., 2001; Massinga i sar., 2003), pri čemu nastaju tzv. »super korovi« rezistentni na herbicide. Takođe, značajan rizik predstavlja i pojava samoniklih

populacija tolerantnih useva, koje praktično predstavljaju rezistentne korove. Osim toga, postoji i opasnost od povećanog selekcionog pritiska na korove usled upotrebe ograničenog broja herbicida u ovim usevima, što će najverovatnije dovesti do pojačane selekcije rezistentnih korovskih populacija. Osim navedenih, moguće su još neke negativne posledice gajenja ovih useva i to: geni odgovorni za tolerantnost se mogu preneti u konvencionalne useve, mogu se izmeniti osobine neciljanih biljnih vrsta, može se narušiti biodiverzitet, takođe može doći do narušavanja životne sredine usled izmena u tehnologiji gajenja useva, kao i do izmena osobina zemljišta i drugih posledica.

Usled opasnosti od navedenih rizika, ubrzo posle uvođenja u proizvodnju useva tolerantnih na pojedine herbicide, intenzivirana su istraživanja ovih rizika u cilju osmišljavanja strategija za njihovo sprečavanje ili odlaganje ovakvih pojava, kao i za rešavanje problema koji bi proistekli ako do njih dođe. U vezi s tim, dosta se radi na: praćenju transfera gena sa tolerantnih useva na divlje srodnike (Marshall i sar., 2001; Massinga i sar., 2003; Burke i sar., 2002; Lu i Yang, 2009), ispitivanjima njihove stabilnosti u divljim srodniciima koji u tom slučaju predstavljaju rezistentne korove (Whitton i sar., 1997), proučavanju fitnesa hibrida usev-korov (Marshall i sar., 2001; Mercer i sar., 2007) i kompetitivnih odnosa između rezistentnih i osetljivih biljaka iste vrste (Marshall i sar., 2001).

Transfer gena sa useva na divlje srodnike

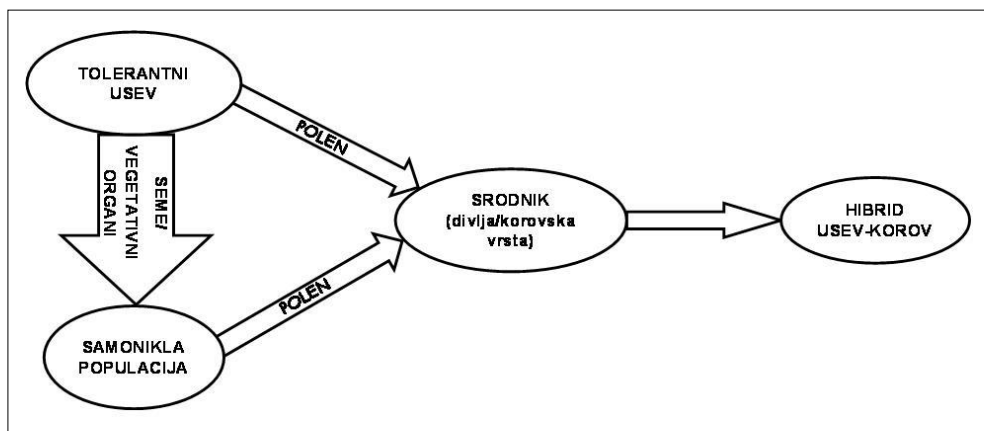
Transfer gena je normalan proces koji se u prirodi neprekidno dešava kako između srodnih gajenih i korovskih/divljih vrsta, tako i između populacija korovskih i/ili divljih vrsta. Na relaciji usev - korov ovaj proces može da se odvija u oba smera, tj. sa useva na korov ili sa korova na usev, a kao posledica toga nastaju hibridne korovske biljke. Mada hibridizacija useva i korova ima značajnu ulogu u evoluciji mnogih korovskih vrsta, ova pojava može dovesti i do izumiranja pojedinih vrsta srodnih usevima ili stvaranja novih formi korova koje su agresivnije i bolje prilagođene na narušenim staništima (Ellstrand i sar., 1999).

Stvaranje useva tolerantnih na herbicide dovelo je do toga da se hibridizacija sve češće shvata kao problem, a naročito kada je u pitanju hibridizacija između GM useva i srodnih vrsta. Naime, u slučaju ovih useva, negativne ekološke posledice naročito dolaze do izražaja kada se transgena tehnologija intenzivno primenjuje u oplemenjivanju useva. Kada trans-geni jednom pređu u populacije divljih ili korovskih vrsta, skoro je nemoguće ukloniti ih iz životne sredine, što im omogućava opstanak i širenje. Proces introdukcije nije jednostavan i dešava se u više koraka koji uključuju nekoliko hibridnih generacija (F1, F2, BC1, BC2 itd.), a posledice ove pojave zavise od prirode trans-gena i fertlnosti hibrida i potomaka. F1 generacija hibrida može imati bolji, isti ili slabiji fitnes od roditelja, pri čemu je česta pojava smanjene fertlnosti jedinki ove generacije, a u velikom broju slučajeva i njihova potpuna sterilnost. Ekološke posledice izazvane transferom gena sa useva na njihove divlje srodnike su određene količinom gena koja se prenosi na divlje ili korovske populacije i fenotipskim osobinama koje ovi geni kontrolišu. Neke od ovih osobina su beznačajne za fitnes divljih srodnika dok ga

druge (tolerantnost prema herbicidima, otpornost na bolesti i tolerantnost na stresne faktore abiotске prirode) uglavnom poboljšavaju. Nasuprot tome, ako introdukovani geni oslabe fitnes divljih srodnika, smanjiće se i njihova invazivnost. Ovaj proces može biti ubrzan povratnim transferom gena (povratnim ukrštanjem) i introdukcijom novih gena iz susednih useva, što na kraju dovodi do izumiranja polaznih populacija divljeg srodnika (Ellstrand i Elam, 1993).

Transfer gena sa tolerantnih useva na divlje srodnike zavisi od više faktora i to: prisustva useva i njegovih bliskih srodnika, njihove biologije i fenologije, stvaranja životno sposobne i fertile F_1 generacije, produkcije fertile uzastopnih generacija, mogućnosti transfera gena, rekombinacije hromozoma i unošenja gena jedne vrste u genom druge usled povratnog ukrštanja, perzistentnosti gena u samoniklim populacijama useva (Jenczewski i sar., 2003). Geni odgovorni za tolerantnost useva prema herbicidima u prirodi se mogu širiti na tri načina (Šema 1), i to posredstvom polena (usled stranooplodnje) (Lu i Yang, 2009; Massinga i sar., 2003; Gutierrez i sar., 2010), posredstvom semena (usled njegovog rasprostiranja) (Arnaud i sar., 2003) i putem vegetativnog razmnožavanja (Jenczewski i sar., 2003)

Transfer gena odgovornih za tolerantnost na herbicide između polno kompatibilnih individua najčešće se odvija posredstvom polena, bilo u okviru iste populacije ili između različitih populacija (Lu i Yang, 2009; Massinga i sar., 2003). Ova pojava zavisi od različitih faktora od koji su najznačajniji uslovi spoljašnje sredine (jačina i pravac vetra, temperatura, intenzitet svetlosti i vlažnost vazduha) i tip vektora koji vrše oprašivanje (Hvarleva i sar., 2009; Lu i Yang, 2009). Osim toga, za transfer gena putem polena presudnu ulogu ima poklapanje cvetanja tolerantnog useva i divljeg srodnika. Eksperimentalni podaci ukazuju na to da je period cvetanja divljih populacija obično duži nego period cvetanja useva, što preklapanje čini verovatnijim (Renno i Winkel, 1996). Tako je utvrđeno da je transfer gena sa gajenog na divlji suncokret u Argentini zavisio od preklapanja vremena cvetanja i prisustva zajedničkih polinatora, pri čemu se zastupljenost hibrida usev-korov u F_1 generaciji kretala od 0,3 do 0,5% (Gutierrez i sar., 2010), pa čak do 33% (Burke i sar., 2002). Takođe, potvrđeno je spontano



Šema 1. Načini stvaranja hibrida usev-korov.

ukrštanje hibrida suncokreta tolerantnog na tribenuron-metil i korovskih biljaka iste vrste, dok je izostalo ukrštanje između hibrida tolerantnog na imazamoks i korovskog suncokreta (Božić i sar., 2009). Preklapanje perioda cvetanja tolerantnog hibrida i korovske populacije je duže trajalo u prvom nego u drugom slučaju. Prenošnje polena sa tolerantnih useva na srodne vrste zavisi i od međusobne razdaljine, veličine populacija iz kojih polen potiče i onih u koje dospeva, gustine biljaka, broja cvetova po biljci i pozicije divljih srodnika u odnosu na usev (Gotz i Ammer, 2000).

U brojnim istraživanjima potvrđena je mogućnost transfera gena odgovornih za tolerantnost na herbicide sa useva na njihove divlje srodnike. Tako su Zhang i sar. (2006) na 22 lokaliteta ispitali transfer gena odgovornih za tolerantnost na imazetapir sa tolerantnih kultivara pirinča (*Oryza sativa* L.) na korovsku formu ove vrste. Ovi istraživači su utvrdili da se transfer gena dešava, pri čemu je na većini lokaliteta (18) u F1 generaciji bilo zastupljeno manje od 1% hibridnog potomstva, dok je na preostala 4 lokaliteta taj procenat bio nešto veći, odnosno do 3%. Slično tome, nizak nivo hibridizacije (1-2%) je potvrđen i između pirinča i njegovog divljeg srodnika *Oryza rufipogon* Griff. (Song i sar., 2003). Takođe, Chevre i sar. (2000) su potvrdili nizak nivo hibridizacije između uljane repice (*Brassica napus* L.) tolerantne na herbicide i srodne korovske vrste *Raphanus raphanistrum* L. U ovim istraživanju zastupljenost hibrida usev-korov u F1 generaciji je bila na nivou 10^{-7} do 3×10^{-5} u zavisnosti od pozicije korovske vrste na eksperimentalnoj parceli.

Uprkos tome što se transfer gena sa useva na divlje srodnike intezivno istražuje, nema detaljnih podataka o tome šta se dešava sa genima koji su introdukovani u divlje populacije nakon dužeg vremenskog perioda. Naime, većina ovih istraživanja se završila zaključno sa prvom generacijom hibrida. Ipak, Whitton i sar. (1997) su pokazali da geni poreklom iz gajenog suncokreta mogu da perzistiraju u divljim populacijama preko 5 godina nakon hibridizacije. Takođe, Linder i sar. (1998) su pratili efekte 40-godišnjeg transfera gena sa gajenog suncokreta na divlje populacije iste vrste.

Uloga semena u prenošenju gena odgovornih za tolerantnost na herbicide sa tolerantnih useva na divlje srodnike sastoji se u njegovom prenošenju na nove površine gde nastaju samonikle populacije. Sa ovih populacija geni odgovorni za tolerantnost se prenose posredstvom polena na divlje srodnike. Takođe, hibridi nastali spontanom ukrštanjem tolerantnog useva i divljeg srodnika posredstvom semena se mogu prenositi na nove površine, gde predstavljaju izvor polena koji je nosilac gena odgovornih za tolerantnost.

Za razliku od polena, seme uglavnom ostaje u neposrednoj blizini biljaka sa kojih je opalo i veoma je teško dokazati njegovo rasprostriranje na velike udaljenosti. Malo se zna o rasprostriranju semena useva tolerantnih prema herbicidima, kao i o postojanosti samoniklih populacija koje nastanu iz tog semena. Generalno, rasprostriranje semena useva tolerantnih na herbicide ili hibrida nastalih usled njihovog spontanog ukrštanja sa divljim srodnicima zavisi od bioloških osobina useva, ekoloških uslova, tehnologije gajenja useva i agrotehničkih mera koje se na obradivim površinama primenjuju nakon berbe, odnosno žetve. Ipak, rasprostriranje ovih semena je moguće pratiti u prostoru i u vremenu, pri čemu se njihovo spontano širenje u prostoru često smatra beznačajnim usled toga što je seme većine gajenih biljaka izgubilo

ovu sposobnost. Ipak, rasprostiranje semena je moguće usled prosipanja tokom žetve/berbe, zatim transporta i skladištenja, što omogućava širenje na veoma velike razdaljine. Tako su Arnaud i sar. (2003) potvrdili transfer gena sa šećerne repe (*Beta vulgaris* L.) na divlje srodnike posredstvom semena do čijeg širenja je došlo u procesu transporta zemljišta.

Rasprostiranje semena koja su nosioci gena odgovornih za tolerantnost u vremenu zavisi od osobina dormantnosti i dugovečnosti u zemljišti, kao i od ekoloških zahteva za klijanje. Takođe, treba imati u vidu da osim polena i semena, značajnu ulogu u rasprostiranju biljaka ima i banka, tj. rezerve semena u zemljištu (Raybould, 1999). Naime, kada su u pitanju različite forme šećerne repe (gajena, divlja i korovska), poznato je da formiraju dugovečnu banku semena (Desplanque i sar., 2002), koja tokom dužeg vremenskog perioda može da obezbedi biljke koje su izvor gena odgovornih za tolerantnost na herbicide.

Iz rasutog semena ili semena koje je opalo prilikom žetve tolerantnih useva mogu nastati otporni korovi u narednim usevima. Ovi korovi su u stvari samonikle biljke tolerantnog useva. Samonikle biljke smanjuju prinos i kvalitet useva u kome se nalaze, utiču negativno na kvalitet žetvenog materijala u koji dospevaju i predstavljaju domačine za štetne insekte ili prouzrokovaoče bolesti. Takođe, potomstvo biljaka tolerantnih prema herbicidima može biti izvor polena, koji može da kontaminira useve koji nisu tolerantni prema herbicidima ili da prenese osobine tolerantnosti/rezistentnosti na srodne korove. Suzbijanje samoniklih biljaka koje potiču od useva tolerantnih na herbicide nije moguće u narednim usevima u kojima se ovi herbicidi koriste za suzbijanje korova. Osim toga, kao posledica širenja samoniklih biljaka sa poljoprivrednih na nepoljoprivredne površine mogu se javiti različiti štetni efekti na neciljane organizme, lokalnu autohtonu floru i bioravnotežu ekosistema.

Procena rizika od transfera gena sa tolerantnih useva na divlje srodnike

Procena rizika od transfera gena je procedura koja pomaže da se utvrdi da li će doći do ove pojave i u kom obimu će se javiti, a sve u cilju smanjenja rizika na najmanji mogući nivo. Osim toga, ove procene su značajne i zbog bojazni da će transfer gena odgovornih za tolerantnost prema herbicidima dovesti do povećanja sposobnosti preživljavanja i adaptabilnosti korovskih vrsta u koje su introdukovani. Takođe, smatra se da pojedine biljke zahvaljujući introdukovanim genima mogu poprimiti osobine invazivnih vrsta, usled čega su neophodne procene dugoročnih posledica transfera gena sa useva na divlje srodnike.

Opasnosti od transfera gena odgovornih za tolerantnost na herbicide i ekološke posledica ove pojave treba procenjivati pojedinačno za svaki konkretni slučaj (herbicid, biljku, divlje srodnike i dr.) bez obzira da li je tolerantnost useva postignuta konvencionalnim metodama oplemenjivanja ili primenom metoda genetičkog inženjeringa. Glavni koraci za racionalnu procenu rizika od „bekstva” gena odgovornih za tolerantnost na herbicide i procenu ekoloških posledica ove pojave su razumevanje: (1) transfera gena sa useva na njegove divlje srodnike; (2) ekspresije i nasleđivanja gena u hibridima koji su nastali kao rezultat transfera gena sa useva na divlje srodnike; (3) promena fitnesa divljih srodnika koje su izazvane introdukcijom gena

u njihove pojedine individue i (4) dinamike prenošenja gena sa useva na divlje populacije. Invazivnost hibrida usev-korov koji su nastali kao posledica transfera gena sa tolerantnih useva na divlje srodnike zavisi od svih navedenih činilaca.

Verovatnoća za transfer gena sa useva na njihove divlje srodnike zavisi od genetičkih karakteristika useva i divljeg srodnika, kao i od homologije između njihovih genoma (Jenczewski i sar., 2003). U slučaju kada postoji viši stepen homologije između useva i njegovih divljih srodnika, kao što je slučaj sa *Beta vulgaris* L. × *Beta maritima* L. ili *Raphanus sativus* L. × *Raphanus raphanistrum* L., verovatnoća da će doći do introdukcije prenetih gena je veća. Osim toga, introdukcija gena zavisi i od dela genoma na kome se gen nalazi. Ellstrand i saradnici (1999) su istraživali mogućnost introdukcije gena iz 13 najvažnijih useva u njihove divlje srodnike, pri čemu su utvrdili da 12 ispitivanih useva može da hibridizuje sa svojim divljim srodnicima. Od navedenih 12 useva za 7 su potvrđeni slučajevi introdukcije, dok za ostalih 5 postoji mogućnost da do introdukcije dođe. Takođe, na osnovu potencijalne opasnosti od introgresije transgena u divlje srodnike, Stewart i sar. (2003) su GM useve prema nivou rizika grupisali u 4 kategorije: visok, srednji, nizak i veoma nizak (Tabela 1). Sličnu kategorizaciju pri proceni rizika su koristili i drugi autori: Raybould i Gray (1993), zatim Hancock (2003) i drugi.

Barijere za sprečavanje transfera gena sa tolerantnih useva na divlje srodnike

Da bi se sprečilo ili umanjilo neželjeno prenošenje polena sa useva tolerantnih na herbicide na srodne vrste, koriste se različite barijere, iako ne postoji apsolutna garancija da će na taj način transfer gena biti sprečen. Najčešće barijere su: 1) zaštitni pojasevi od biljaka iste

Tabela 1. Nivo rizika od introgresije gena iz useva u divlje srodnike

Usev	Nivo rizika	Divlji srodnici za koje je potvrđena introgresija gena
Sirak	Visok	<i>Sorghum halepense</i> ; <i>S. almum</i> ; <i>S. propinquum</i>
Uljana repica	Srednji	<i>Brassica rapa</i> ; <i>B. juncea</i> ; <i>B. oleraceae</i> , <i>B. campestris</i> <i>Sinapis arvensis</i> <i>Raphanus raphanistrum</i>
Šećerna repa	Srednji	<i>Beta vulgaris</i> ssp. * <i>Beta vulgaris</i> ssp. <i>maritima</i>
Pšenica	Srednji	<i>Triticum turgidum</i> <i>Aegilops</i> sp. (<i>Aegilops cylindrica</i>)
Suncokret	Srednji	<i>Helianthus</i> sp. (<i>H. annuus</i> * and <i>H. petiolaris</i>)
Lucerka	Srednji	<i>Medicago sativa</i> *
Pirinač	Nizak	<i>Oryza rufipogon</i>
Kukuruz	Nizak	<i>Zea mexicana</i>
Krompir	Veoma nizak	
Soja	Veoma nizak	
Ječam	Veoma nizak	
Pasulj	Veoma nizak	

*Korovske forme gajenih vrsta

ili različitih vrsta, 2) adekvatna razdaljina između useva tolerantnih na herbicide i njihovih srodnika, i 3) muška sterilnost kao genetički mehanizam za sprečavanje transfera gena.

Zaštitni pojasevi od biljaka iste ili različitih vrsta mogu sprečiti transfer gena tako što će fizički zaustaviti polen u slučaju prenošenja vetrom. Takođe, efikasna mera može biti i setva konvencionalnih useva iste vrste koji su poznati kao „hvatači polena“ (pollen traps) u blizini tolerantnih hibrida, a njihova uloga je da privuku insekte oprašivače kako bi na njima ostavili polen. Morris i sar. (1994) su zaključili da je setva „hvatača polena“ između GM i konvencionalnih useva najefikasnija mera za sprečavanje transfera gena. Takođe, Staniland i sar. (2000) su utvrdili da se prenošenje gena putem polena sa uljane repice tolerantne na herbicide rapidno smanjuje sa povećanjem udaljenosti od izvora polena, pri čemu je neophodno prisustvo zaštitnog pojasa ili „hvatača polena“.

Poznato je da se sa povećanjem udaljenosti useva od divljih srodnika smanjuje nivo hibridizacije. Tako su Scheffler i sar. (1993) utvrdili da frekvencija polena poreklom sa transgene uljane repice iznosi 1,5% na udaljenosti od 1 m, dok je na udaljenosti od 47 m bila smanjena na 0,00033%. Takođe, hibrid usev-divlji srodnik je na udaljenosti od 200 m od transgene uljane repice bio zastupljen sa 0,156%, dok je na udaljenosti od 400 m zastupljenost bila 0,0038% (Scheffler i sar., 1995). Ovi podaci mogu biti veoma dragoceni za planiranje prostorne izolacije tolerantnih useva, kako bi se na taj način sprečio transfer gena na divlje srodnike. Tako, Arias i Rieseberg (1994) ističu da izolacioni pojas za suncokret mora da bude veći od 1000 m. Eastham i Sweet (2002) su utvrdili da se polen kukuruza može detektovati na udaljenostima većim od 800 m od izvora, što znači da izolacioni pojas mora biti veći od te udaljenosti. Isti autori su utvrdili da razdaljina zavisi od prisustva lokalnih barijera, kao i od lokalne klime i topografije područja.

Najbolji efekat u sprečavanju transfera gena može se postići korišćenjem genetičkih barijera, pri čemu su do sada uglavnom korišćene barijere zasnovane na materinskom nasleđivanju, muškoj sterilnosti i sterilnosti semena. U slučaju suncokreta koristi se muška sterilnost (Whitton i sar., 1997; Hvarleva i sar, 2009). Materinsko nasleđivanje se uspešno koristi za sprečavanje transfera gena preko polena u slučaju nekoliko vrsta uključujući duvan i paradajz (Daniell i sar., 1998; Ruf i sar., 2001). Kontrolisanje plodnosti embriona i semena poznato je kao GURT (Gene Use Restriction Technology), odnosno Terminator tehnologija za koju vlada mišljenje da je bolja mera od produkcije sterilnog polena. Ipak ova strategija se smatra najkontraverznijom merom za ograničavanje transfera gena. Osim toga, za ograničavanje transfera gena mogu biti korisne i strategije koje uključuju apomiksis (vegetativno razmnožavanje i aseksualno formiranje semena), kleistogamiju (samooplodnja bez otvaranja cvetova), inkompatibilnost genoma (selektivna restrikcija kojom se sprečava ili limitira oplodjenje određenim klasama gena), hemijsku indukciju/deleciju (strukturna promena DNK pri kojoj se gubi određeni deo genetičkog materijala, pa time i deo genetičke informacije sadržane u tom materijalu) i dr. (Daniell, 2002). Ni jedna od raspoloživih strategija ne može da se primeni u svim mogućim usevima, pa se stoga preporučuju kombinacije različitih pristupa za sprečavanje neželjenog transgfera gena.

Transfer gena sa tolerantnih hibrida suncokreta na divlje srodnike

Rad na oplemenjivanju suncokreta tolerantnog na herbicide iz grupe imidazolinona i sulfonilurea u našoj zemlji je započet 1998. (Jocić i sar., 2001), a već od 2003. godine ova tehnologija je uvedena u proizvodnju. Kao donor gena odgovornih za otpornost suncokreta na imazamoks korišćen je divlji suncokret iz SAD-a, kod koga se rezistentnost na herbicide iz grupe imidazolinona razvila nakon 7 godina uzastopne primene imazetapira (Al-Khatib i sar., 1998). Dobijeni hibrid je ispoljio visok nivo tolerantnosti prema imazetapiru (Vrbničanin et al., 2008) i imazamoksu (Bozic et al., 2012), kako u odnosu na različite vegetativne parametre, tako i u odnosu na aktivnost ALS enzima *in vivo*, odnosno *in vitro*. Kao izvor gena odgovornih za tolerantnost na tribenuron-metil korišćene su izvorne populacije SURES-1 i SURES-2 (Miller i Al-Khatib, 2004; Jocić i sar., 2008), pri čemu je takođe dobijen hibrid sa visoko izraženom tolerantnošću prema ovom herbicidu (Brankov i sar., 2010; Bozic et al., 2012). S obzirom da su svi hibridi suncokreta tolerantni prema herbicidima dobijeni klasičnim metodama oplemenjivanja, najveći problem koji proizilazi iz njihovog gajenja jeste transfer gena odgovornih za tolerantnost na srodne vrste. Naime, uprkos tome što je uvođenjem ovakvih useva u proizvodnju omogućeno efikasnije suzbijanje problematičnih korovskih vrsta kao što su *Sorghum halepense* L. (Pers.) *Ambrosia trifida* L., *Ambrosia artemisiifolia* L., *Cirsium arvense* L., *Xanthium strumarium* L., korovske forme *Helianthus annuus* L., *Orobanche cumana* L. i drugih, njihovo gajenje je povezano sa veoma izraženim rizikom od transfera gena odgovornih za tolerantnost sa ovih hibrida na korovsku formu *H. annuus*. Mada je kod nas potvrđeno prisustvo 4 vrste iz roda *Helianthus* (*Helianthus annuus* L., *Helianthus tuberosus* L., *Helianthus decapetalus* L. i *Helianthus scaberimus* L.) na obradivim i ruderalnim površinama (Vrbničanin i sar., 2004), korovske populacije *H. annuus* zauzimaju najveće površine, koje prema nekim procenama iznose oko 1000 ha u Južnom Sremu i oko 7-8000 ha u Južnom Banatu (Vrbničanin i sar., 2013; Saulić i sar., 2013). Dodatni problem predstavlja njihovo suzbijanje koje je otežano usled velike populacione varijabilnosti (Trifković i sar., 2013) i izražene invazivnosti usled velikog vegetativnog i generativnog potencijala (Vrbnicanin i sar., 2010; Vrbničanin i sar., 2013). Osim toga, utvrđena je smanjena osetljivost populacija ove vrste na nikosulfuron (Božić i sar., 2011, 2013), koji se često koristi za suzbijanje korova u kukuruzu, gde se korovski suncokret sreće u velikoj brojnosti.

Mada su istraživanja transfera gena odgovornih za tolerantnost na herbicide sa tolerantnih hibrida suncokreta na korovski suncokret u našoj zemlji u početnoj fazi, značajan broj istraživanja u svetu su potvrdila transfer gena sa suncokreta na srodne vrste (Linder i sar., 1998; Massinga i sar., 2003; Rieseberg i sar., 1999) i njegove samonikle populacije (Burke i sar., 2002), što ukazuje da se ova pojava može očekivati i kod nas. Poznato je da između *H. annuus* i njegovih bliskih srodnika dolazi do inter- i intraspecijskog ukrštanja (Arias i Rieseberg, 1994; Marshall i sar., 2001; Massinga i sar., 2003). Spontanoj hibridizaciji između gajenog suncokreta i divljih srodnika doprinosi preklapanje perioda cvetanja gajenog i većine divljih vrsta suncokreta, zajednički polinatori, samoinkompatibilnost divljih vrsta, diploidnost i visok nivo stranooplodnje (Hvarleva i sar., 2009). Ipak, hibridizacija između suncokreta i srodnika

može da izostane usled nepoklapanja cvetanja, inkompatibilnosti, fizičke udaljenosti, razlika u hromozomskoj strukturi između vrsta i interspecijske konkurencije polena (Arias i Rieseberg, 1994; Rieseberg i sar., 1999).

Transfer gena sa useva suncokreta na divlje srodnike zavisi od različitih činilaca. Naime, Marshall i sar. (2001), kao i Massinga i sar. (2003) su uočili da pravac vetra utiče na transfer gena, što se pripisuje njegovom uticaju na kretanje pčela. Ipak, transfer polena sa tolerantnih hibrida na srodne vrste zavisi pre svega od njihove udaljenosti od izvora polena i veličine parcele (Gotz i Ammer, 2000). Tako su Massinga i sar. (2003), kada su ispitivali transfer gena sa hibrida suncokreta tolerantnog prema imidazolinonima na divlje srodnike, utvrdili da je gen odgovoran za tolerantnost prenet na udaljenost veću od 30 m od izvora polena, pri čemu je procenat preživelog potomstva divljih strodnika opadao sa povećanjem udaljenosti od tolerantnog hibrida. Takođe, utvrđeno je da se transfer gena sa gajenog suncokreta na njegovu divlju formu smanjuje sa povećanjem njihove međusobne udaljenosti, pri čemu na udaljenosti od 3 m to je iznosilo 27%. Ipak, transfer gena je potvrđen i na razdaljini od preko 1000 m od izvora polena (Arias i Rieseberg, 1994). Osim toga, Whitton i sar. (1997) su utvrdili da je 42% potomstva divljeg suncokreta na udaljenosti 3 m od gajenog predstavljalo njihove hibride, dok je na udaljenosti od 200 m zastupljenost hibridnog potomstva bila 10%, a na udaljenosti 400 m oko 4%.

Uprkos tome što proučavanje rizika od transfera gena sa tolerantnih useva na srodne vrste nije lako i jednostavno, ova istraživanja su neophodna i kod nas kako bi se predvidele opasnosti od ove pojave i osmislile strategije za njeno izbegavanje ili bar odlaganje, kao i za ublažavanje negativnih posledica ako do spontanog transfera gena ipak dođe.

ZAHVALNICA

Publikovanje ovog rada podržali su nacionalni projekat III 46008 i EU Commission project AREA, No 316004.

LITERATURA

- Al-Khatib, K., Baumgartner, J.R., Peterson, D.E., Currie, R.S.*: Imazethapyr resistance in common sunflower (*Helianthus annuus*). *Weed Science*, 46, 403-407, 1998.
- Arias, D.M., Rieseberg, L.H.*: Gene flow between cultivated and wild sunflowers. *Theoretical and Applied Genetics*, 89, 655-660, 1994.
- Arnaud, J.F., Viard, F., Delescluse, M., Cuguen, J.*: Evidence for gene flow via seed dispersal from crop to wild relatives in *Beta vulgaris* (Chenopodiaceae): consequences for the release of genetically modified crop species with weedy lineages. *Proceedings of the Royal Society, Biological Sciences*, 270, 1565-1571, 2003.
- Božić, D., Vrbničanin, S., Malidža, G., Elezović, I.*: Spontano ukrštanje gajenog suncokreta tolerantnog na herbicide ALS inhibitore sa samoniklim osetljivim suncokretom. VI kongres o zaštiti bilja sa simpozijumom o biološkom suzbijanju invazivnih organizama, Zbornik rezimea, 110-111, 2009.
- Božić, D., Sarić, M., Elezović, I., Vrbničanin, S.*: Reakcije populacija *Xanthium strumarium* L. i *Helianthus annuus* L. na nikosulfuron. *Acta herbologica*, 20, 15-24, 2011.

- Božić, D., Sarić, M., Malidža, G., Ritz, C., Vrbničanin, S.:** Resistance of sunflower hybrids to imazamox and tribenuron-methyl. *Crop Protection*, 39, 1-10, 2012.
- Božić, D., Vrbničanin, C., Barać, M., Sarić-Krsmanović, M.:** Aktivnost ALS enzima kod *Xanthium strumarium* L. i *Helianthus annuus* L. pod uticajem nikosulfurona. *Acta herbologica*, 22, 79-88, 2013.
- Brankov, M., Božić, D., Sarić, M., Vrbničanin, S.:** Reakcije hibrida SUMO 1 PR i Kazanova na tribenuron-metil. X savetovanje o zaštiti bilja, Zbornik rezimea, 76, 2010.
- Burke, J., Gardner, K., Rieseberg, L.:** The potential for gene flow between cultivated and wild sunflower (*Helianthus annuus*) in the United States. *American Journal of Botany* 89, 1550-1552, 2002.
- Chevre, A.M., Eber, F., Darmency, H., Fleury, A., Picault, H., Letanneur, J.C., Renard, M.:** Assessment of inter-specific hybridization between transgenic oilseed rape and wild radish under normal agronomic conditions. *Theoretical and Applied Genetics*, 100, 1233-1239, 2000.
- Daniell, H., Datta, R., Varma, S., Gray, S., Lee, S.B.:** Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome. *Nature Biotechnology*, 16, 345-348, 1998.
- Daniell, H.:** Molecular strategies for gene containment in transgenic crops. *Nature Biotechnology*, 20, 581-586, 2002.
- Desplanque, B., Hautekeete, N.C., Van Dijk, H.:** Transgenic weed beets: possible, probable, avoidable? *Journal of Applied Ecology*, 39, 561-571, 2002.
- Eastham, K., Sweet, J.:** Genetically Modified Organisms (GMOs): The Significance of Gene Flow Through Pollen Transfer. European Environment Agency, Copenhagen, Denmark, 2002.
- Ellstrand, N.C., Elam, D.:** Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24, 217-42, 1993.
- Ellstrand, N.C., Prentice, H.C., Hancock, J.F.:** Gene flow and introgression from domesticated plants into their wild relatives. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 30, 539-563, 1999.
- Gotz, R., Ammer, F.:** Ergebnisse der Anwendung von Liberty in transgenem Winterraps in Thüringen. *Journal of Plant Diseases and Protection XVII*, 397-401, 2000.
- Gutierrez, A., Carrera, A., Basualdo, J., Rodrigez, R., Cantamutto, M., Poverene, M.:** Gene flow between cultivated sunflower and *Helianthus petiolaris* (Asteraceae). *Euphytica*, 172, 67-76, 2010.
- Hancock, J.F.:** A framework for assessing the risk of transgene crops. *Bioscience*, 53, 512-519, 2003.
- Hvarleva, T., Hristova, M., Bakalova, A., Hristov, M., Atanassov, I., Atanassov, A.:** CMS lines for evaluation of pollen flow in sunflower relevance for transgene flow mitigation. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 23, 1309-1315, 2009.
- Jenczewski, E., Ronfort, J., Chevre, A.M.:** Crop-to-wild gene flow, introgression and possible fitness effects of transgenes. *Environmental Safety Research*, 2, 9-24, 2003.
- Jocić, S., Škorić, D., Malidža, G.:** Oplemenjivanje suncokreta na otpornost prema herbicidima. Zbornik radova Naučnog instituta za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, 35: 223-233, 2001.
- Jocić, S., Malidža, G., Hladni, N., Gvozdrenović S.:** Novi hibridi suncokreta tolerantni na tribenuron-metil. Zbornik radova Naučnog instituta za ratarstvo i povrtarstvo, 45, 89-95, 2008.
- Linder, C.R., Taha, I., Seiler, G.J., Snow, A.A., Rieseberg, L.H.:** Long-term introgression of crop genes into wild sunflower populations. *Theoretical and Applied Genetics*, 96, 339-347, 1998.
- Lu, B.R., Yang, C.:** Gene flow from genetically modified rice to its wild relatives: Assessing potential ecological consequences. *Biotechnology Advances*, 27, 1083-1091, 2009.
- Marshall, M.W., Al-Khatib, K., Loughin, T.:** Gene flow, growth, and competitiveness of imazethapyr-resistant common sunflower. *Weed Science*, 49, 14-21, 2001.
- Massinga, R.A., Al-Khatib, K., St. Amand, P., Miller, J.F.:** Gene flow from imidazolinone-resistant domesticated sunflower to wild relatives. *Weed Science*, 51, 854-862, 2003.
- Mercer, K.L., Andow, D.A., Wyse, D.L., Shaw, R.G.:** Stress and domestication traits increase the relative fitness of crop-wild hybrids in sunflower. *Ecology Letters*, 10, 383-393, 2007.

- Miller, J.F., Al-Khatib, K.:** Registration of two oilseed sunflower genetic stocks, SURES-1 and SURES-2, resistant to tribenuron herbicide. *Crop Science*, 44, 1037-1038, 2004.
- Morris, W.K., Kareiva, P.M., Raymer, P.L.:** Do barren zones and pollen traps reduce gene escape from transgenic crops? *Ecological Applications*, 4, 157-165, 1994.
- Oliveira, A.R., Castro, T.R., Capalbo, D.M.F., Delalibera, I.:** Toxicological evaluation of genetically modified cotton (Bollgard (R)) and Dipel (R) WP on the non-target soil mite *Scheloribates praeincisus* (Acari: Oribatida). *Experimental and Applied Acarology*, 41, 191-201, 2007.
- Raybould, A.F., Gray, A.J.:** Genetically modified crops and hybridization with wild relatives: a UK perspective. *Journal of Applied Ecology*, 30, 199-219, 1993.
- Raybould, A.F.:** Transgenes and agriculture- going with the flow? *Trends in Plant Science*, 4, 247-248, 1999.
- Renno, J.F., Winkel, T.:** Phenology and reproductive effort of cultivated and wild forms of *Pennisetum glaucum* under experimental conditions in the Sahel: implications for the maintenance of polymorphism in the species. *Canadian Journal of Botany*, 74(6), 959-964, 1996.
- Rieseberg, L.H., Whitton, J., Gardner, K.:** Hybrid zones and genetic architecture of barrier to gene flow between two sunflower species. *Genetics* 152, 713-727, 1999.
- Ruf, S., Hermann, M., Berger, I.J., Carrer, H., Bock, R.:** Stable genetic transformation of tomato plastids—high-level foreign protein expression in fruits. *Nature Biotechnology*, 19, 870-875, 2001.
- Saulić, M., Stojićević, D., Matković, A., Božić, D., Vrbničanin, S.:** Population variability of weedy sunflower as invasive species. 4th ESENIAS Workshop: International Workshop on IAS in Agricultural and Non-Agricultural Areas in ESENIAS Region, Çanakkale, Turkey, 16-17 December Abstract book, 27, 2013.
- Scheffler, J.A., Parkington, R., Dale, P.J.:** Frequency and distance of pollen dispersal from transgenic oilseed rape (*Brassica napus*). *Transgenic Research*, 2, 356-364, 1993.
- Scheffler, J.A., Parkington, R., Dale, P.J.:** Evaluating the effectiveness of isolation distances for field plots of oilseed rape (*Brassica napus*) using a herbicide-resistance transgene as a selectable marker. *Plant Breeding*, 114, 317-321, 1995.
- Song, Z.P., Lu, B., Zhu, Y.G., Chen, J.K.:** Gene flow from cultivated rice to the wild species *Oryza rufipogon* experimental field conditions. *New Phytologist*, 157, 657-665, 2003.
- Staniland, B.K., McVetty, P.B.E., Friesen, L.F., Yarrow, S., Freyssinet, G., Freyssinet, M.:** Effectiveness of border areas in confining the spread of transgenic *Brassica napus* pollen. *Canadian Journal of Plant Science*, 80, 521-526, 2000.
- Stewart, C.N., Halfhill, M.D., Warwick, S.I.:** Transgene introgression from genetically modified crops to their wild relatives. *Nature Reviews Genetics*, 4, 806-817, 2003.
- Trifković M., Saulić M., Stojićević, D., Božić, D., Vrbničanin, S.:** Populaciona varijabilnost i generativna produkcija korovskog suncokreta (*Helianthus annuus* L.). XII savetovanje o zaštiti bilja, Zlatibor. Zbornik rezimea, 46, 2013.
- Vrbničanin, S., Karadžić, B., Dajić Stevanović, Z.:** Adventivne i invazivne korovske vrste na području Srbije. *Acta herbologica*, 13, 1-13, 2004.
- Vrbničanin, S., Božić, D., Malidža, G., Dušanić, N., Pavlović, D., Barać, M.:** Tolerance of sunflower (*Helianthus annuus* L.) to imazethapyr. *Helia*, 31, 85-94, 2008.
- Vrbničanin, S., Božić, D., Pavlović, D., Sarić, M.:** Fitness of the populations of invasive volunteer sunflower. 2nd International Workshop on Invasive Plants in the Mediterranean Type Regions of the World, Trabzon-Turkey, 02-06 August, Abstract book, 85, 2010.
- Vrbničanin, S., Božić, D., Sarić-Krsmanović, M., Stojićević, D., Onć-Jovanović, E.:** Ocena fitnesa populacija korovskog suncokreta (*Helianthus annuus* L.). *Acta herbologica*, 22, 89-98, 2013.
- Zhang, W., Linscombe, S.D., Webster, E., Tan, S., Oard, J.:** Risk assessment of the transfer of imazethapyr herbicide tolerance from Clearfield rice to red rice (*Oryza sativa*). *Euphytica*, 152, 75-86, 2006.
- Whitton, D., Wolf, E., Arias, D.M., Snow, A.A., Rieseberg, L.H.:** The persistence of cultivar alleles in wild populations of sunflowers five generations after hybridization. *Theoretical and Applied Genetics*, 95, 33-40, 1997.

Transfer of genes responsible for herbicide tolerance from crop to wild relatives

SUMMARY

Due to an intensive growing of crops tolerant to herbicides, obtained by conventional breeding methods or by genetic engineering (genetically modified - GM crops), interest for studies of gene transfer from crops to wild relatives has increased in the last two decades. This paper provides an overview of the risks associated with growing crops tolerant to herbicides, with the most attention paid to transfer of genes responsible for tolerance through pollen. Also, potential barriers for prevention of this problem were analyzed. Considering that sunflower hybrids tolerant to herbicides cultivate in our country, potential risks of gene transfer from these hybrids to wild relatives were discussed. A study of the transfer of genes responsible for tolerance to herbicides has mostly been limited to the hybrid offspring of the F1 generation so far. However, research in this area in the future should be focused on the long-term effects of this phenomenon studies.

Keywords: barrier, crop-weed hybrids, gene transfer, herbicide-tolerant crops, pollen, risk