

УДК 581.1:577.214.625:578.853

Е.В. МИХАЙЛОВА^{1,*}, Б.Р. КУЛУЕВ^{1,2}

¹ФГБУ ВПО «Башкирский государственный университет», Уфа, 450076

²ФГБНУ «Институт биохимии и генетики» Уфимского научного центра РАН (ИБГ УНЦ), Уфа, 450054

e-mail: mikhele@list.ru

Создание трансгенного рапса (*Brassica napus* L.) с конститутивной экспрессией гена *ARGOS-LIKE Arabidopsis thaliana* методом погружения цветков

В данной работе методом погружения цветков нами были получены трансгенные растения рапса, способные к сверхэкспрессии гена *ARGOS-LIKE Arabidopsis thaliana*. Частота трансформации рапса сортов Нанпа и Ратник составила в среднем 10%. У трансгенных растений рапса наблюдалось увеличение длины стебля в среднем на 27%, длины листьев на 58%, ширины листьев на 40%, цветков на 22%, объема семян на 23% и массы семян на 29% по сравнению с аналогичными показателями контрольных растений дикого типа. Площадь клеток нижнего эпидермиса листьев трансгенных растений увеличивалась в среднем на 18% по сравнению с контролем. Показано, что ген *ARGOS-LIKE A. thaliana* в сочетании с промотором вируса мозаики георгина может быть использован для увеличения размеров органов рапса.

Ключевые слова: ген *ARGOS-LIKE*, погружение цветков, промотор вируса мозаики георгина, рапс, трансгенные растения, *Brassica napus* L.

Рапс — одна из наиболее перспективных сельскохозяйственных культур в условиях российского климата, используемая как в пищевых, так и в технических целях. 25 из 32 одобренных к коммерческому возделыванию биотехнологических сортов рапса устойчивы к гербицидам [1], что в связи с быстрым формированием резистентности у сорных растений позволяет повысить урожайность лишь в краткосрочной перспективе. Поэтому поиск новых альтернативных подходов к повышению продуктивности рапса за счет его собственных внутренних ресурсов или привнесения различных трансгенов, которые могут оказывать влияние на параметры роста, становится все более ак-

туальным [2]. Для эффективного поиска наилучших способов повышения продуктивности рапса необходимо разрабатывать и применять легковоспроизводимые, универсальные и низкочастотные методы трансформации его генома, позволяющие в короткие сроки получать большое количество вариантов и линий трансгенных растений рапса, которые могут быть использованы для всестороннего изучения влияния экспрессии различных трансгенов на продуктивность этой культуры.

На сегодняшний день наиболее распространенным методом получения трансгенного рапса является агробактериальная трансформация семядольных черешков [3, 4] и гипокотилей [5, 6].

Михайлова Елена Владимировна, Кулуев Булат Разяпович.

Список сокращений: 6-БАП — 6-бензиламинопурин; ОТ-ПЦР — ПЦР с использованием обратной транскриптазы; п.н. — пар нуклеотидов; ПАВ — поверхностно-активное вещество; ПЦР — полимеразная цепная реакция.

* Автор для переписки.

Хотя за более чем десять лет использования данного метода частоту трансформации удалось повысить до 25%, он остается довольно сложным и ресурсоемким из-за необходимости работы в культуре *in vitro*. Следует также отметить, что данная методика включает процесс регенерации побегов из недифференцированной ткани, поэтому для различных сортов рапса каждый раз приходится подбирать оптимальное сочетание фитогормонов.

Альтернативой является так называемый метод погружения цветков рапса в агробактериальную суспензию, осуществляемый *in vivo* [7]. Этот метод был предложен как более экономичный и обеспечивающий большую производительность и впервые был применен ранее для получения трансгенного *A. thaliana* [8]. Позднее метод стал применяться также для других растений, в том числе и рапса. Несмотря на частоту трансформации рапса на уровне всего лишь 2—3% [9] отсутствие необходимости манипуляций в культуре *in vitro* позволяет получить больше трансгенных растений и в более короткие сроки [10]. Изменение состава агробактериальной суспензии для погружения цветков может повысить эффективность метода вплоть до уровня, достигаемого при трансформации семядольных черешков и гипокотилей.

С учетом экологических рисков возделывания устойчивых к гербицидам трансгенных растений [11] более безопасными представляются генно-модифицированные сорта с новыми признаками, не дающими эволюционных преимуществ, например, сорта растений, продуктивность которых повышается за счет увеличения размеров органов или других параметров роста.

Размеры органов растений контролируются двумя основными механизмами: регуляции клеточного деления и роста клеток в апикальных меристемах, зачатках и растущих органах [12, 13]. Недавно было показано, что важную роль в координации процессов клеточного деления и растяжения выполняют белки, содержащие OSR-домен [14]. У *A. thaliana* обнаружено и изучено четыре гена, кодирующих белки данной группы, а именно, *ARGOS*, *ARGOS-LIKE*, *OSR1* и *OSR2* [14, 15—17]. Ген *ARGOS-LIKE (ARL)* *A. thaliana* кодирует трансмембранный белок, локализованный в эндоплазматическом ретикулуме и участвующий в передаче сигналов от фитогормонов к геному [14]. К настоящему времени известно лишь то, что сигналы к белку ARL поступают преимущественно от брассиностероидов и передаются гену *TCH4 (AtXTH22)*, кодирующему одну из ксиланэндотрансгликозилаз *A. thaliana* [16]. В свою

очередь, эти ферменты принимают участие в растяжении клеточной стенки при росте клеток [18]. Сверхэкспрессия гена *ARL* способствует увеличению размеров надземных органов трансгенного растения *A. thaliana* за счет положительного влияния на рост клеток за счет растяжения [16]. Ранее нами были получены трансгенные растения табака, осуществляющие сверхэкспрессию гена *ARL* под контролем 35S-промотора [19], которые характеризовались увеличением размеров листьев и стебля в среднем на 15—25% по сравнению с контролем преимущественно за счет укрупнения отдельных клеток. Нами было показано, что ген *ARL*, а также гомологичный ему ген *ARGOS* эффективны в гетерологичных условиях и, видимо, могут быть использованы для получения различных трансгенных растений с увеличенными размерами органов [19, 20]. Однако фенотипические проявления повышенной экспрессии генов данной группы на примере рапса до сих пор не изучались, тогда как именно для этой культуры увеличение размеров листьев, стебля, цветков, плодов и семян особенно актуально, поскольку вся его надземная часть находит то или иное применение в различных отраслях промышленности, в частности, зеленая масса и отходы маслопроизводства используются в качестве кормов для сельскохозяйственных животных.

Целью настоящей работы было проведение агробактериальной трансформации ярового рапса сортов Нанна и Ратник конструкцией гена *ARL A. thaliana*, находящегося в бинарном векторе pCambia 1301 под контролем конститутивного промотора вируса мозаики георгина [21], методом погружения цветков без использования стадий культивирования *in vitro*.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Бактериальные клетки, штаммы, плазмиды, генно-инженерные манипуляции. В работе использовали бактерии *Echerichia coli*, штамм XL1-Blue, и *Agrobacterium tumefaciens*, штамм AGL (Коллекция микроорганизмов ИБГ УНЦ). При создании генно-инженерных конструкций использовали T-вектор pKRX и бинарный вектор pCambia 1301 с геном устойчивости к гигромицину (CAMBIA, Австралия). Плазмидную ДНК выделяли методом щелочного лизиса бактериальных колоний, используя наборы фирмы «Цитокин» (Россия). Геномную ДНК *Arabidopsis thaliana* и рапса выделяли методом солевой экстракции [22]. Ген *ARL* был амплифицирован при помо-

щи *Pfu*-полимеразы («Биоскрин», Россия) из геномной ДНК *A. thaliana* при помощи праймеров ARLF — 5'-СТТСТТТАААТГАТТСТГТГАГ-3' и ARLR — 5'-ТТАТТАСАТАААААГТГГААГ-3'. Для подбора праймеров и амплификации гена *ARL A. thaliana* была использована последовательность гена, зарегистрированная в GenBank под номером NM_180078.3. Размер ампликона составил 420 п.н.; он включал кроме открытой рамки считывания участок ДНК, кодирующий лидерный пептид, необходимый для перемещения белка ARL через мембрану эндоплазматического ретикулума [14]. Ампликон был клонирован в фагмидном Т-векторе рKRX, а затем секвенирован. Секвенирование проводили на автоматическом анализаторе нуклеиновых кислот ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Поиск гомологичных генов осуществляли при помощи программ MegAlign пакета Lasergene (DNASTAR, США) и программы MegaBlast, доступной через сайт <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Далее в вектор pCambia 1301 последовательно были клонированы промотор вируса мозаики георгина (по сайтам *EcoRI* и *KpnI*) и сигнал полиаденилирования 35S polyA (по сайтам *SmaI* и *PstI*). *BsePI*-фрагмент вектора рKRX, несущий последовательность гена *ARL*, был обработан T4-ДНК-полимеразой для достройки липких концов и далее клонирован в векторе pCambia 1301, предварительно гидролизованном ферментом рестрикции *SmaI*. Поиск клонов со смысловой ориентацией целевых генов осуществляли при помощи комбинации праймеров DMVF 5'-АТСААСGGAGAAACA-AAGAT-3', специфичных к промотору вируса мозаики георгина, 1301R 5'-TGCTCTAGCATTCGССАТТС-3', специфичного к 35S polyA, а также праймеров ARLF и ARLR (см. выше).

Получение трансгенных растений рапса и условия выращивания растений. Трансгенные растения рапса (*Brassica napus* L. сортов Ратник и Hanna) получали методом погружения цветков (floral dip). Рапс сеяли на грунт в теплице в начале мая. Агробактериальную трансформацию осуществляли начиная с момента перехода к стадии бутонизации (середина июля) и до наступления периода интенсивного цветения (начало августа). Агробактерии, содержащие целевую генно-инженерную конструкцию, заранее выращивали в течение 1 сут на среде Лурия—Бертани при температуре 27°. Далее их центрифугировали в течение 10 мин при 1000 g, осветленную питательную среду удаляли, а осадок ресуспендировали в растворе, содержащем 0,075 мкМ ацетосирингон

(Sigma-Aldrich, США), 0,1% сильвета Gold (Chemtura, США), 100 нг/л 6-бензиламинопурина (6-БАП) и 30 г/л сахарозы. Основные изменения в составе суспензии, предложенной Li и др. [9], в нашей работе коснулись концентрации ацетосирингона и 6-БАП.

Соцветия рапса с бутонами и молодыми цветками погружали в агробактериальную суспензию (50 мл) на 1—2 мин и затем заворачивали в полиэтиленовую пленку на 1 сут для предотвращения высыхания. Таким образом было обработано 41 соцветие рапса сорта Ратник и 23 соцветия сорта Hanna. После созревания семян их собирали ручным способом.

Первичный отбор по фенотипу трансгенных проростков из полученных семян осуществляли после их обработки селективным антибиотиком гигромицином (Gold Biotechnology, США). Для этого семена замачивали в течение суток в растворе гигромицина в концентрации 100 мг/л. После этого семена без предварительной обработки и промывки высаживали в четырехлитровые емкости (по 100 семян в каждой) с грунтом Terra Vita (Россия). Емкости помещали в климатикаммеру Binder (Германия) при температуре 23° с освещенностью 7000 люкс и фотопериодом 16/8 ч (свет/темнота). Аналогично обработанные гигромицином семена высаживали также и при естественном освещении в теплицу в мае. Всхожесть семян составляла в среднем 80% как для опытных растений, так и для рапса, не подвергавшегося трансформации, что является нормой для этой культуры [23].

Предполагаемые трансгенные проростки отбирали визуально: неустойчивыми к гигромицину считались растения с побелевшими первыми настоящими листьями. В фазе семядольных листьев побеление у обоих использованных в работе сортов рапса не наблюдалось даже при повышении концентрации гигромицина в 5 раз и увеличении времени замачивания в растворе антибиотика до 2 сут. Отсутствие побеления листьев при действии гигромицина служило основным доказательством трансгенности полученных в ходе работы растений рапса, а ПЦР-анализ использовали лишь в качестве ее дополнительного подтверждения.

ПЦР-анализ трансгенных растений рапса. На стадии появления первых настоящих листьев из оставшихся полностью зелеными проростков рапса выделяли ДНК методом солевой экстракции и подвергали полученные образцы ПЦР-анализу на присутствие целевого гена *ARL*, а также промотора вируса мозаики цветной капусты

(35S-промотор). Этот промотор располагается в Т-ДНК вектора pCambia 1301, где контролирует экспрессию гена устойчивости к гигромицину. Для ПЦР-идентификации гена *ARL* использовали праймеры ARLPCRFL — 5'-ТСТАСААААСГАС-АТСАТААААСАТ-3' и ARLPCRRL — 5'-АСАТАА-ААГТГГААГААГААГААА-3'. Для поиска 35S-промотора, содержащегося в Т-ДНК вектора pCambia 1301, применяли праймеры 35SF — 5'-ССТААСАГААСТСГССГТАААГАС-3' и 35SR — 5'-ТТГСГААГГАТАГТГГГАТТГТГ-3'.

Полуколичественная ОТ-ПЦР. Содержание транскриптов целевого гена в трансгенных растениях рапса оценивали с помощью полуколичественной ОТ-ПЦР. Для этого тотальную РНК из листьев исследуемых растений выделяли с тризолом («Биоскрин», Уфа), первую цепь кДНК строили при помощи олиго(dT) праймера и MMuLV-ревертазы (NEB, США). Для ОТ-ПЦР гена *ARL* использовали праймеры 5'-GGAGATC-АТААССГГАААААСАСГАГТ-3' и 5'-АГААГА-АГГСАТГАААГСААГААССА-3'. В качестве референсного использовали ген, кодирующий актин рапса (AF111812). Для ОТ-ПЦР мРНК гена, кодирующего актин рапса, использовали праймеры ActF — 5'-GTGCCGATCTACGAAGGT-3' и ActR — 5'-TCAGGGCAACGGAATCT-3'.

Морфологическая характеристика трансгенных растений рапса. Морфологический анализ опытных и контрольных растений рапса проводили на стадии цветения в конце июня. Для этого определяли длину стебля, длину (от кончика листа до места его соединения со стеблем) и ширину трех самых крупных нижних листьев. Измеряли также длину стручков и венчиков и площадь нижних клеток эпидермиса верхних листьев. После созревания семян измеряли их массу и объем.

Площадь клеток эпидермиса листьев определяли при помощи универсального флуоресцентного микроскопа модели Axio Imager M1 (Carl Zeiss, Германия) с использованием оригинального программного обеспечения. Исследовали верхние листья цветущих растений со средней площадью 20 см², поскольку размеры нижних листьев варьировали; тем не менее, площадь клеток в нижних и верхних листьях одних и тех же растений существенно не различалась.

Статистический анализ проводили при помощи программ Statistica 6.0 и MS Excel 2003. Для оценки морфометрических различий между выборками контрольной и опытной групп растений использовали U-критерий Манна—Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение трансгенных растений рапса методом погружения цветков и отбор предполагаемых трансгенных форм по фенотипу

Полученные семена рапса после обработки агробактериальной суспензией подвергали действию селективного антибиотика гигромицина и проращивали в климатикамере или в условиях естественного освещения в теплице. У контрольных нетрансгенных растений рапса в условиях климатикамеры наблюдалось 100%-ное побеление первых настоящих листьев. Из проростков семян трансформированных растений в тех же условиях полностью зелеными оставались 10—15% (рис. 1). Из них для дальнейших экспериментов было отобрано 66 растений сорта Ратник и 25 растений сорта Нанна. У проростков в теплице изменений в цвете листьев практически не наблюдалось, что существенно усложняло отбор. Отобраные по зеленому цвету первых листьев растения в дальнейшем подвергали ПЦР-анализу.

Оказавшиеся трансгенными проростки сорта Нанна пересаживали в пятилитровые емкости и выращивали в условиях искусственного освещения (27°, освещенность 5000 люкс, фотопериод 16/8 ч (свет/темнота)) до стадии созревания семян. Трансгенные проростки сорта Ратник пересаживали в теплицу во второй неделе мая, поскольку предварительные опыты показали, что данный сорт не зацветает в тех же условиях искусственного освещения, что и применяемые нами для сорта Нанна. Итоговая густота посадки рапса сорта Ратник в теплице составляла приблизительно 35 растений на 1 м².

Отбор трансгенных растений рапса с помощью ПЦР-анализа

Дальнейший отбор трансгенных растений проводили путем ПЦР-идентификации целевого гена *ARL* и 35S-промотора. В контрольных нетрансгенных растениях рапса специфичные ампликоны при ПЦР не образовывались. Методом ПЦР в целом была проанализирована ДНК 115 растений, отобранных по фенотипу на первом этапе работы: 90 растений сорта Ратник (из них 66 проращивали при искусственном освещении, а 24 — в теплице при естественном освещении) и 25 растений сорта Нанна (рис. 2). Из-за неточности визуального отбора только 3 из 24 растений, выращенных при

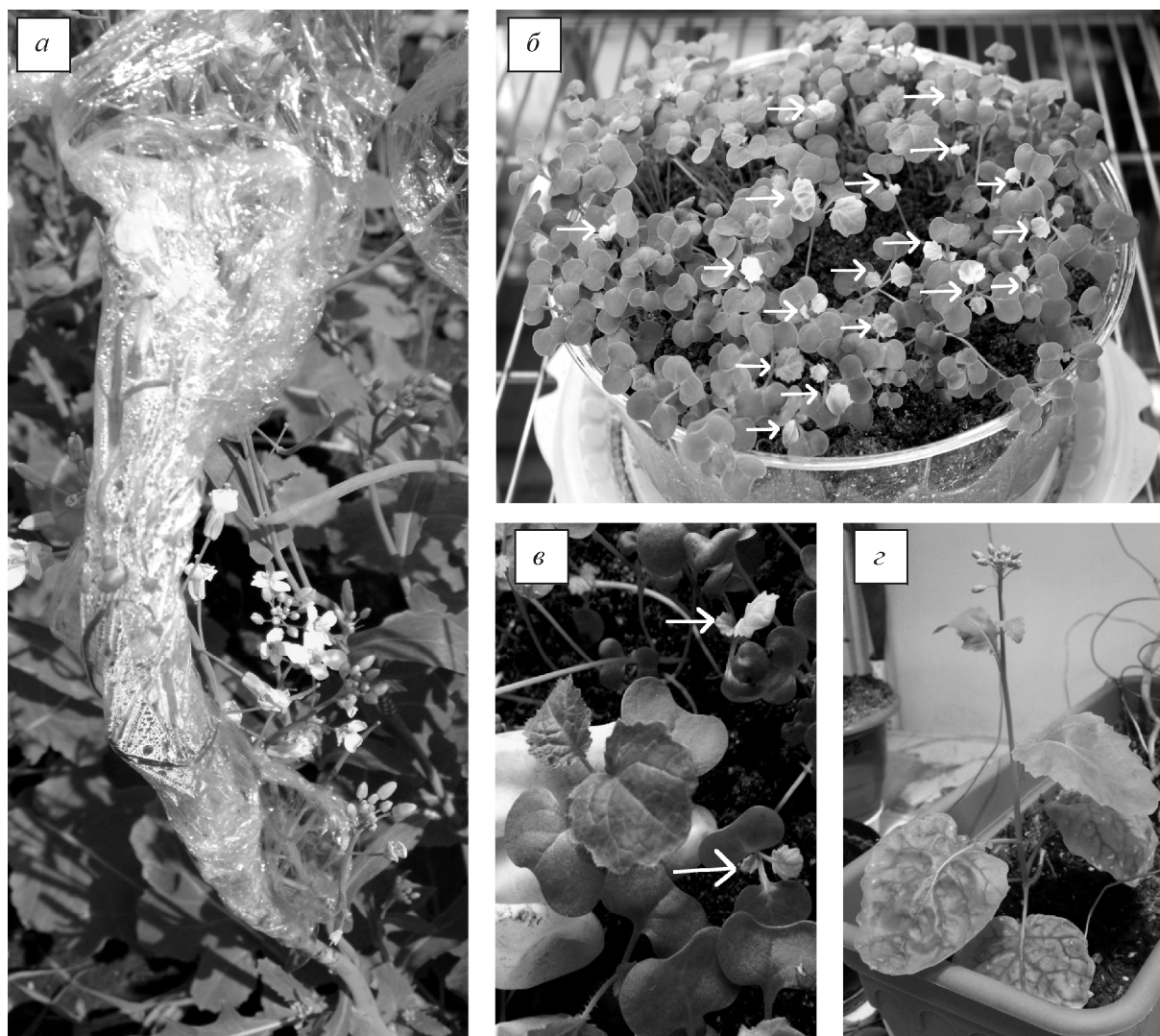


Рис. 1. Трансформация рапса методом погружения цветков: *a* — соцветие после инокуляции агробактериальной суспензией; *б, в* — побеление первых настоящих листьев у нетрансгенных растений; *г* — цветение трансгенного рапса сорта Hanna в условиях искусственного освещения

естественном освещении, оказались трансгенными. Из всех проростков, полученных при искусственном освещении, трансгенными оказались 59 растений сорта Ратник и 20 сорта Hanna. Таким образом, в условиях искусственного освещения точность визуального выявления трансгенных проростков среди всходов рапса по цвету первых листьев составила более 80%, а при высаживании семян в открытый грунт эта точность снизилась до 13%. Всего с применением генно-инженерной конструкции гена *ARL* с промотором вируса мозаики георгина было получено 82 трансгенных растения, отобранных на первом этапе по фенотипу и на втором этапе путем ПЦР-идентификации целевого гена и 35S-промотора.

После начала цветения трансгенные и контрольные растения подвергали морфологическому анализу.

Сравнительная морфологическая характеристика трансгенных растений рапса, экспрессирующих ген *ARL A. thaliana*

Для морфологического анализа были выбраны растения сорта Ратник с относительно высоким уровнем экспрессии целевого гена *ARL* (рис. 3), высаженные рассадой в теплице и доведенные до цветения и образования семян. Высокий уровень содержания транскриптов целевого гена в тканях

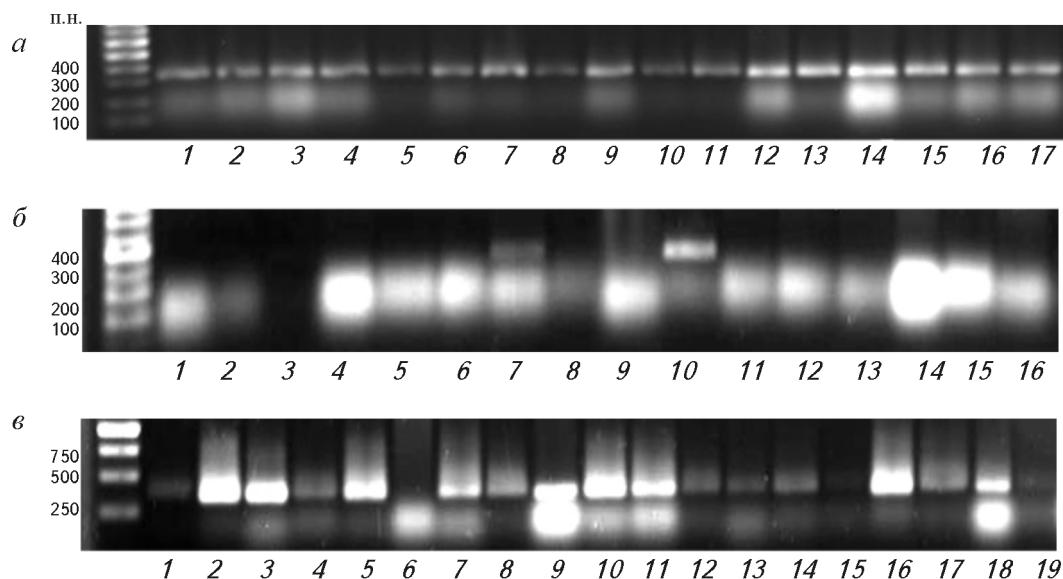


Рис. 2. Электрофореграмма результатов ПЦР-анализа (слева — маркер молекулярной массы («Сибэнзим», Россия)): *a* — 35S-промотор (450 п.н.) в отобранные визуально растения рапса, выращенные в условиях искусственного освещения; *б* — ген *ARL* (386 п.н.) в отобранных визуально как трансгенных растениях рапса, выращенных в условиях естественного освещения; *в* — ПЦР-идентификация гена *ARL* (386 п.н.) в отобранных визуально растениях рапса, выращенных в условиях искусственного освещения. Дорожки 1—19 — номера растений

листьев рапса служил еще одним доказательством трансгенности полученных в ходе работы растений рапса. В качестве контрольных были использованы нетрансгенные растения рапса того же сорта. Всего морфологическому анализу было подвергнуто 30 трансгенных растений сорта Ратник. Сорт Наппа для морфологического анализа не использовали.

В целом трансгенные растения рапса характеризовались увеличенными размерами вегетативных органов, в первую очередь, листьев и стебля. В наибольшей степени увеличивалась длина нижних листьев (рис. 4, *a*).

Размеры стебля контрольных растений (в среднем 85,6 см) находились в пределах средних

значений для сорта Ратник (84—119 см) [24], а у опытных растений стебли были длиннее, чем у контрольных в среднем на 27% (см. рис. 4, *в*); максимальное же увеличение было характерно для растения №2 и составило 87% (данные не приведены). В целом длина стеблей каждого из 8 трансгенных растений превышала 119 см. Размеры листьев коррелировали с длиной стебля: например, в среднем длина листьев увеличивалась на 58%, а ширина — на 40%; у растений с наиболее длинными стеблями наблюдалось увеличение длины листьев на 125% и двукратное увеличение ширины листьев.

Для выяснения возможных причин увеличения размеров органов нами были проведены микроскопические исследования клеток эпидермиса

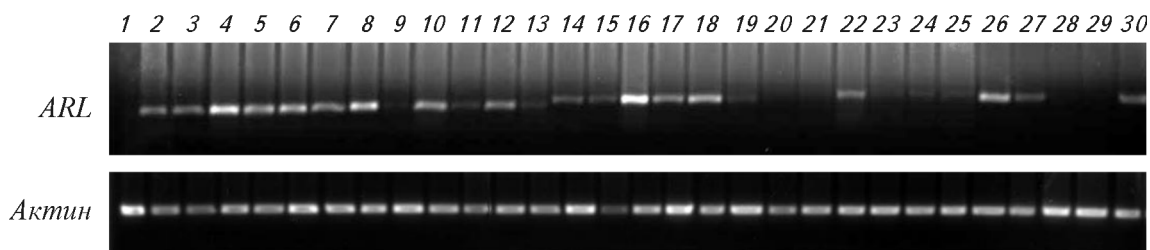


Рис. 3. Определение содержания транскриптов целевого гена *ARL* в трансгенных растениях сорта Ратник: дорожка 1 — контрольное нетрансгенное растение рапса сорта Ратник; дорожки 2—30 — трансгенные растения рапса, содержащие в геноме ген *ARL A. thaliana*; 2—8, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 22, 26, 27 и 30 — образцы, характеризующиеся высоким уровнем содержания транскриптов гетерологичного гена *ARL* и отобранные для морфологического анализа. В нижней части рисунка представлены данные по референсному гену актина, уровень экспрессии которого остается постоянным во всех тканях при изменении условий

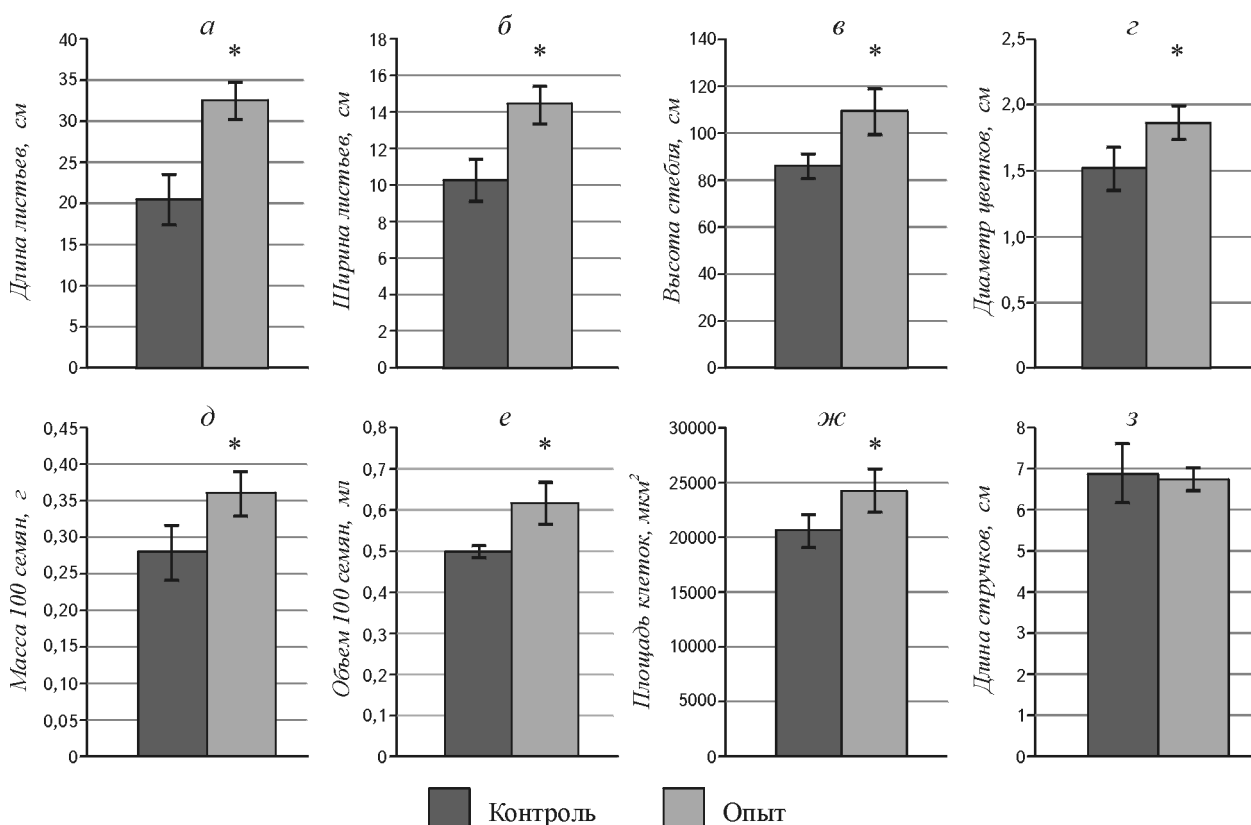


Рис. 4. Морфологические параметры трансгенных и контрольных растений рапса сорта Ратник: *а* — длина листьев в период цветения, см; *б* — ширина листьев в период цветения, см; *в* — высота стебля, см; *г* — диаметр венчиков цветков, см; *д* — масса 100 семян, г; *е* — объем 100 семян, мл; *ж* — площадь клеток нижнего эпидермиса листьев, мкм²; *з* — длина стручков, см. * — различия статистически достоверны

листьев. Размеры органов трансгенных растений могли увеличиваться как за счет возрастания размеров отдельных клеток [16], так и за счет стимулирования клеточного деления [15]. Было показано, что увеличение размеров вегетативных органов не сопровождалось столь же существенным увеличением площади клеток нижнего эпидермиса листьев. В среднем размеры клеток увеличивались только на 18% (см. рис. 4, *ж*), тогда как разме-

ры листьев увеличивались более существенно (см. рис. 4, *а, б*). При этом у растений с наиболее крупными размерами клеток (увеличение до 68%) (рис. 5) не наблюдалось существенное изменение размеров стебля и листьев по сравнению с контролем. Таким образом, увеличение размеров органов у трансгенных растений рапса, вероятно, в большей степени было вызвано увеличением количества клеток, а не их размеров.

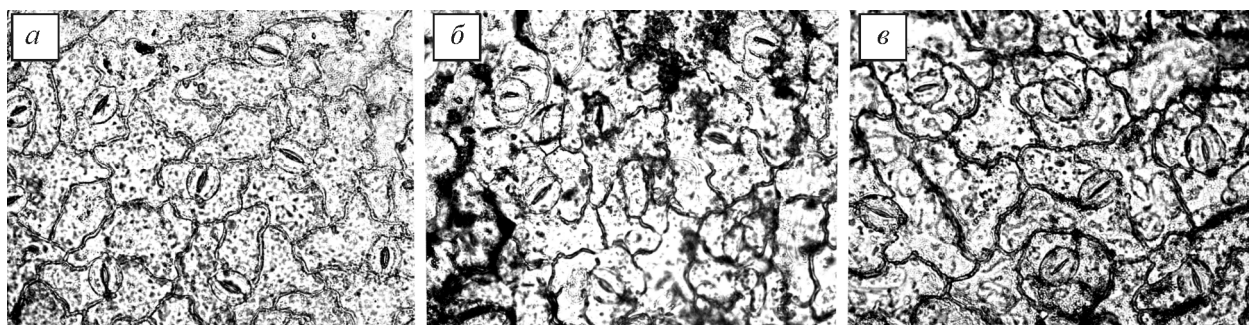


Рис. 5. Клетки нижнего эпидермиса листьев нетрансгенного (*а*) и трансгенного (*б, в*) рапса сорта Ратник: *б* — мелкие клетки; *в* — крупные клетки

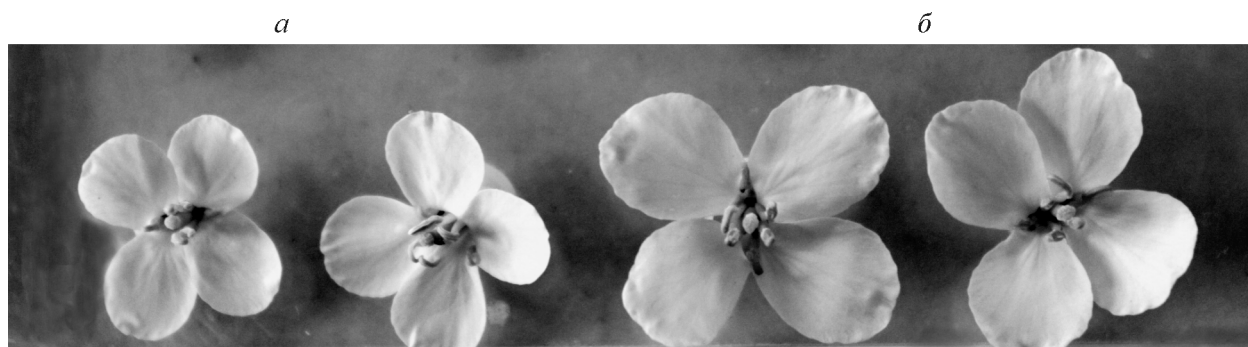


Рис. 6. Размеры венчиков цветков рапса сорта Ратник: а — контрольное растение; б — трансгенное растение № 36

У трансгенных растений было также зафиксировано увеличение диаметра венчика цветков в среднем на 22% (см. рис. 4, з); при этом у растений с самыми крупными размерами стебля и листьев наблюдалось увеличение диаметра цветков на 38% (рис. 6).

Увеличивались также масса и объем семян трансгенных растений. Средняя масса 100 семян нетрансгенного рапса в зависимости от погодных условий составляла $0,28 \pm 0,024$ г [23], что нашло подтверждение и в нашем исследовании. Средняя масса семян трансгенных растений сорта Ратник составила 0,359 г, а у растения № 18 с наибольшим размером клеток нижнего эпидермиса листьев (34080 мкм^2), но без увеличения размеров вегетативных органов, — 0,47 г. Таким образом, уровень экспрессии гена *ARL*, вероятно, может оказывать влияние не только на площадь клеток листьев, но и на размер семян. В целом, у трансгенных растений рапса наблюдалось увеличение массы семян на 29%, а их объема на 23% по сравнению с таковыми у растений дикого типа. По длине стручков контрольные и трансгенные растения достоверно не различались (см. рис. 4, з).

Таким образом, погружение цветков является перспективным методом получения новых биотехнологических сортов растений и имеет серьезный потенциал для увеличения эффективности трансформации, что было показано нами на примере рапса. Различные модификации состава агробактериальной суспензии, вероятно, могут повысить успешность трансформации до уровня, характеризующего традиционные методы (агробактериальная трансформация семядольных черешков и гипокотилей) и даже превзойти ее. Метод погружения цветков, видимо, может быть полезен и для других видов растений: в частности, он применялся для резуховидки Таля [8], хлопчатника [25], амаранта [26] и др. Данный метод не содержит стадий работ в культуре *in vitro* и потому не требует высокого уровня квалификации и применения до-

рогостоящих реактивов. Эти преимущества метода погружения цветков не только делают более дешевым и доступным для неспециализированных лабораторий создание трансгенных растений, относящихся к разным видам, но и облегчают фундаментальные исследования в области функциональной геномики растений.

Оценка эффективности трансформации путем замачивания семян в растворе гигромицина имеет ряд преимуществ перед методами предварительного проращивания семян на селективной среде. Так, при этом, например, снижается расход антибиотика, вовсе не требуется стерильных условий, питательных сред, пересадок.

Однако этот метод для разных растений может иметь и некоторые недостатки. В нашей работе при высаживании замоченных в гигромицине семян в теплице при естественном освещении точность отбора трансгенных проростков по цвету первых листьев составила всего 13%, что практически соответствует достигнутой нами эффективности трансформации (10%). Следовательно, при таком подходе отбор трансгенных проростков при помощи обработки гигромицином не имеет смысла. Причиной нивелирования разницы в цвете первых листьев между трансгенными и нетрансгенными проростками, вероятно, могли служить естественное освещение и неоптимальная температура. Нами также было отмечено, что побеление первых настоящих листьев при проращивании семян в климатокамере при температуре 23° было более выраженным, чем в световой комнате при температуре 27° и намного более явным, чем в теплице (при естественном освещении не только летом, но и с ноября по февраль). В климатокамере наблюдалось 100%-ное побеление первых настоящих листьев контрольных нетрансгенных растений, семена которых были обработаны гигромицином. Следовательно, отбор трансгенных проростков лучше всего проводить в климатокамере при невысоких температурах (23°).

Поскольку увеличение концентрации гигромицина в 5 раз при обработке семян не оказало влияния на степень побеления листьев нетрансгенного рапса при естественном освещении, но и не снизило их жизнеспособность, имеет смысл увеличивать концентрацию антибиотика в 6 и более раз в дальнейших работах по трансформации рапса. Дополнительный фенотипический отбор трансгенных проростков, вероятно, можно также проводить после добавочного опрыскивания листьев растений водным раствором гигромицина в различных концентрациях с добавлением силвета или другого ПАВ.

Li и др. [9] предлагали дифференцировать трансгенные и нетрансгенные проростки по длине гипокотилей при содержании гигромицина непосредственно в почве в концентрации 100 мг/л, однако этот способ мы не применяли ввиду большого расхода гигромицина и невозможности его осуществления в теплице при посадке в грунт без использования специальных емкостей. К тому же, освещенность оказывает значительное влияние на длину гипокотыля, что может сказаться на эффективности отбора.

Сверхэкспрессия гена *ARL* в гомологичных условиях (т.е. при внедрении гена в то растение, из которого он был выделен) способствовала увеличению размеров органов за счет стимуляции роста клеток растяжением [15]. Конститутивная экспрессия того же гена в трансгенных растениях табака также способствовала увеличению размеров листьев и стебля за счет положительного влияния на размер клеток [19]. В то же время, ген *OsARGOS* риса, также кодирующий один из белков с *OSR*-доменом, влияет одновременно как на клеточное деление, так и на рост клеток растяжением [27]. Причем в гомологичных условиях ген *OsARGOS* вообще не оказывал существенного влияния на размеры органов трансгенного риса. На примере трансгенных растений *A. thaliana* показано, что сверхэкспрессия гена *ARGOS* риса и пекинской капусты увеличивает уровень экспрессии генов, участвующих как в делении клеток, так и в обеспечении клеточного растяжения [27, 28]. В нашем исследовании было показано, что сверхэкспрессия гена *ARL* способствует увеличению размеров органов рапса за счет влияния как на клеточное деление (в большей степени), так и на клеточное растяжение. Таким образом исходя из полученных и литературных данных можно предположить, что фенотипическое проявление сверхэкспрессии генов, кодирующих белки с *OSR*-доменом, зависит не только от гена, использованного в эксперименте, но и от вида трансформированного

растения. В целом изучение фенотипических проявлений сверхэкспрессии генов, кодирующих белки с *OSR*-доменом, приводит к мысли о тесной взаимосвязи систем регуляции клеточного деления и роста клеток растяжением. При этом сами данные белки, судя по всему, принимают участие в координации и клеточной пролиферации, и клеточного растяжения при росте органов [14].

Метод погружения цветков может быть успешно использован для трансформации рапса сортов *Hanna* и *Ратник*, однако для эффективного визуального отбора трансгенных проростков необходимо соблюдение определенных условий выращивания. Генно-инженерная конструкция, состоящая из гена *ARL* под управлением промотора вируса мозаики георгина, может быть использована для создания трансгенных растений рапса с увеличенными размерами листьев, стебля, цветков и семян.

Работа выполнена при поддержке гранта УМНИК, 1433ГУ1/2014.

Получено 11.09.15

ЛИТЕРАТУРА

1. James, C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2013 // ISAAA Brief. — Ithaca, NY, 2014. — № 46. <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/46/default.asp>
2. Liu, F. Enhanced seed oil content by overexpressing genes related to triacylglyceride synthesis / F. Liu, Y. Xia, L. Wu, D. Fu, A. Hayward, J. Luo, X. Yan, X. Xiong, P. Fu, G. Wu, C. Lu // Gene. — 2015. — V. 557. — P. 163—171.
3. Moloney, M.M. High efficiency transformation of *Brassica napus* using *Agrobacterium* vectors / M.M. Moloney, J.M. Walker, K.K. Sharma // Plant. Cell Reports. — 1989. — V. 8. — N 4. — P. 238—242.
4. Князев А.В. Генетическая трансформация рапса (*Brassica napus* L.) сорта *Hanna* с помощью *Agrobacterium tumefaciens* AGL0 / А.В. Князев, З.Р. Вершинина, А.Х. Баймиев, А.В. Чемерис // Сельскохозяйств. биол. — 2010. — № 5. — С. 49—54.
5. Cardoza, V. Increased *Agrobacterium*-mediated transformation and rooting efficiencies in canola (*Brassica napus* L.) from hypocotyl segment explants / V. Cardoza, Jr. C.N. Stewart // Plant. Cell Reports. — 2003. — V. 21. — N 6. — P. 599—604.
6. Cardoza, V., Stewart, Jr. C.N. Canola (*Brassica napus* L.): *Agrobacterium* Protocols. — Totowa: Humana Press, 2006. — P. 257—266. <http://link.springer.com/protocol/10.1385%2F1-59745-130-4%3A257>
7. Wang, W.C. Development of a novel *Agrobacterium*-mediated transformation method to recover transgenic *Brassica napus* plants / W.C. Wang, G. Menon, G. Hansen // Plant. Cell Reports. — 2003. — V. 22. — N 4. — P. 274—281.

8. Clough, S.J. Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* / S.J. Clough, A.F. Bent // *The Plant J.* — 1998. — V. 16. — N 6. — P. 735—743.
9. Li, J. A rapid and simple method for *Brassica napus* floral-dip transformation and selection of transgenic plantlets / J. Li, X. Tan, F. Zhu, J. Guo // *Intern. J. Biol.* — 2010. — V. 2. — N 1. — P. 127.
10. Verma, S.S. A simplified floral dip method for transformation of *Brassica napus* and *B. Carinata* / S.S. Verma, V. Chinnusamy, K.C. Bansa // *J. Plant. Biochem. Biotechnol.* — 2008. — V. 17. — N. 2. — P. 197—200.
11. Warwick, S.I. Gene flow, invasiveness, and ecological impact of genetically modified crops / S.I. Warwick, H.J. Beckie, L.M. Hall // *Annals New York Acad. Sci.* — 2009. — V. 1168. — N 1. — P. 72—99.
12. Gonzalez, N., Leaf size control: complex coordination of cell division and expansion / N. Gonzales, H. Vanhaeren, D. Inze // *Trends Sci.* — 2012. — V. 17. — P. 332—340.
13. Нургалеева Э.З. Морфологический анализ трансгенных растений табака, сверхэкспрессирующих ген *CLAVATA3 A. thaliana* / Э.З. Нургалеева, Б.Р. Кулуев // *Вестник Баш. ун-та.* — 2014. — Т.19. — №1. — С. 61—66.
14. Feng, G. *Arabidopsis ORGAN SIZE RELATED1* regulates organ growth and final organ size in orchestration with *ARGOS* and *ARL* / G. Feng, Z. Qin, J. Yan, X. Zhang, Y. Hu // *New Phytol.* — 2011. — V. 191. — P. 635—646.
15. Hu, Y. The *Arabidopsis* auxin-inducible gene *ARGOS* controls lateral organ size / Y. Hu, Q. Xie, N. Chua // *Plant Cell.* — 2003. — V. 15. — P. 1951—1961.
16. Hu, Y. The *Arabidopsis ARGOS-LIKE* gene regulates cell expansion during organ growth / Y. Hu, H. Poh, N. Chua // *Plant J.* — 2006. — V. 47. — P. 1—9.
17. Qin, Z. The *Arabidopsis ORGAN SIZE RELATED 2* is involved in regulation of cell expansion during organ growth / Z. Qin, X. Zhang, X. Zhang, G. Feng, Y. Hu // *BMC Plant Biol.* — 2014. — V. 14. — P. 349.
18. Miedes, E. Xyloglucan endotransglucosylase and cell wall extensibility / E. Miedes, I. Zarra, T. Hoson, K. Herbers, U. Sonnewald, E.P. Lorences // *J. Plant Physiol.* — 2011. — V. 168. — N 3. — P. 196—203.
19. Кулуев Б.Р. Влияние конститутивной экспрессии гена *ARGOS-LIKE* на размеры клеток и органов трансгенных растений табака / Б.Р. Кулуев, А.В. Князев, М.Г. Сафиуллина, А.В. Чемерис // *Генетика.* — 2013. — Т.49. — №5. — С. 587—594.
20. Кулуев Б.Р. Конститутивная экспрессия гена *ARGOS* в растениях табака под контролем промотора вируса мозаики георгина / Б.Р. Кулуев, А.В. Князев, А.А. Ильясова, А.В. Чемерис // *Физиол. раст.* — 2011. — Т. 58. — №3. — С. 443—452.
21. Кулуев Б.Р. Конструирование гибридных промоторов каулимовирусов и анализ их активности в трансгенных растениях / Б.Р. Кулуев, А.В. Князев, Я.П. Лебедев, А.А. Ильясова, А.В. Чемерис // *Физиол. раст.* — 2010. — Т. 57. — С. 623—632.
22. Aljanabi, S.M. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques / S.M. Aljanabi, I. Martinez // *Nucleic Acids. Res.* — 1997. — V. 25. — P. 4692—4693.
23. Гущина В.А. Изменение урожайности и качества маслосемян ярового рапса в зависимости от приемов возделывания и погодных условий / В.А. Гущина, А.С. Лыкова // *Вестник Алтайского гос. аграр. ун-та.* — 2011. — Т. 80. — №. 6. — С. 9—12.
24. Гориков В.И., Савенков В.П., Манаенков С.И. Каталог сортов масличных капустных культур селекции ГНУ ВНИИ рапса: яровой рапс, яровая сурепица, озимая сурепица, горчица белая. — Липецк: ГНУ ВНИИ рапса, 2013. — 36 с.
25. Zhang, T. Cotton pistil drip transformation method / T. Zhang, T. Chen // *Methods Mol. Biol.* — 2012. — V. 847. — P. 237—243.
26. Munusamy, U. Female reproductive system of *Amaranthus* as the target for Agrobacterium-mediated transformation / U. Munusamy, S.N.A. Abdullah, M.A. Aziz, H. Khazaai // *Adv. Biosci. Biotechnol.* — 2013. — V. 4. — N2. — P. 188—192.
27. Wang, B. Expression of rice *OsARGOS* gene in *Arabidopsis* promotes cell division and expansion and increases organ size / B. Wang, Y. Sang, J. Song, X. Q. Gao, X. Zhang // *J. Genet. Genomics.* — 2009. — V. 36. — P. 31—40.
28. Wang, B. Ectopic expression of a chinese cabbage *BrARGOS* gene in *Arabidopsis* increases organ size / B. Wang, X. Zhou, F. Xu, J. Gao // *Transgenic Res.* — 2009. — V. 19. — P. 461—472.

E.V. MIKHAYLOVA^{1,*}, B.R. KULUEV^{1,2}

¹ The Bashkir State University, 450076, Ufa Russia

² The Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Sci. Center of RAS, 450054, Ufa Russia

e-mail: mikhele@list.ru

Construction of Transgenic Rape (*Brassica napus* L.) Overexpressing *ARGOS-LIKE* Gene from *Arabidopsis thaliana* using the Floral Dip Method

In this paper, we present transgenic rape plants overexpressing the *ARGOS-LIKE* gene from *Arabidopsis thaliana* that have been obtained by the floral dip method. The transformation success rate for rape cultivars of Hanna and Ratnik averaged at 10%. In comparison with control wild-type plants, transgenic plants showed the greater organ size: 27% in the stem length, 58% in the leaf length, 40% in the leaf width, 22% in corolla diameter, 23% in seed volume and 29% in seed weight. The lower epidermis cell area in transgenic plants increased on average by 18%. It was shown that the *ARGOS-LIKE* gene from *A. thaliana* along with the promoter of dahlia mosaic virus can be used for the enlargement of organ size in rape.

Key words: *ARGOS-LIKE* gene, *Brassica napus* L., dahlia mosaic virus promoter, floral dip, rape, transgenic plants.

* Author for correspondence.