

УДК 581.1:577.214.625:578.853

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕН *AINTEGUMENTA* РАПСА ПОД КОНТРОЛЕМ ПРОМОТОРА ВИРУСА МОЗАИКИ ГЕОРГИНА

© 2013 г. Б. Р. Кулуев, А. В. Князев, А. В. Чемерис, В. А. Вахитов

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН,
450054 Уфа, ул. Проспект Октября, д. 71
E-mail: kuluev@bk.ru

Поступила в редакцию 26.04.12 г.
Окончательный вариант получен 25.10.12 г.

Получены трансгенные растения табака, экспрессирующие ген *AINTEGUMENTA* рапса под контролем 35S промотора и промотора вируса мозаики георгина. Трансгенные растения характеризовались увеличением длины листьев, размеров цветка, высоты стебля и массы семян, причем степень увеличения была больше в случае использования в качестве регулятора транскрипции промотора вируса мозаики георгина. Эктопическая экспрессия гена *AINTEGUMENTA* способствовала пролонгации роста листьев, при этом размеры клеток эпидермиса листьев оставались неизменными.

Ключевые слова: размеры органов, *AINTEGUMENTA*, трансгенные растения, *Brassica napus*, *Nicotiana tabacum*.

DOI: 10.7868/S0475145013020080

ВВЕДЕНИЕ

Создание трансгенных растений с увеличенными размерами органов представляет большой интерес для сельского и лесного хозяйств. Одним из перспективных методов получения таких растений являются манипуляции с уровнем экспрессии различных транскрипционных факторов, участвующих в регуляции роста и развития растений. Ген *AINTEGUMENTA* (*ANT*) кодирует транскрипционный фактор, относящийся к семейству AP2/ERF, подсемейству AP2, к группе ANT (Kim et al., 2006). Одной из мишеней ANT является ген *CYCLIND3;1*, который регулирует клеточное деление и способствует поддержанию клеток органа на стадии S (Mizukami, Fischer, 2000). Транскрипция гена *ANT* стимулируется белком ARGOS, экспрессия которого, в свою очередь, индуцируется ауксином (Hu et al., 2003). Было показано, что трансгенные растения, сверхэкспрессирующие ген *ANT* под контролем 35S промотора, характеризуются несколько большими размерами не только генеративных (Krizek, 1999), но и вегетативных органов (Mizukami, Fischer, 2000). У рапса обнаружены два гена-кандидата *ANT* с названиями *BnaX.ANT.a* (DQ211969) и *BnaX.ANT.b* (DQ211970) (Chen et al., 2010). Исходя из литературных данных следует, что повышение уровня экспрессии гена *ANT* вполне может стать одним из методов создания трансгенных растений с увеличенными размерами листьев, стеблей, цветков, плодов и семян (Mizukami, Fischer, 2000). Для по-

вышения уровня экспрессии целевых генов в трансгенных растениях чаще всего применяют 35S промотор, однако на практике применение данного промотора часто оказывается неэффективным (Mitsuhara et al., 1996). В связи с этим, нами ранее был выделен промотор вируса мозаики георгина (ВМГ), который в трансгенных растениях табака оказался немного сильнее 35S промотора (Кулуев и др., 2010). В данной работе с целью получения трансгенных растений с увеличенными размерами органов нами был использован полноразмерный ген *ANT* рапса, а именно *BnaX.ANT.b*, в сочетании как с 35S промотором, так и с промотором вируса мозаики георгина.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Участок ДНК, содержащий ген *BnaX.ANT.b*, был амплифицирован из геномной ДНК рапса при помощи праймеров ANTRapF ACAATG-GAGTCTTTTGTGATAATG и ANTRapR ACATCAAGAATCAGCCCAAGCAG. Затем ген *BnaX.ANT.b* выщепили из вектора pKRX по сайту *BsePI* и осуществили его ненаправленное клонирование в бинарных векторах pCambia 2201 с 35S промотором и pCambia 2301 (CAMBIA, Австралия) с промотором вируса мозаики георгина (Кулуев и др., 2011). Для поиска целевых клонов содержащих ген *BnaX.ANT.b* в смысловой ориентации при лигировании в векторе pCambia 2201, использовали праймер 35SCambF: AGAGGAC-

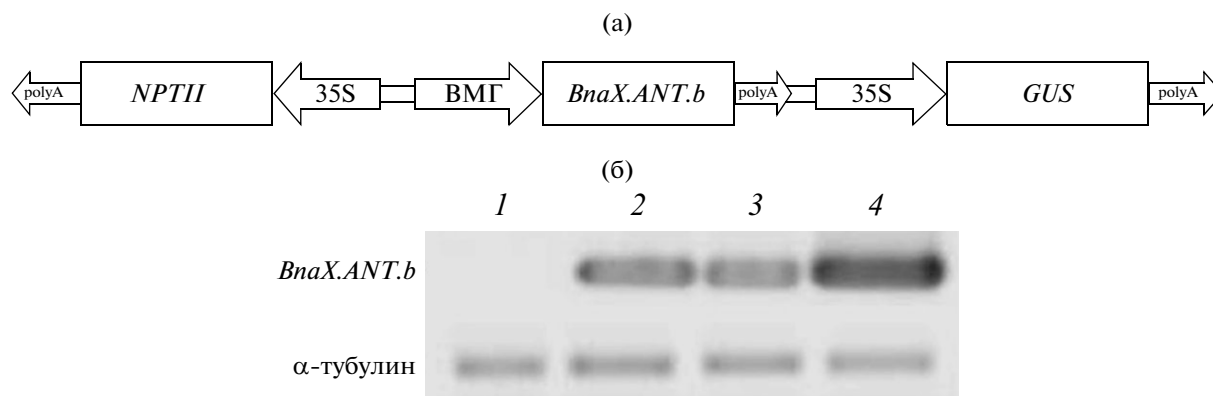


Рис. 1. а – Генно-инженерная конструкция Т-ДНК бинарного вектора рCambia 2301, состоящая из селективного и репортерного генов, а также целевого гена *BnaX.ANT.b* под контролем промотора вируса мозаики георгина. 35S – 35S промотор; BMГ – промотор вируса мозаики георгина; *NPTII* – ген неомицинофосфотрансферазы II; *GUS* – ген β -глюкуронидазы; polyA – сайт полиаденилирования вируса мозаики цветной капусты. б – Электрофореграмма результатов ОТ-ПЦР гена *BnaX.ANT.b* в исследуемых линиях трансгенных растений: 1 – контрольное растение; 2 – трансгенное растение линии 2201/BnANT № 21; 3 – трансгенное растение линии 2201/BnANT № 23; 4 – трансгенное растение линии 2301/BnANT № 67.

СТААСГААСТСГ, а при лигировании в векторе рCambia 2301 использовали праймер DMVF ATCAACGGAGAAACAAAGAT. После полной проверки, полученные в ходе работы две генно-инженерные конструкции с геном *BnaX.ANT.b* под контролем 35S промотора и промотора BMГ (рис. 1а) были введены в клетки *A. tumefaciens*.

Трансгенные формы табака (*Nicotiana tabacum* L. Petit Havana SR-1) получали методом агробактериальной трансформации листовых дисков (Кулуев и др., 2011). Растения трансгенных линий и контрольные растения культивировали в вегетационных сосудах объемом 450 мл, заполненных универсальным грунтом (Гера, Россия) на светоплощадке при температуре 26°C с фотопериодом 16/8 часов (свет/темнота) и освещенностью около 10 клк. Проростки выращивали в течение 20-ти дней на агаризованной среде МС, затем определяли длину гипокотилия и корешков и пересаживали их на почву. Замеры величины листьев производили только после пересадки в почву, через 30, 45 дней и в период цветения, в итоге было осуществлено 3 замера. По каждому варианту было отобрано по 5 растений, у которых определяли среднюю длину, площадь трех нижних листьев и высоту стебля. Отмечали время перехода к цветению, определяли длину цветка, начиная от цветоножки и заканчивая краем желобка венчика. Измеряли длину 3-х цветков с каждого растения начиная от цветоножки и заканчивая краем желобка венчика и вычисляли среднее значение. У трансгенных растений собирали семена, распределяли их по 30 штук, измеряли их массы и определяли среднее значение, при этом выборка состояла из 10-ти групп семян. Для изучения вли-

яния конститутивной экспрессии целевого гена на размеры клеток, проводили измерения площади клеток нижнего эпидермиса листьев одного возраста при помощи универсального флуоресцентного микроскопа модели Axio Imager M1 (Carl Zeiss, Германия). В качестве контроля использовали трансгенные растения табака, трансформированные Т-ДНК бинарного вектора рCambia 2301 без вставки целевого гена. Для ОТ-ПЦР гена *BnaX.ANT.b* использовали праймеры GTTTCTCTAGGGGTGCTTCCATCT и AGCG-GTTTCCTCGTCGTTATTGT. Для ОТ-ПЦР мРНК гена, кодирующего α -тубулин табака использовали праймеры tubAF CAAGGTG-CAAAGGGCTGTATGTATGA и tubAR GCAC-CAACTTCCTCGTAATCSTTTTC.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Целевой генно-инженерной конструкцией гена *BnaX.ANT.b* в векторе рCambia 2201 были проведены две агробактериальные трансформации листовых дисков табака и на селективной среде отобрано 90 первичных трансформантов. Из них укоренились на среде МС с канамицином 12 растений, из которых лишь три показали активность репортерного гена *GUS* в листьях. Эти три растения были акклиматизированы к условиям почвы, доведены до цветения с целью получения семян. Таким образом, были получены три линии трансгенных растений с номерами 11, 21 и 23. Из этих отобранных растений табака была выделена геномная ДНК и проведен ПЦР-анализ на наличие гена *BnaX.ANT.b* и 35S промотора. Было показано, что все три растения содержат в своем геноме как целевой ген, так и 35S промотор.

Морфологические параметры контрольной группы, содержащей Т-ДНК бинарного вектора pCambia 2301 и трансгенных растений табака поколения T₁, экспрессирующих ген *BnaX.ANT.b* рапса

Параметр	Линия контрольных растений pCambia 2301	Линии трансгенных растений табака, экспрессирующих ген <i>BnaX.ANT.b</i>		
		2201/BnANT № 21	2201/BnANT № 23	2301/BnANT № 67
<i>Длина листьев, см</i>				
через 30 дней	3.9 ± 0.3	4.8 ± 0.2	3.4 ± 0.1	3.0 ± 0.1
через 45 дней	9.1 ± 0.8	9.9 ± 0.2	9.4 ± 0.2	9.1 ± 0.4
В период цветения	15.7 ± 0.7	18.2 ± 0.5	17.9 ± 0.5	19.6 ± 0.3
<i>Средняя площадь трех нижних листьев, см²</i>	137 ± 10	143 ± 5	143 ± 10	151 ± 4
<i>Площадь клеток эпидермиса листьев, мкм²</i>	18271 ± 624	17029 ± 620	14609 ± 515	19564 ± 135
<i>Высота стебля, см</i>	82.5 ± 1.9	103.3 ± 4.5	98.0 ± 6.2	110.7 ± 4.3
<i>Длина цветка, см</i>	4.46 ± 0.02	4.74 ± 0.05	4.75 ± 0.04	4.85 ± 0.09
<i>Длина корней через 20 дней после посева на среду МС, см</i>	1.10 ± 0.06	1.20 ± 0.11	1.03 ± 0.09	1.70 ± 0.12
<i>Длина гипокотилей через 20 дней после посева на среду МС, мм</i>	1.8 ± 0.1	2.0 ± 0.2	1.6 ± 0.1	2.8 ± 0.2
<i>Масса 30-ти семян, г</i>	1.6 ± 0.2	1.9 ± 0.2	1.8 ± 0.2	2.3 ± 0.4

В ходе агробактериальной трансформации табака конструкцией гена *BnaX.ANT.b* в векторе pCambia 2301 на селективной среде было отобрано 67 первичных побегов. Из них 6 трансформантов укоренилось на среде с канамицином, при этом лишь последнее во всей группе растение под номером 67 показало высокую активность репортерного гена *GUS*. Данное растение было доведено до цветения, а семена были отобраны для дальнейшей работы.

Семена трех линий трансгенных растений 2201/BnANT второго поколения были высеваны на селективную среду, где только растения линий № 21 и 23 показали классическое соотношение выживших и погибших 3 : 1, что косвенно предполагает наличие единичной копии встроенного трансгена. Семена трансгенных растений pCambia 2301/BnANT № 67 на селективной среде МС также показали расщепление 3 : 1. По длине корня и гипокотила между опытными и контрольными растениями разница была обнаружена лишь для линии № 67, причем было отмечено их удлинение на 55 и 56% соответственно (таблица). Далее по 5 растений трех отобранных линий № 21, 23 и 67 были акклиматизированы к условиям почвы для проведения дальнейших экспериментов по их морфологической характеристике. В качестве контроля использовали линию трансгенных

растений, содержащих Т-ДНК бинарного вектора pCambia 2301 без целевого гена. Через 30 и 45 дней после акклиматизации опытные и контрольные растения практически не отличались по длине листьев (табл.). В то же время в период цветения листья у опытных растений были длиннее, чем у контрольных на 14–25% (таблица), что может говорить о пролонгировании времени роста листьев под влиянием эктопической экспрессии гена *BnaX.ANT.b*. По площади листьев лишь трансгенные растения 2301/BnANT №67 характеризовались небольшим их увеличением (таблица). По высоте стебля опытные растения были выше контрольных, и разница составляла у линии № 23 – 19%, у линии № 21 – 25%, а у линии № 67 – 28%. По длине цветка различия между опытными и контрольными растениями были небольшими и в целом составили от 6% у линии № 21 до 9% у линии № 67 (таблица). По форме листьев, стебля и цветков опытные и контрольные растения не различались. Большинство растений были фертильными, пропорции между размерами чашелистиков, лепестков, тычинок и плодолистиков по сравнению с контролем оставались в пределах нормы. Было показано влияние эктопической экспрессии гена *BnaX.ANT.b* на массу семян (таблица), причем наибольшая разница была характерна для линии 2301/BnANT № 67. Для выяс-

нения возможных причин увеличения размеров листьев, нами были проведены микроскопические исследования клеток эпидермиса листьев. Размеры органов трансгенных растений могли увеличиваться как за счет возрастания размеров отдельных клеток, так и за счет увеличения количества клеток. Оказалось, что размеры клеток эпидермиса листьев у опытных растений не только не увеличивались, но у линий № 21 и 23 даже немного уменьшились (таблица). Это означает, что длина листьев опытных растений, вероятнее всего, увеличивалась за счет стимулирования клеточного деления, а не процессов клеточного роста.

Методом полуколичественной ОТ-ПЦР было проведено исследование экспрессии гена *BnaX.ANT.b* в трех линиях трансгенных растений. Было показано, что уровень экспрессии трансгена наиболее высок у растений линии № 67 (рис. 1б), которые содержат в качестве регулятора транскрипции целевого гена промотор вируса мозаики георгина. Таким образом, повышение уровня экспрессии гена *BnaX.ANT.b* отражалось в трансгенных растениях в виде увеличения размеров листьев, стебля и цветков.

ОБСУЖДЕНИЕ

Ген *ANT* кодирует один из важнейших транскрипционных факторов, принимающих участие в росте и развитии, обнаруживается у всех исследуемых высших растений и является одним из претендентов на использование в качестве универсального гена для создания хозяйственно важных трансгенных растений с увеличенными размерами органов (Mizukami, Fischer, 2000). Однако влияние повышенного и пониженного уровня экспрессии этого гена на размеры органов было достаточно хорошо исследовано лишь на модельном объекте *A. thaliana*, а изучение данного гена у каждого растения требует много времени и может представлять определенные трудности. В связи с этим вызывает интерес исследование эктопической экспрессии ортологов гена *ANT*, нуклеотидные последовательности которых известны, в гетерологических условиях. В данной работе для создания трансгенных растений нами были использованы модельные растения табака и ген *BnaX.ANT.b* рапса, который до этого не использовался для трансформации растений. Предполагалось, что если целевой ген *BnaX.ANT.b* будет эффективно работать в табаке, то он вполне может быть использован для создания других хозяйственно важных растений с увеличенными размерами органов. Эктопическая экспрессия гена *BnaX.ANT.b* способствовала увеличению разме-

ров ряда органов табака (таблица), причем в отличие от *A. thaliana* (Mizukami, Fischer, 2000), большинство полученных растений были фертильными. Как и в случае с *A. thaliana* (Mizukami, Fischer, 2000), нами получены данные, свидетельствующие о влиянии продукта гена *ANT* на клеточное деление, что, видимо, способствует пролонгированию времени роста листьев. В отличие от *A. thaliana*, где сверхэкспрессия гена *ANT* наиболее сильно влияла на размеры органов цветка (Krizek, 1999), в случае с табаком разница в величине цветков составила лишь 6–9%. При этом наибольшие изменения нами были зафиксированы при измерении высоты стебля и массы семян (таблица). Поэтому, предполагается, что исследованный нами ген может быть применен на практике, прежде всего с целью увеличения размеров данных органов. Степень изменения величины органов был больше в случае использования вместо 35S промотора его гомолога, выделенного нами ранее из вируса мозаики георгина (Кулуев и др., 2010).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Кулуев Б.Р., Князев А.В., Лебедев Я.П. и др. Конструирование гибридных промоторов каулимовирусов и анализ их активности в трансгенных растениях // Физиология растений. 2010. Т. 57. № 4. С. 623–632.
- Кулуев Б.Р., Князев А.В., Ильасова А.А. и др. Конститутивная экспрессия гена *ARGOS* в растениях табака под контролем промотора вируса мозаики георгина // Физиология растений. 2011. Т. 58. № 3. С. 443–452.
- Aljanabi S.M., Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques // Nucleic Acids Res. 1997. V. 25. P. 4692–4693.
- Chen B., Wang T., Wang H. et al. Cloning and expression level analysis of two *BnaANT* candidate genes in *Brassica napus* // Agric. Sci. China. 2010. V. 9. P. 488–496.
- Hu Y., Xie Q., Chua N. The *Arabidopsis* auxin-inducible gene *ARGOS* controls lateral organ size // Plant Cell. 2003. V. 15. P. 1951–1961.
- Kim S., Soltis P.S., Wall K. et al. Phylogeny and domain evolution in the APETALA2-like gene family // Mol. Biol. Evol. 2006. V. 23. P. 107–120.
- Krizek B.A. Ectopic expression of *AINTEGUMENTA* in *Arabidopsis* plants results in increased growth of floral organs // Dev. Genet. 1999. V. 25. P. 224–236.
- Mitsuhara I., Ugaki M., Hirochika H. et al. Efficient promoter cassettes for enhancer expression of foreign genes in dicotyledonous and monocotyledonous plants // Plant Cell Physiol. 1996. V. 37. P. 49–59.
- Mizukami Y., Fisher R.L. Plant organ size control: *AINTEGUMENTA* regulates growth and cell numbers during organogenesis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. P. 942–947.

Morphological Features of Transgenic Tobacco Plants Expressing the *AINTEGUMENTA* Gene of Rape under Control of the Dahlia Mosaic Virus Promoter

B. R. Kuluev, A. V. Knyazev, A. V. Chemeris, and V. A. Vakhitov

*Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center, Russian Academy of Sciences,
ul. Prospekt Oktyabrya 71, Ufa, 450054 Russia*

e-mail: kuluev@bk.ru

Abstract—Transgenic tobacco plants expressing the *AINTEGUMENTA* gene of rape under control of the 35S promoter and the promoter of dahlia mosaic virus were obtained. The transgenic plants were characterized by increase in the length of the leaves, flower sizes, stem height, and weight of seeds; at the same time, the degree of increase was greater in the case of use of the dahlia mosaic virus promoter as a regulator of transcription. Ectopic expression of the *AINTEGUMENTA* gene promoted prolongation of leaf growth, while sizes of epidermal cells of the leaves remained unchanged.

Keywords: organ sizes, *AINTEGUMENTA*, transgenic plants, *Brassica napus*, *Nicotiana tabacum*.