

ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПЕРЕОПЫЛЕНИЯ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ С УВЕЛИЧЕННЫМИ РАЗМЕРАМИ ОРГАНОВ И ИХ НЕТРАНСГЕННЫХ РОДСТВЕННИКОВ НА ПРИМЕРЕ ТАБАКА

©2013 Е.В. Михайлова¹, Б.Р. Кулуев²

¹Башкирский государственный университет, г. Уфа

²Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, г. Уфа

Поступила 10.06.2013

В данной статье представлены результаты переноса генов *ARGOS* и *ARGOS-LIKE* от трансгенного табака сорта Petit Havana другим сортам и видам рода *Nicotiana* путем искусственного переопыления. Были изучены фенотипические проявления трансгенов в двух поколениях гибридных растений. Присутствие трансгенов подтверждено ПЦР-анализом. Фенотипические проявления экспрессии гена *ARGOS-LIKE* значительно увеличивались по сравнению с родительскими растениями, тогда как проявления гена *ARGOS* снижались, либо оставались на том же уровне. В результате переопыления также были получены гибридные растения, содержащие оба гена, а также исследована передача трансгенов от гибридов к другим видам.

Ключевые слова: *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana rustica*, *ARGOS*, *ARGOS-LIKE*, трансгенные растения, переопыление, клеточное растяжение, величина органов.

За 17 лет коммерческого культивирования трансгенных растений, площади, занимаемые ими, увеличились в 100 раз. В 2012 году они возделывались в 28 странах на 170 миллионах га. Наиболее широкое распространение получили трансгенные растения, устойчивые к гербицидам, либо к насекомым-вредителям, однако постепенно на рынок выходят и растения с другими полезными признаками [5]. Например, современная генная инженерия растений позволяет проводить работы, направленные на увеличение размеров органов растений, что может найти применение в сельском и лесном хозяйствах и декоративном садоводстве. Для этого обычно увеличивают или уменьшают уровень экспрессии определенных генов, ответственных за регуляцию роста и развития растений. Однако перед началом коммерческого возделывания любых трансгенных растений, необходимо исследовать наследование и передачу трансгенов при скрещивании и в ряду поколений. Особый интерес представляет исследование вероятности переопыления трансгенных растений с дикорастущими родственными растениями и закрепление трансгенов в природных популяциях. Такое генетическое «загрязнение» чаще всего нежелательно и наиболее вероятно для видов, имеющих свободнорастущих и сорных родственников, в том числе люцерны, сахарной свеклы, пшеницы, подсолнечника, рапса [9]. Перенос трансгенов подтверждён в полевых экспериментах с подсолнечником, вырабатывающим В-токсин [8] и при коммерческом возделывании рапса [6, 7, 10]. Частота гибридизации может значительно колебаться в зависимости от линии трансгенного растения и особенностей дикой популяции [4].

Несмотря на обширные исследования передачи

диким родственникам устойчивости к гербицидам и насекомым-вредителям, фенотипические проявления трансгенов, ответственных за другие признаки, остаются малоизученными. Получающиеся при этом гибриды также недостаточно исследованы в качестве источников трансгенной пыльцы, способной опылить растения других сортов и видов. В связи с этим, целью данной работы стало исследование процессов переопыления трансгенных и нетрансгенных растений, а также переноса и фенотипических проявлений в ряду поколений генов, участвующих в регуляции роста и развития растений.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе были использованы трансгенные растения *Nicotiana tabacum* L. сорта Petit Havana линии SR1, содержащие целевые гены *ARGOS* и *ARGOS-LIKE* (*ARL*), перенесенные из *Arabidopsis thaliana*, которые кодируют белковые факторы, участвующие в регуляции роста и развития растений. Они были получены в рамках исследований, направленных на получение трансгенных растений с увеличенными размерами органов [1], в частности, размеров листьев и стеблей за счёт стимуляции клеточного растяжения и деления. Трансгенные растения также содержали селективный ген устойчивости к антибиотику гигромицину.

Пыльцой этих трансгенных растений искусственно опыляли нетрансгенные растения различных видов семейства *Solanaceae*: *Petunia milliflora*, *Nicotiana alata*, *Nicotiana langsdorfii*, *Solanum sisimbrifolium*, *Nicotiana sylvestris*, *Nicotiana rustica*, а также *Nicotiana tabacum* сорта «Черный Кубинский». Переопыление осуществляли путём нанесения пыльцы трансгенного табака на рыльце нетрансгенного растения одноразовой пластмассовой пестикой. Перед этим проводилось изъятие тычинок цветков до образования на них пыльцы, чтобы предотвратить самоопыление.

Для контроля наследования трансгенов семена,

Михайлова Елена Владимировна, аспирант, e-mail: mikhele@list.ru; Кулуев Булат Разяпович, к.б.н., старший научный сотрудник, e-mail: kuluev@bk.ru.

проращивали на среде МС с добавлением гигромицина. Устойчивые к антибиотику растения пересаживались в почву. Все растения культивировали на открытой светоплощадке при температуре 25°C с фотопериодом 16/8 часов (свет/темнота) и освещенностью около 4 клк в вегетационных сосудах объемом 450 мл.

С целью определения наличия целевого гена в гибридных растениях проводили ПЦР-анализ при помощи праймеров: TTGTCTTCCTCAT TTCCTAC и ATCATCATATAATAAATTTTCAGAT в случае с геном *ARGOS*; STTCTTTAAATGATT CGTGAG и TTATTACATAAAAAGTGGAAG в случае с геном *ARL*.

С целью изучения влияния экспрессии целевого гена на величину органов, проводили морфологический анализ опытных растений, который заключался в измерении длины стебля, длины листьев, площади клеток нижнего эпидермиса листьев в период цветения, а также сравнении полученных данных с контрольными растениями.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Переопылить трансгенные растения табака *N. tabacum* сорта Petit Havana с *P. milliflora*, *N. alata*, *N. langsdorfii*, *S. sisimbriifolium* не удалось.

Искусственное опыление растений *N. tabacum* сорта «Черный Кубинский» («ЧК») пыльцой трансгенного табака происходило успешно во всех случаях. Всхожесть на среде с антибиотиком составила 51% для гибридов с геном *ARGOS* и 81% для гибридов с геном *ARL*. Для семян, полученных в результате самоопыления гибридов, в которых был обнаружен трансген, этот показатель составил соответственно 98% и 89%.

Переопыление трансгенных растений табака с растениями *N. rustica* и *N. sylvestris* происходило со значительными затруднениями. В большинстве случаев семена не образовывались, либо погибали на среде с добавлением гигромицина. Тем не менее, в ходе работы нам удалось получить жизнеспособные гибриды.

В результате переопыления табака сорта «ЧК» с трансгенным табаком, содержащим ген *ARL*, было получено 15 гибридов (F2), все они были фертильны и демонстрировали устойчивость к антибиотику. В результате самоопыления этих гибридов были получены 14 растений поколения F3. Семена, полученные в результате опыления *N. rustica* пыльцой гибридов поколения F2, оказались невсхожими.

Увеличение длины стебля наблюдалось у трех растений поколения F2 (на 10%, 14% и 20%) и двух растений поколения F3 (на 22% и 13%), в среднем же длины стеблей по сравнению с родительским трансгенным растением отличались незначительно. Длина листьев возрастала у трех растений поколения F2 и пяти растений поколения F3. Увеличение происходило не более чем на 23% по сравнению с родительскими трансгенными растениями. Увеличение же площади клеток нижнего эпидермиса ли-

стьев происходило всегда и доходило до 288% по сравнению с родительскими трансгенными растениями (рис. 1).

В результате переопыления *N. rustica* с трансгенным табаком, содержащим ген *ARL*, получено 16 коробочек, проростки 14 из них имели 2%-ную устойчивость к антибиотику, выжившие растения оказались бесплодны. Семена из двух коробочек имели высокую всхожесть и 100% устойчивость к антибиотику. В каждом из двух случаев было получено по восемь гибридов, которые все имели фенотип *N. tabacum*. В первом случае гибриды не отличались увеличением органов и клеток по сравнению с родительскими трансгенными растениями, однако по всем параметрам превосходили растения *N. rustica*. Во втором случае гибриды отличались увеличением размера клеток максимум на 150% по сравнению с родительскими трансгенными растениями, при этом пропорционального увеличения размера органов не наблюдалось. Длины листьев увеличивались (до 26 см) только у двух растений, тогда как высота стеблей были меньше, чем у родительских трансгенных растений, во всех случаях (рис. 1).

Вероятно, ген *ARL* не оказывает существенного влияния на длину стебля гибридных растений табака. Однако по другим параметрам гибриды превосходят не только нетрансгенные, но и трансгенные родительские растения. Пропорционального увеличения размера клеток и листьев не наблюдается, по всей видимости, потому, что в растениях существует компенсаторный механизм, направленный на сохранение оптимальных размеров органов, несмотря на значительное увеличение размеров отдельных клеток [3]. Площадь клеток гибридов табака сорта «ЧК» и табака сорта Petit Havana без целевого гена не возрастала. Из этого следует, что гетерозис не является причиной стимуляции клеточного растяжения в листьях гибридов. Таким образом, увеличение площади клеток можно считать одной из морфологических характеристик, демонстрирующих фенотипическое проявление высокого уровня экспрессии целевого гена.

В результате переопыления табака сорта «ЧК» с трансгенным табаком, содержащим ген *ARGOS*, было получено девять гибридов F2, все они были фертильны и демонстрировали устойчивость к антибиотику. В результате самоопыления этих гибридов было получено 11 растений поколения F3. Максимальное увеличение длины стебля составило 20% в поколении F2, максимальное увеличение длины листа – 34% в поколении F3. В среднем же отличия по показателям были незначительны, а в поколении F3 средняя длина стебля была меньше, чем у родительских трансгенных растений (рис. 1).

Пыльцой гибридов поколения F2 были опылены цветки *N. rustica*, полученные семена демонстрировали всхожесть на уровне 1-2%, либо полную невсхожесть. Были проанализированы три взрослых растения, все они оказались нефертильными при

самоопылении, однако успешно оплодотворялись пыльцой других табаков.

Опыление гибридов табака сорта «ЧК» и трансгенных по гену *ARGOS* растений пыльцой гибридов табака сорта «ЧК» и трансгенных по гену *ARL* растений происходило успешно. Полученные семена показали устойчивость к антибиотику и высокую всхожесть. Было получено восемь взрослых фертильных растений с увеличенной площадью клеток, причем максимальное увеличение составило 119% по сравнению с контролем (рис. 1). Увеличение длины листьев наблюдалось только у одного растения, а стебли были короче, чем у родительских растений.

Семена, полученные в результате опыления лесного табака пыльцой гибридов «ЧК» и трансгенного табака Petit Havana поколения F2, имели 8%-ную всхожесть, при этом устойчивым к антибиотику был только один гибрид с геном *ARGOS* и один гибрид с геном *ARL*.

Из 42 проанализированных методом ПЦР растений только 9 показали отрицательный результат, при этом интересно отметить, что все растения, не унаследовавшие целевого гена, принадлежали поколению F3, тогда как родительские растения (гибриды поколения F2) имели целевой ген. Семь проанализированных растений не унаследовали от родительских ген *ARGOS*, и только два – ген *ARL* (рис. 2).

Отдельно были проанализированы четыре растения, полученные в результате опыления гибридов табака «ЧК» и табака, трансгенного по гену *ARGOS*, пыльцой гибридов «ЧК» табака и табака, трансгенного по гену *ARL*. Два из них имели оба гена, два – только по одному. Ещё четыре растения были проанализированы только на наличие гена *ARGOS*; в двух из них он был обнаружен, а в двух отсутствовал.

Опытные растения с геном *ARGOS* превосходили нетрансгенные растения сорта Petit Havana по размерам органов, а от родительских трансгенных растений отличались незначительно, однако отдельные растения демонстрировали как очень высокие, так и очень низкие показатели, что говорит о различной степени экспрессионной активности трансгенов. Опытные растения с геном *ARL* превосходили по показателям нетрансгенные растения обоих сортов, а также родительские трансгенные растения. Наибольшие изменения во всех случаях наблюдались в размерах площадей клеток нижнего эпидермиса листьев.

В ряду поколений гибридов воздействие гена *ARL* на морфологические характеристики гибридных растений возрастало, вызывая увеличение площадей клеток до 60% по сравнению с гибридами поколения F2 (рис. 3). В случае же с геном

ARGOS наблюдалось снижение показателей в следующем поколении. Было показано, что трансгены, вызывающие увеличение размеров органов, могут передаваться от гибридов к другим видам растений. Наследование трансгенов было подтверждено морфологическим и ПЦР-анализами, также было проверено наследование устойчивости к антибиотику. Было показано, что селективный ген передается чаще, чем целевой, хотя эти данные могут быть связаны с недостаточной эффективностью ПЦР-анализа или выживанием на антибиотике нетрансгенных форм. Также существует тенденция снижения количества трансгенных растений в ряду поколений, что больше выражено у гибридов содержащих ген *ARGOS*.

Появление гибридов с несколькими трансгенами не является редкостью в природных условиях. Устойчивость к двум видам антибиотиков была отмечена в 62% исследованных популяций рапса [6]. Однако у гибридов с двумя трансгенами *ARGOS* и *ARL* ни один из показателей не увеличивался в большей степени, чем у гибридов, содержащих только один трансген.

Ген *ARL*, как и ген *AtEXPA10*, фенотипические проявления которого в гибридных растениях табака были рассмотрены нами ранее [2], по всей видимости, представляют больший интерес в плане экологических исследований, чем ген *ARGOS*.

Тем не менее, поскольку гибриды *N. rustica* и *N. tabacum*, трансгенного по гену *ARL*, полученные из разных коробочек с семенами, значительно отличались друг от друга по морфологическим характеристикам, можно сделать вывод об уникальности каждого случая переопыления и необходимости проводить как можно более масштабные опыты при тестировании безопасности трансгенных растений с увеличенными органами.

У межвидовых гибридов наблюдалось снижение фертильности пыльцы, что, однако, не препятствовало опылению их цветков пыльцой других растений. Таким образом, стерильность пыльцы гибридов не является преградой распространению трансгенов.

Если переопыление с представителями других видов всё же происходит, то экспрессия трансгена, по всей видимости, может оказаться выше, чем при переопылении с растениями другого сорта того же вида. Факт передачи трансгенов от полученных гибридов к нетрансгенным растениям других видов говорит о необходимости пересматривать ареал их возможного распространения. Таким образом, необходимо проводить испытания для каждой трансгенной линии в каждом регионе, где предполагается культивирование, отдельно.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ мол-а №12-04-31292.

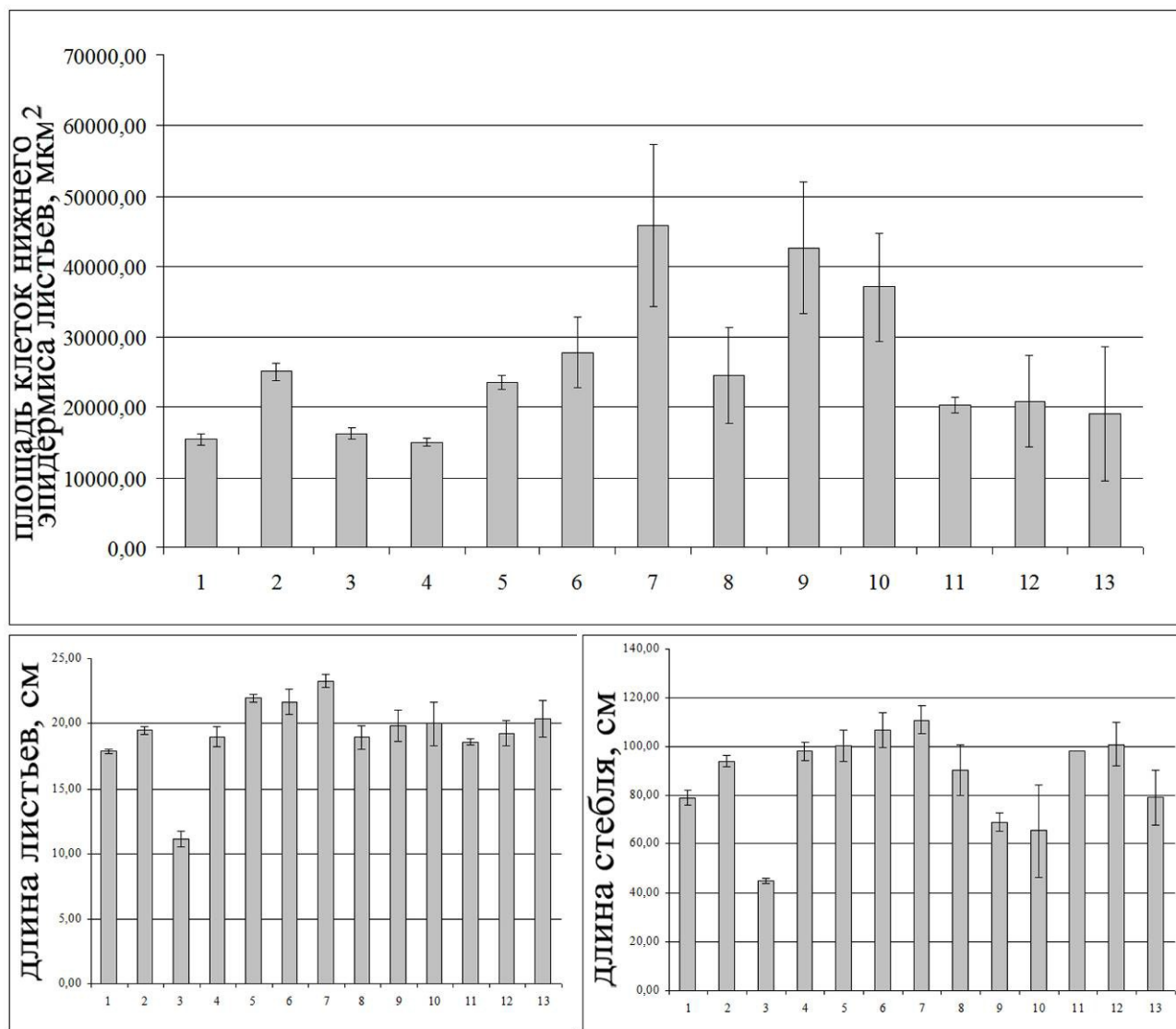


Рис. 1. Сравнительный анализ морфологических параметров контрольных и опытных растений (1 - *N. tabacum* SR1 нетрансгенный; 2 - *N. tabacum* «ЧК»; 3 - *N. rustica*; 4 - гибриды «ЧК» и SR1 без целевого гена; 5 - *N. tabacum* SR1 с геном *ARL*; 6 - F2 - гибриды «ЧК» x SR1/*ARL*; 7 - F3 - гибриды «ЧК» x SR1/*ARL*; 8 - F2 - гибриды *N. rustica* x SR1/*ARL*, №1; 9 - F2 - гибриды *N. rustica* x SR1/*ARL*, №2; 10 - F3 «ЧК»/*ARGOS* x «ЧК»/*ARL*; 11 - *N. tabacum* SR1 с геном *ARGOS*; 12 - F2 - гибриды «ЧК» x SR1/*ARGOS*; 13 - F3- гибриды «ЧК» x SR1/*ARGOS*)

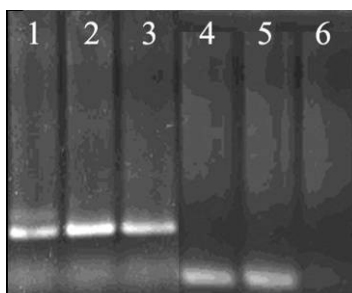


Рис. 2. Электрофореграмма результатов ПЦР-анализа гибридов (1-3 ампликоны гена *ARL*, 4-5 ампликоны гена *ARGOS*, 6 – результаты ПЦР у гибрида без целевого гена)

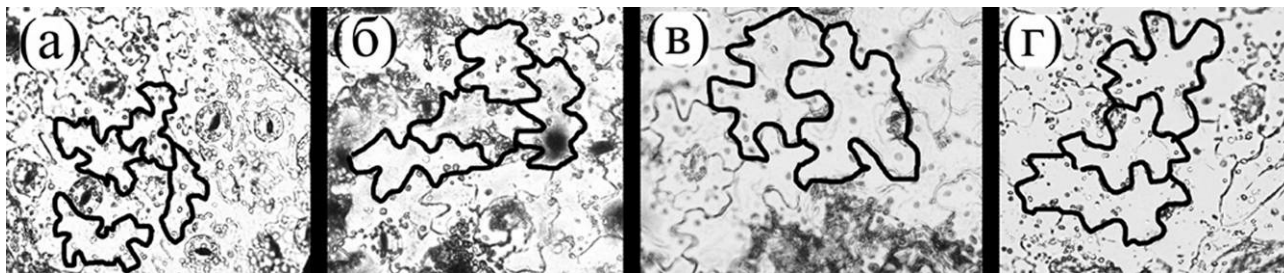


Рис. 3. Клетки нижнего эпидермиса листьев (а-г): а – *N. tabacum* SR1 с геном *ARL*; б – F2 - гибрид «ЧК» x SR1/*ARL*; в – F3 - гибрид «ЧК» x SR1/*ARL*; г – F2 - гибрид *N. rustica* x SR1/*ARL*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кулуев Б.Р., Князев А.В., Ильясова А.А., Чемерис А.В. Конститутивная экспрессия гена *ARGOS* в растениях табака под контролем промотора вируса мозаики георгина // Физиол. раст. 2011. Т. 58. № 3. С. 443-452.
2. Кулуев Б.Р., Михайлова Е.В., Чемерис А.В. Перенос транзенов *ARGOS-LIKE* и *AtEXPA10* в нетрансгенные формы табака и фенотипические проявления их конститутивной экспрессии // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013. Т. 17. № 1. С. 81-88.
3. Cho H.T., Cosgrove D.J. Altered expression of expansin modulates leaf growth and pedicel abscission in *Arabidopsis thaliana* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. P. 9783-9788.
4. Halfhill M.D., Millwood R.J., Raymer P.L., Stewart Jr, C.N. Bt-transgenic oilseed rape hybridization with its weedy relative, *Brassica rapa* // Environ. Biosafety Research. 2002. V. 1. P. 19-28.
5. James C. ISAAA Brief No. 44. Global Status of Commercialized Biotech / GM Crops: 2012 // ISAAA Briefs. Ithaca, New York: International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA). 2012. URL: http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/44/executive_summary/default.asp.
6. Knispel A.L., McLachlan S.M., Van Acker R.C., Friesen L.F. Gene flow and multiple herbicide resistance in escaped canola populations // Weed Science. 2008. V. 56. N 1. P. 72-80.
7. Schaffer M.G., Ross A.A., Londo J.P. et al. The establishment of genetically engineered canola populations in the US // PloS one. 2011. V. 6. N 10. P. E25736.
8. Snow A.A., Pilson D., Rieseberg L.H. et al. A Bt transgene reduces herbivory and enhances fecundity in wild sunflowers // Ecological applications. 2003. V. 13. N 2. P. 279-286.
9. Stewart C.N., Halfhill M.D., Warwick S.I. Transgene introgression from genetically modified crops to their wild relatives // Nature Reviews Genetics. 2003. V. 4. N. 10. P. 806-817.
10. Warwick S.I., Legere A., Simard M.J., James T. Do escaped transgenes persist in nature? The case of an herbicide resistance transgene in a weedy *Brassica rapa* population // Molecular Ecology. 2008. V. 17. N 5. P. 1387-1395.

ECOLOGICAL ASPECTS OF CROSS-POLLINATION OF TRANSGENIC PLANTS WITH INCREASED ORGAN SIZE AND THEIR NON-TRANSGENIC RELATIVES THROUGH THE EXAMPLE OF TOBACCO

©2013 E.V. Mikhaylova¹, B.R. Kuluev²

¹Bashkir State University, Ufa

²Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Sci. Center of RAS, Ufa

In this article we presented the results of transfer of *ARGOS* and *ARGOS-LIKE* genes from transgenic tobacco, cultivar Petit Havana, to other cultivars and species of *Nicotiana* genus by artificial cross-pollination. We examined phenotypic effects of transgenes in two generations of hybrids. Presence of transgenes is confirmed by PCR analysis. Phenotypic effects of expression of *ARGOS-LIKE* gene substantially increased in comparison with parental transgenic plants whereas effects of *ARGOS* gene decreased or stayed at the same level. Due to cross-pollination we gained hybrid plants with both genes and investigated gene transfer to the other species.

Key words: *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana rustica*, *ARGOS*, *ARGOS-LIKE*, transgenic plants, cross-pollination, cell expansion, organ size.