ГЕНЕТИКА

УДК 575.22

СОМАКЛОНАЛЬНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ *NICOTIANA TABACUM*

А.С. Курбидаева, М.Г. Новокрещёнова

(кафедра генетики; кафедра биотехнологии; e-mail: amina.kur@gmail.com)

В процессе изучения морфофизиологических и генетических особенностей трансгенных растений нередко исследователи сталкиваются с трудностями, связанными с нестабильностью трансформации, инактивацией инсерции и появлением соматоклональных вариантов. В данной работе описаны линии растений табака, полученные после агробактериальной трансформации и последующего вегетативного размножения в стерильных условиях. Растения характеризуются карликовым ростом, повышением доли стерильных пылевых зерен и отсутствием ранее детектируемой вставки.

Ключевые слова: трансформация, *Nicotiana tabacum*, соматоклональная изменчивость.

Метод непрямого переноса чужеродной ДНК в клетки растений — наиболее часто используемый в настоящее время подход к получению трансгенных растений. Агробактериальная трансформация успешно применяется в генетической инженерии для трансформации как двудольных растений, так и некоторых однодольных [1] и грибов [2]. Однако даже в случае отработанной методики оказываются возможными сбои. Показано, что в некоторых случаях не происходит встраивания генетической конструкции в геном либо трансформация оказывается нестабильной и инсерция Т-ДНК инактивируется в результате множественных пассажей культивируемых тканей [3].

Другим нежелательным следствием комплекса манипуляций, необходимых для получения трансгенных растений, является появление соматоклональных вариантов. К этому приводит стресс, которому подвергаются трансгенные растения при культивировании [4]. Под соматоклональными вариантами понимают нарушения цитологии, высокую частоту мутаций количественных и качественных признаков, изменение последовательности ДНК, активацию либо подавление экспрессии различных генов.

Выделяют несколько типов стрессовых воздействий, действующих на растение при проведении трансформации: 1) ранение; 2) контакт с патогенным микроорганизмом; 3) культивирование *in vitro*; 4) инсерция Т-ДНК в геном хозяина. Данные события сопровождаются характерным для растений первичным ответом, т.е. активизацией окислительных ферментов [5]. Это явление не только несет защитную функцию, но и оказывает негативное действие на клетку, приводя к появлению различных мутаций — как точечных, так и перестроек хро-

мосом. Например, мутация *trn1 Arabidopsis thaliana* была индуцирована поддержанием клеточной культуры трансгенных растений [6].

Повышенная мутабельность в сочетании с перманентными стрессовыми воздействиями вызывает широкий спектр соматоклональных вариантов, являющихся причиной генетически наследуемых изменений трансгенных растений, не связанных с инсерцией Т-ДНК [7]. Нарушение регуляторных систем организма отражается в том числе и на его морфологии. Видимые изменения подвергнутых трансгенезу растений различны. Это карликовость [8]; снижение апикального доминирования и дополнительное побегообразование [8]; изменения морфологии листовых пластинок и строения цветков [9]. Наблюдается также повышенная эмбриолетальность [8].

Рассмотренные явления, безусловно, снижают эффективность трансформации и затрудняют анализ трансгенных растений. Однако неясно, что именно играет решающую роль в появлении соматоклональных вариантов: внедрение Ti-плазмиды в клетки растения или длительное поддержание клеточной культуры. Задачей данной работы являлось изучение фенотипа растений табака, полученных после агробактериальной трансформации листовых эксплантов и последующего длительного вегетативного размножения в стерильных условиях, и установление относительного вклада процессов трансформации агробактерией и культивирования *in vitro* в явление соматоклональной изменчивости.

Материалы и методы

В Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова были получены более 200 линий *Nicotiana tabacum* L., трансформированных *Agrobacterium tumefac-*

Таблица 1

Праймеры к гену *ICE2 Arabidopsis thaliana* и бактериальному гену *BAR*

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер
<i>ICE2*</i>	GTGGCTTTCTTTAAACCCCT	TCATCGAGTTCGGAGATTGA
<i>BAR-1</i>	TCGAGACAAGCACGGTCAAC	ACTTCAGCAGGTGGGTGTAG
<i>BAR-2</i>	GCACCATCGTCAACCACTAC	GAAGTCCAGCTGCCAGAAAC

*Праймеры к кДНК.

ciens, который несет плазмидный бинарный вектор pLE12860OE со вставкой гена *ICE2 Arabidopsis thaliana* (локус *Atlg12860*) и маркерным бактериальным геном *bar*, отвечающим за устойчивость к гербициду фосфинотрицину (Basta). Трансгенные растения были получены по стандартному методу [10]. В данной работе изучали растения табака 7 независимых линий, подвергнутых агробактериальной трансформации, по сравнению с контрольными линиями. Линии 1-3, 1-24, 1-47 несли вставку полноразмерной копии гена *ICE2*, а линии 1/2-2, 1/2-5, 1/2-25 несли вставку гена *ICE2* без первого экзона. Дополнительная линия, трансформированная вектором без вставки гена *ICE2*, была получена как контрольная. Растения прошли около двадцати поддерживающих культуру пассажей на агаризованной минеральной питательной среде Гамборга. Приблизительно через два года они были высажены в почву и затем проанализированы на стадии цветения.

Для детекции вставки генов использовался ПЦР-анализ. ДНК выделялась методом Dellaporta [11]. Наличие экспрессии гена *ICE2* определяли методом амплификации продуктов обратной транскрипции (ОТ-ПЦР). РНК выделяли с помощью набора RNEasy Plant Mini Kit фирмы "Quiagene". Результаты ПЦР и ОТ-ПЦР анализировали с помощью электрофореза в агарозном геле. Используемые праймеры приведены в табл. 1.

Для определения устойчивости растений табака к гербициду Basta проростки обрабатывали раствором 250 кг/л 1 раз в сутки в течение трех суток.

Жизнеспособность пыльцы определяли ацетокарминовым методом [12]. Показатель относительной мужской стерильности оценивался как процент стерильных пыльцевых зерен от общего числа пыльцевых зерен.

Измерение количественных признаков проводили у растений на стадии полного цветения, когда рост главного побега прекращался.

Результаты

Морфологическая характеристика растений табака

Большинство трансгенных растений табака обладала меньшим ростом по сравнению с контроль-

ным растением. Причем снижение роста наблюдали как у растения, трансформированного вектором без вставки гена *ICE2*, так и с этим геном. Особенно ярко признак карликовости проявлялся в линии 1-3, трансформированной вектором с полноразмерной копией гена *ICE2* (рис. 1). Растения этой линии на стадии цветения были в 2 раза ниже, чем контрольные (табл. 2). В отличие от других растений кроме главного побега растения имели хорошо разви-

тые боковые побеги, что говорит о нарушении апикального доминирования. Почти в 1,5 раза снижен рост растений линии 1-47, а также линии 1/2-25 (делетированный вариант гена *ICE2*).

Несмотря на карликовость, число узлов побега было либо почти таким же, как у контрольного растения, либо даже увеличивалось. В результате средняя длина междоузлий у карликовых растений была существенно ниже, чем у контрольного. Наиболее укороченными оказались междоузлия у растений линий 1-3 и 1/2-25 — почти в 2 раза короче, чем у контрольного (рис. 1).

Различия между трансгенными и нетрансгенными растениями обнаружились и в ходе проверки пыльцы на стерильность (табл. 3). На фотографиях представлена пыльца после окрашивания ацетокармином (рис. 2). В то время как у контрольного растения пыльца фертильна, у подвергшихся трансформации наблюдается в различной степени повышение доли стерильных пыльцевых зерен. Наибольший уровень стерильности выявлен в линии 1-3 (52,1% стерильной пыльцы). Отметим, что именно эта линия характеризуется и наибольшими морфологическими изменениями (карликовостью и кустистостью).

В отличие от линий, прошедших трансформацию, в контрольной линии, которая длительно куль-

Рис. 1. Внешний вид растений табака контрольной линии и трансгенной линии 1-3 (А, справа) и линии 1/2-25 (Б, справа)

Таблица 2

Морфометрия растений *N. tabacum*

Линия	Высота побега, см	Число междоузлий (для каждого побега отдельно)	Средняя длина междоузлия
Контроль	134	18	7,4
Трансгенный контроль	108	17	6,3
1/2-25	93,5; 93,5	24, 24	3,9
1/2-2	113; 113	17, 23	6,6; 4,9
1-24	125	18	6,9
1-47	95; 66	22, 19	4,3
1-3	58,5; 58,5; 58,5	20, 18, 21	2,9; 3,25; 2,8
1/2-5	107	21	5,1

Таблица 3

Относительная мужская стерильность у трансгенных растений табака

Линия	Доля стерильных пыльцевых зерен, %
Контроль	0
Трансгенный контроль	18,5
1/2-25	8,9
1/2-2	31,8
1-24	9,9
1-47	24,6
1-3	52,1
1/2-5	6,1

тивировалась в стерильной среде параллельно с опытными линиями, не выявлено нарушений фертильности пыльцы. Следовательно, именно процесс трансформации оказал влияние на жизнеспособность пыльцы. Причиной повышения доли стерильной пыльцы у трансформированных растений по срав-

Рис. 2. Пыльца растений *N. tabacum*, окрашенная ацетокармином. В люминесцентном микроскопе использовалось увеличение $\times 10$. Стрелкой указано стерильное пыльцевое зерно

нению с нетрансгенным контролем могут быть нарушения как в процессе мейотического деления клеток, спровоцированного вставкой конструкции в геном, так и сбои в микроспорогенезе [8].

Определение наличия инсерции Т-ДНК

Для проверки устойчивости растений к гербициду проростки на стадии семядолей, полученные из семян, подвергнувшихся трансформации, и контрольных растений были обработаны гербицидом фосфинотрицином. Все они оказались неустойчивы к гербициду, что указывает на отсутствие активности гена устойчивости *bar*.

Для проверки наличия экспрессии гена *ICE2* использовался метод ПЦР продуктов обратной транскрипции с праймерами к данному гену. Однако экспрессия гена не была обнаружена. С помощью ПЦР-анализа с праймерами к гену *bar* данные линии были также тестированы на наличие инсерции маркерного гена. В двух опытах в качестве матрицы использовалась геномная ДНК либо кДНК, полученная путем обратной транскрипции РНК, что также дало отрицательный результат.

Поскольку ранее при отборе трансформированных растений ПЦР-анализ показывал наличие гена устойчивости к гербициду, можно заключить, что инсерция была утрачена.

Обсуждение

Нами были выявлены отличия растений табака, подвергнувшихся агробактериальной трансформации, от контрольного растения по целому ряду показателей как морфологических, так и затрагивающих репродуктивную сферу растения и, возможно, процессы роста и развития. Добавляемые в искусственную среду гормоны могли оказывать влияние на процессы роста и дифференцировки тканей, однако в данном эксперименте гормоны не использовались, что исключает данное предположение.

Другой возможной причиной наблюдаемых фенотипических изменений могло служить влияние маркерного гена устойчивости к фосфинотрицину *bar*. Место встраивания трансгена случайно, поэтому может происходить замолкание или нарушение экспрессии генов, транскрипционное или трансляционное слияние с маркерным геном, ремоделирование хроматина (эффект положения). Возможно также проявление плейотропных эффектов маркерного гена, не зависящих от места инсерции. Эти эффекты затрудняют анализ трансгенных растений и могут привести к ложным выводам. Некоторые гены селективных маркеров, такие как ген неомицин фосфотрансферазы II (*nptII*), не оказывают влияния на транскриптом трансгенного растения, другие, такие как ген *bar*, имеют плейотропное действие [13]. В проведенном недавно исследовании вли-

яния гена *bar* на транскриптом трансгенных растений методом *microarray* выявлены изменения экспрессии генов у трансгенных растений *Arabidopsis thaliana*, причем у растений разных линий была изменена экспрессия разных генов [14]. Однако проведенный нами анализ указал на отсутствие инсерции гена *bar*, что заставляет искать другое объяснение наблюдаемым явлениям.

В литературе имеются данные об изменениях роста [8] и мужской стерильности [15] растений, которые прошли процедуру трансформации, включавшую этап культивирования клеток *in vitro*. Существует мнение, что именно поддержание культуры, а не интеграция трансгена, приводит к вариабельности. Однако нельзя исключать и возможные мутации, спровоцированные сбоем механизмов репарации при введении сложной конструкции вектора в геном. Очевидно, геном растения претерпевает изменения. Например, показано, что характер метилирования ДНК высоко полиморфен среди регенерантов и в их потомстве [16]. Эту теорию подтверждает также эксперименты по получению трансгенных растений без использования клеточной дедифференцировки из каллуса, например путем инфекции цветков. В этом случае изменений генома не наблюдалось [17]. Однако в данной работе все трансгенные растения длительно поддерживались *in vitro*, но контрольные растения, которые не подвергались трансформации, а поддерживались в культуре так же длительно, как и трансформированные, не показывали изменений морфологии и стерильности пыльцы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Данилова С.А. Методы генетической трансформации зерновых культур // Физиол. раст. 2007. Т. 54. С. 645—658.
2. Sugui J.A., Chang Y.C., Kwon-Chung K.J. Agrobacterium tumefaciens mediated transformation of *Aspergillus fumigatus*: an efficient tool for insertional mutagenesis and targeted gene disruption // Appl. Environ. Microbiol. 2005. Vol. 71. P. 1798—1802.
3. Дейнеко Е.В., Новоселя Т.В., Загорская, Филипенко Е.А., Пухначева Н.В., Шумный В.К. Инактивирование чужеродных генов в геноме трансгенных растений // Изучение генома и генетическая трансформация растений. Новосибирск: Наука, 2001. С. 132—142.
4. Еникеев А.Г., Копытина Т.В., Семенова Л.А., Натяганова А.В., Гаманец Л.В., Волкова О.Д. Агробактериальная трансформация как комплексный биологический стрессирующий фактор // J. of Stress Physiology and Biochemistry. 2008. Vol. 4. N 1. P. 11—19.
5. Cassels A.C., Curry R.F. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers // Plant Cell Tissue Organ. Cult. 2001. Vol. 64. P. 145—167.
6. Cnops G., den Boer B., Gerats A., Van Montagu M., Van Lijsebettens M. Chromosome landing at the Arabidopsis TORNADO1 locus using an AFLP-based strategy // Mol. Gen. Genet. 1996. Vol. 253. P. 32—41.
7. Ngezahayo F., Dong Y., Liu B. Somaclonal variation at the nucleotide sequence level in rice (*Oryza sativa* L.) as revealed by RAPD and ISSR markers, and by pairwise sequence analysis // J. Appl. Genet. 2007. Vol. 48. P. 329—336.
8. Дейнеко Е.В. О потенциальных возможностях использования Т-ДНК почвенных бактерий // Вестн. ВОГиС. 1998. № 4. С. 4.
9. Daud N., Taha R.M., Hasbullah N.A. Studies on plant regeneration and somaclonal variation in *Saintpaulia ionantha* Wendl. (African violet) // Pak. J. Biol. Sci. 2008. Vol. 11. P. 1240—1245.
10. Тарасов В.А., Хадеева Н.В., Мельник В.А., Ежова Т.А., Шестаков С.В. Ген Atlg12860 *Arabidopsis thaliana*, детерминирующий антимикробную кателицидинподобную активность // Докл. РАН. 2009. Т. 427. С. 139—141.
11. Dellaporta S.L., Wood J., Hicks J.B. A plant DNA miniprep: version II // Plant Mol. Biol. Rep. 1983. Vol. 1 P. 19—21.
12. Паушева З.Л. Практикум по цитологии растений. М.: Колос, 1980. 304 с.
13. Brian M., Abdeen A., Manabe Y., MacDonald P. Selectable marker genes and unintended changes to the plant transcriptome // Plant Biotechnol. J. 2009. Vol. 7. P. 211—218.
14. Abdeen A., Miki B. The pleiotropic effects of the bar gene and glufosinate on the Arabidopsis transcriptome // Plant Biotechnol. J. 2009. Vol. 7. P. 266—282.

* * *

Авторы благодарят профессора кафедры генетики биологического факультета МГУ Татьяну Анатольевну Ежову за всестороннюю помощь и поддержку.

15. Дубровная О.В., Лялько И.И., Губанова Н.Я. Соматоклональная изменчивость растений сахарной свеклы по признаку стерильности пыльцы // Цитология и генетика. 2004. Т. 38. № 5. С. 24—29.

16. Kaeppler Sh.M., Kaeppler H.F., Rhee Y. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants // Plant Molecular Biol. 2000. Vol. 43. P. 179—188.

17. Labra M., Vannini C., Grassi F., Bracale M., Balsemin M., Basso B., Sala F. Genomic stability in *Arabidopsis thaliana* transgenic plants obtained by floral dip // Theor. Appl. Genet. Nov. Vol. 109. P. 1512—1518.

Поступила в редакцию
28.01.2010

SOMACLONAL VARIATIONS OF THE *NICOTIANA TABACUM* TRANSGENIC PLANTS

A.S. Kurbidaeva, M.G. Novokreshchenova

There are difficulties in studying of transgenic plants which associate with the instability of transformation, the inactivation of insertion and the derivation of somaclonal variants. This study describes the lines of tobacco plants, which were obtained by agrobacterial transformation and subsequent micropropagation in sterile conditions. Plants are characterized by dwarf length, increased proportion of sterile pollen grains and the lack of insertion which was detected before.

Key words: *transformation, Nicotiana tabacum, somaclonal variation.*

Сведения об авторах

Курбидова Амина Султановна — студентка кафедры генетики биологического факультета МГУ. Тел. (495)939-54-90; e-mail: amina.kur@gmail.com

Новокрещёнова Мария Габриэловна — канд. биол. наук, ст. преподаватель кафедры биотехнологии биологического факультета МГУ. Тел. (495)939-54-90; e-mail: maria.novok@gmail.com