

На правах рукописи

Коростылева Татьяна Викторовна

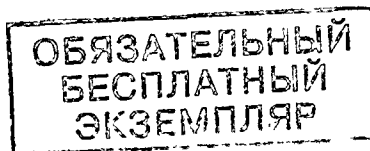
**ИЗУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ
С ГЕТЕРОЛОГИЧНЫМ ГЕНОМ, ДЕТЕРМИНИРУЮЩИМ
СИНТЕЗ ДВУНИТЕВОЙ РНК**

03.00.15 - генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2006



Работа выполнена в лаборатории генетики растений Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

кандидат биологических наук **Одинцова Татьяна Игоревна**

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

доктор биологических наук **Голденкова-Павлова Ирина Васильевна**

кандидат биологических наук **Соловьев Александр Александрович**

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ:

Кафедра генетики биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

Защита состоится «. .» 2006г. в _____ часов на заседании Диссертационного совета Д 002.214.01. при Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН по адресу:
119991, Москва, ул. Губкина, д. 3. Факс: (095) 132 89 62.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИОГен РАН.

Автореферат разослан «....» _____ 2006г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Г.Н. Полухина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Устойчивость к вирусным заболеваниям растений является одной из наиболее актуальных проблем современной генетики, биотехнологии и физиологии растений. Раскрытие сложных механизмов взаимодействия хозяина и патогена, процессов, приводящих к формированию иммунитета у растений, выделение генов, контролирующих разные этапы этих процессов – все это представляет не только теоретический, но и прикладной интерес. С применением методов генной инженерии удалось не только детально исследовать особенности физиологии вирусов растений, но и создать устойчивые к вирусным инфекциям формы: трансгенные растения с геном белка оболочки вирусов (Powell-Abel et al., 1986), геном транспортного белка (Malyshenko et al., 1993) и геном репликазы (Golemboski et al., 1990). Несмотря на определенные успехи и практические достижения в этой области, молекулярно-генетические процессы, отвечающие за формирование различных типов устойчивости изучены далеко не полностью. С 80-х годов прошлого века в поле научного интереса исследователей иммунитета растений попала двунитевая РНК. Было показано влияние двунитевой РНК, в том числе и синтетической (поли-1) на устойчивость растений к вирусам (Gat-Edelbaum et al., 1983; Бистрицкайте, 1986). Создание трансгенных растений, экспрессирующих антисмысловые последовательности вируса и обладающих устойчивостью к нему (как предполагалось, за счет образования дуплекса РНК с геномной РНК вируса) положило начало отдельной «антисмысловой» стратегии создания устойчивости (Izant, Weintraub, 1984; Powell et al., 1989; Bejarno et al., 1992). В 1998-1999 г. В серии работ Гамильтон и Болкомб раскрыли механизм РНК-интерференции, показав ключевую роль рестрикции двунитевой РНК в ингибировании экспрессии генов, обладающих гомологией с последовательностью такой РНК (Hamilton A.J, Baulcombe D.C., 1999). Хотя нокаутная технология с использованием антисмысловых РНК при создании вирусостойчивых растений нашла практическое применение еще до открытия молекулярной сути процессов, лежащих в ее основе, многие аспекты проявления РНК-интерференции у растений и ее влияние на экспрессию генома по настоящее время остаются неисследованными.

Поэтому нам представлялось интересным исследовать влияние эндогенно синтезируемой в растении протяженной двунитевой РНК, не имеющей гомологии с геномом растения и геномом вируса, на его устойчивость к вирусам. В качестве трансгенной кодирующей последовательности, экспрессирующей днРНК, для предотвращения эффекта замолкания генов растения был использован фрагмент бактериального гена.

Цели работы:

Целью работы явилось изучение влияния гетерологичной конструкции, обеспечивающей в растении синтез двунитевой РНК, не несущей гомологии с геномами вирусов и растений, на устойчивость трансгенных растений к вирусным заболеваниям, а также исследование влияния этой гетерологичной

вставки на морфофизиологические признаки однодольных и двудольных растений (*Nicotiana tabacum* и *Triticum aestivum*).

Для достижения этой цели были поставлены следующие экспериментальные задачи:

- получить путем агробактериальной трансформации трансгенные растения табака и пшеницы, несущие конструкцию, детерминирующую в растении синтез протяженной (0,35 тпн) двуцепочечной РНК;
- провести изучение генетической стабильности данной вставки в трансгенных растениях;
- провести изучение вирусоустойчивости трансгенных растений табака к разным штаммам ВТМ;
- исследовать изменения в спектрах растворимых белков листьев трансгенных растений табака при инфицировании их вирусом;
- провести сравнительное исследование морфофизиологических признаков трансгенных растений с оценкой их наследуемости.

Научная новизна. Впервые показано влияние экспрессии вставки, детерминирующей синтез двунитовой РНК, не имеющей гомологии с геномами вируса и растений табака, на уровень устойчивости трансгенных растений к тобамовирусам. В инфицированных трансгенных растениях выявлен индуцируемый синтез двух новых, неизвестных полипептидов, предположительно имеющих отношение к системе антивирусной защиты растений. Также выявлено влияние такой вставки на протяжении поколений Т2-Т3 на изменение отдельных морфофизиологических признаков трансгенных растений, не связанное с соматической изменчивостью в результате культивирования *in vitro*.

Практическая ценность. Данные, представленные в работе, имеют практическую ценность для исследователей, занимающихся трансформацией растений, изучением экспрессии их генов с применением нокаутной технологии, основанной на синтезе двунитовых РНК. Практическая значимость работы состоит также в отработке методик трансформации растений, в первую очередь трансформации *in planta* с высокой эффективностью мягкой пшеницы, являющейся хозяйственно-ценной культурой.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы были представлены на международном симпозиуме «Физиология трансгенного растения и проблемы биобезопасности» (Москва, 2004г.), межлабораторном семинаре «Молекулярные и клеточные основы генетических процессов» ИОГен РАН (2006г.).

Структура и объем работы. Диссертационная работа включает в себя введение, обзор литературы, описание материалов и методов, изложение результатов и их обсуждение, выводы и список литературы. Диссертация изложена на ... страницах, содержит 8 таблиц и 22 рисунка. Список литературы включает наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ ПО ГЛАВАМ.

ГЛАВА 1. Обзор литературы. В первой части обзора рассмотрены основные стратегии создания трансгенных растений, устойчивых к вирусным заболеваниям, вторая часть посвящена функциям двунизовой РНК и особенностям РНК-интерференции в организме растений.

ГЛАВА 2. Материалы и методы исследований.

Штаммы бактерий и плазмиды. *Agrobacterium tumefaciens* Cl58 Rif^R, *Escherichia coli* K-12 TG1; плазмиды pSIR 42 (Смирнов, 1993), pGV 2260 (Andre, 1986), pRK 2013 (Лихтенштейн, 1988)

В качестве объекта трансформации были использованы следующие **виды растений**: табак *Nicotiana tabacum* cv. Samsun с генотипом *nn* (ген *n* обуславливает чувствительность к BTM по типу системного заболевания); мягкая пшеница *Triticum aestivum* L., линии Хакасская (2n=42).

Штаммы вируса табачной мозаики из коллекции лаборатории генетики растений ИОГен РАН: AT-16 – аттенуированный слабопатогенный штамм; аукуба – сильнопатогенный штамм; N2² – сильнопатогенный штамм;

Агробактериальная трансформация растений табака проводили методом листовых дисков (Horsch et al., 1985) с использованием бинарного агробактериального вектора (Bevan, 1984). Регенеранты, укоренявшиеся в селективной среде подвергали дополнительной проверке на присутствие агробактерий. В условиях климатокмеры "Fisons Fitotron 600H" (Англия) – 16 ч день, 24°C / 8 ч ночь, 20°C. у растений были получены семена путем самоопыления, с использованием изолирующих пергаментных колпаков.

Процедуру трансформации пшеницы проводили на кастрированных цветках при их опылении. На пестик принудительно опыленных цветов наносили суспензию ночной культуры *A. tumefaciens* Cl58 Rif^R (pSIR42::pGV2260). В одной из повторностей опыта в среду для выращивания агробактерий добавлялся ацетосирингон до концентрации 200 мкМ. Колосья заключались в изолятор, семена полученные от растений T₀ высаживались для дальнейшего анализа.

Тест на устойчивость к канамицину потомства трансформантов табака. Семена после стерилизации переносились в чашки с селективной питательной средой (соли по MS, B₁ -1 мг/л, B₂ -0,8 мг/л, сахароза -20 г/л, 0,8% агар), содержащей канамицин (Km) – 100-150 мг/л. В случае пониженной всхожести после стерилизации проводили дополнительно стимуляцию прорастания семян в течение 1 часа следующим раствором : 2 % KNO₃, гибберелловая кислота – 0,5 мг/л.

Тест на устойчивость к канамицину потомства трансформантов пшеницы.

Тест на устойчивость проводили на проростках пшеницы на стадии 3-4 листьев. На два верхних развернутых листа, поверхностно наносили р-р канамицина (2% сульфат канамицина, 0,2 % Tween 20) по 200 мкл на лист, распределяя по всей поверхности. Оценку проводили через 7-10 дней по окраске отрастающих верхних листьев.

Выделение нуклеиновых кислот.

Выделение плазмидной ДНК и геномной ДНК растений проводили по стандартным методикам (Maniatis et al., 1982; Дрейпер, 1991; Дорохов, 1997). Для выделения РНК применяли следующую методику (Chomczynski et al., 1987).

ПЦР-амплификация.

Для детекции Т-ДНК использовали праймеры к 0,35тпн HindIII-BamHI фрагменту pBR322: Ic - 5'GTGCCCATGATCGCGTAGTC³; Ilc - 5'GCTTTAATGC GGTAGTTTAT³.

При амплификации фрагмента из области Ap^R плазмиды pSIR42::pGV2260 (0,45 тпн) использовались следующие праймеры: Ampl - $5'CGCCAGTTAATAGTTTGC GCAACGT^3'$, AmplI - $5'TTGGGTGCACGAG TGGGTTACATCG^3'$

Гибридизация нуклеиновых кислот.

Гибридизация ДНК и РНК проводилась по стандартным методикам (Дрейпер, 1991; Херрингтон, 1999). В качестве зонда для ДНК-гибридизации использовали амплифицированный с праймеров (Ic, IIc) фрагмент плазмиды pSIR42, меченный биотином (био-11-dUTP) с реактивами и по протоколам фирмы «Силекс М» (Россия). Проявление проводили реактивами набора «Нерадиоактивное определение ДНК» этой же фирмы. РНК-дот-гибридизацию проводили на фильтре Immobilon-Ny+ («Millipore»), в качестве зонда использовали HindIII-фрагмент плазмиды pSIR42, меченный $\alpha\text{-}[^{32}P]\text{-dATP}$

Исследование растений на вирусоустойчивость.

Исследование проводилось на трансгенных растениях табака поколения T_2 отселектированных на устойчивость к Кт. Растения в возрасте 5-6 настоящих листьев инокулировали суспензией вируса табачной мозаики (0,01 мкг/мл 0,07М фосфатного буфера pH 7,8). Экспериментальные и контрольные группы состояли из 15-20 растений. Развитие заболевания оценивали по появлению мозаичных симптомов на листьях, учитывали время появления и степень выраженности симптомов. Биохимические изменения исследовали по спектрам водорастворимых белков листьев.

Экстракция белков листьев. Для экстракции использовали ткань (500 мг) верхних листьев, собранных с нескольких растений исследуемой группы. Ткань измельчали на холоду в буфере (0,5 М ацетат Na, 0,5 М сахароза, 0,3% β -меркаптоэтанол, pH 6,8). Суспензию центрифугировали 25 мин при 12 тыс. об/мин и температуре 4°C, супернатант использовали для электрофоретического анализа. В экстракт добавляли коктейль ингибиторов протеаз для растительных клеток и тканей (p-p в DMSO, «Sigma»), 5мкл p-ра на 500 мкл белкового экстракта.

Электрофорез растворимых белков листьев проводили с использованием неденатурирующей (по Дэвису) и денатурирующей (по методу Лэммли) систем разделения.

Анализ белков.

Окрашенную зону белка вырезали из геля и гидролизовали трипсином *in situ* (Fraser et al., 1987). Пептиды элюировали 60% ацетонитрилом в 0,1% трифторуксусной кислоте, концентрировали и разделяли методом обращенно-фазовой хроматографии. Разделение триптических пептидов проводили на колонке Aquapore RP300 линейным градиентом концентрации ацетонитрила (0-50%) в 0,1% ТФУ. Секвенирование пептидов проводили на автоматическом секвенаторе фирмы Knauer (Германия) с автоматической детекцией фенилтиогидантоиновых производных аминокислот на ФТГ анализаторе.

Статистическая обработка и компьютерный анализ.

Соответствие фактического расщепления теоретическому при наследовании устойчивости к канамицину оценивалось по критерию χ^2 .

Достоверность различий по оцениваемым признакам между группами трансгенной и нетрансгенной растений оценивали, используя пакет программ статистического и биометрико-генетического анализа в растениеводстве и селекции AGROS, версия 2.10, 2000г. Поиск по банкам данных белковых и нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программы BLAST 2.2.13. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Глава 3. Результаты и их обсуждение.

1.1. Получение и исследование трансгенных растений табака.

В качестве источника Т-ДНК нами была использована плазмидный вектор pSIR42, содержащий между 25-нуклеотидными Т-повторами последовательности двух генов, экспрессирующихся в растительной клетке: маркерный ген неомизинфосфотрансферазы II (*nptII*) под контролем промотора гена нопаинсинтазы и рекомбинантный ген, обеспечивающий под контролем промотора 35S вируса мозаики цветной капусты синтез двуцепочечной РНК (рис. 1). Данная плазмида была создана в лаборатории (Смирнов, 1993) на основе экспрессионного вектора pST6 (Смирнов, 1990) путем клонирования в него по сайту *Bam*HI фрагмента рекомбинантной ДНК, содержащего протяженный инвертированный повтор. Последовательность повтора представляет собой дублированный *Hind*III-*Bam*HI-фрагмент гена устойчивости к тетрациклину плазмиды pBR322 (350 п.н.).

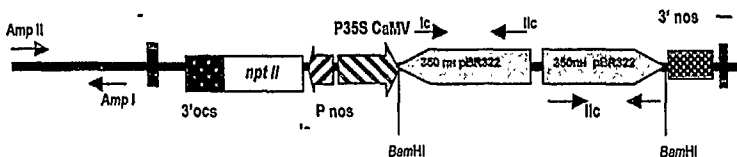


Рисунок. 1 Функциональная структура Т-области плазмиды pSIR42:

RB, LB – правая и левая фланкирующие последовательности Т-ДНК; стрелками обозначены места посадки праймеров Ic и Ilc; AmpI и AmpII.

Хотя в качестве матрицы для синтеза дцРНК в растении при создании вектора использовалась последовательность бактериального происхождения, нами не исключалась возможность специфического взаимодействия днРНК с отдельными транскриптами генов растений, за счет их частичной гомологии. Для проверки возможности таких взаимодействий с нашей конструкцией был предпринят поиск гомологии последовательности инвертированного повтора с геномом растений с использованием программы BLAST (алгоритмы blastn, discontinuous megablast), по базам данных *nr*, *est*, *refseq mrna*. Хотя параметры поиска по длине гомологичной области были минимизированы (до 20 нуклеотидов), последовательностей, принадлежащих геномам пшеницы и табака обнаружено не было. Следовательно, экспрессия в трансгенных растениях двунитовой РНК, гомологичная фрагменту последовательности гена *Tet^R* не должна вызывать замолкание собственных генов табака и пшеницы.

В результате трансформации нами было получено 10 независимых линий регенерантов табака, устойчивых к воздействию канамицина, прошедших процедуру контрселекции и проверку на отсутствие агробактерий. В качестве контрольных растений использовали регенеранты растений табака исходной

линии, не подвергавшиеся трансформации.

Проверка встраивания Т-ДНК проводилась молекулярными и генетическими методами. С индивидуальной ДНК растений T_1 была проведена ПЦР-амплификация с праймерами Ic и Icс, а также отдельно с каждым из праймеров для подтверждения сохранения структуры инвертированного повтора. В амплификатах всех отобранных ранее канамициностойчивых растений присутствовал фрагмент 0,35 т.п.н., соответствующий по длине фрагменту последовательности pBR322 из Т-области pSIR42 (рис. 2.А, рис 10). Гомология нуклеотидной последовательности этого фрагмента с последовательностью инвертированного повтора была подтверждена Саузерн блот гибридизацией с зондом, изготовленным на основе *Bam*HI-фрагмента pSIR42 (рис. 2.В.) По результатам анализа показано, что все 10 линий содержали Т-ДНК с последовательностью инвертированного повтора без делеций. Эффективность трансформации составила 23,3 %.

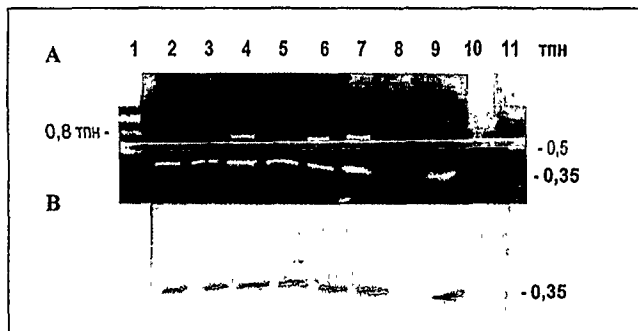


Рисунок 2.

А - электрофореграмма продуктов ПЦР-амплификации ДНК растений табака с праймером Ic, 1,5 % агарозный гель. 1 –ДНК фага λ , рестрицированная *Pst*I, 11 – рестрицированная *Hind*III, 2-7 амплификаты ДНК индивидуальных трансформантов T_1 , 8 – контрольного табака, амплификат плазмиды pSIR 42, 10 - 0,5 мкг ДНК pSIR 42.

В – Саузерн блот-гибридизация соответствующих продуктов амплификации (рис..2. А) с биотинилированным зондом из *Bam*HI фрагмента pSIR 42.

1.2. Изучение наследования трансгенной последовательности.

Характер наследования Т-ДНК оценивался по сегрегации сцепленного признака (устойчивость к канамицину) в потомстве трансгенных растений, полученном при самоопылении трансформантов T_1 и T_2 . У части линий семена, полученные от T_1 оказались нежизнеспособными (рис. 7). Полученные данные по линиям, обладающим всхожими семенами T_2 , приведены в табл.1. От нескольких (3-5) растений T_2 каждой линии путем самоопыления были получены семена T_3 , а с линиями Sp42 №9 и Sp42 №13 дополнительно были проведены анализирующие скрещивания. В целом, расщепление признаков в

потомстве T_3 каждой линии соответствовало выдвинутым для T_2 гипотезам, однако линии Sp42 №2, Sp42 №9 и Sp42 №13 демонстрировали неоднозначные результаты, в потомстве единичных T_3 -потомков этих линий наблюдалось отклонения от менделевского типа наследования, выражавшиеся в увеличении Км-неустойчивого класса (не представлено в автореферате). У линии Sp42 №9 выявлено присутствие последовательности агробактериального вектора (рис. 11).

Таким образом, было выявлено, что 7 линий (87% всхожих) несут единичную вставку Т-ДНК, 1 линия (13 % всхожих) - 2 независимых вставки. При этом 37 % всхожих линий (30 % всех линий) с данной вставкой проявляли нестабильную экспрессию трансгена (*nptII*) в потомстве T_2 и T_3 .

Таблица 1. Результаты анализа генотипа трансгенных линий табака по признаку устойчивости к канамицину (на поколении T_2).

	Трансгенная линия	Кол-во проанализированных растений T_2	Кол-во зеленых проростков	Количество желтых проростков	Статистическая оценка расщепления
1	Sp42 №1	128	93	32	$\chi^2_{3;1} = 0,024$
2	Sp42 №2	193	147	46	$\chi^2_{3;1} = 0,083$
3	Sp42 №3	44	32	12	$\chi^2_{3;1} = 0,121$
4	Sp42 №4	162	129	33	$\chi^2_{3;1} = 1,852$
5	Sp42 №9	179	120	59	$\chi^2_{3;1} = 4,898$
6	Sp42 №13	162	152	10	$\chi^2_{15;1} = 0,002$
7	Sp42 №14	105	80	25	$\chi^2_{3;1} = 0,079$
8	Sp42 №15	27	20	7	$\chi^2_{3;1} = 0,012$

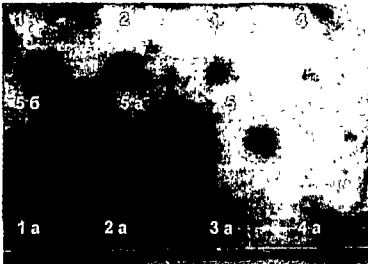
Критическое значение χ^2 при 5% уровне значимости равно 3,84 (для степени свободы = 1).

1.3. Исследование экспрессии РНК в трансформантах табака.

Для определения экспрессии в растениях T_2 трансгенной дцРНК, нами были выделены препараты РНК суммарных усредненных проб листовой ткани из растений разных линий (для линии Sp42 №2 – и индивидуальных растений), используемых потом в эксперименте по изучению вирусоустойчивости. Был проведен анализ экспрессии интродуцированной последовательности методом РНК-дот-гибридизации. В качестве зонда была использована ДНК последовательности инвертированного повтора из Т-области плазмиды pSIR42 (BamHI рестрикционный фрагмент). Данная последовательность в трансформированных растениях под контролем промотора 35S CaMV обеспечивает в растениях экспрессию днРНК.

По результатам проведенной гибридизации видно (рис. 3), что в пробах трансгенных растений присутствует РНК, гомологичная последовательности

инвертированного повтора плазмиды pSIR42. Это свидетельствует об экспрессии в трансгенных табаках поколения T₂ двуцепочечной РНК.



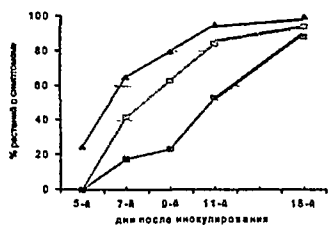
- 1, 1а – проба индивидуального растения линии Sp42 №2, по 2 и 20 мкг РНК соответственно,
 2, 2а – суммарная проба растений линии Sp42 № 2, по 2 и 20мкг РНК,
 3, 3а - суммарная проба растений линии Sp42 № 4, по 2 и 20мкг РНК,
 4, 4а – «-» контроль, нетрансгенный табак, 2 и 20мкг РНК;
 5, 5а,5в – «+» контроль, ДНК плазмиды pSIR42, по 0,001, 0,01 и 0,1 мкг.

Рисунок 3. Радиоавтограф результатов Нозерн-дот-гибридизации образцов РНК, выделенных из трансгенных табаков, с ³²P зондом, полученным из *HindIII*-фрагмента плазмиды pSIR42.

1.4. Исследование вирусоустойчивости трансгенных растений табака.

Исследования проводились на трансгенных растениях табака поколения T₂, отселектированных по признаку устойчивости к Km. Изучали влияние вставки, экспрессирующей дцРНК, на уровень и характер устойчивости растений табака, чувствительного к ВТМ (генотип *nn*), а также биохимические изменения в этих растениях.

Использовались штаммы ВТМ, различающиеся по степени патогенности. После инокуляции растений вирусом регистрировали динамику развития заболевания у разных экспериментальных групп. У зараженных трансгенных растений наблюдалось изменение сроков развития симптомов, а также изменение их характера. У трансгенных растений при заражении сильнопатогенными штаммами ВТМ (N2², аукуба) мозаика развивалась несколько позднее, чем у контрольных нетрансгенных рис. 4. (А и В): симптомы в группе трансгенных растений в среднем начинали проявляться на 7-й день после инфицирования, а не на 5-й, как в группе контрольных нетрансгенных. При инфицировании аттенуированным штаммом АТ-16 различий между опытными и контрольными растениями не наблюдалось (рис. 4, В). Характер проявления симптомов у трансгенных растений табака отличался от контрольных растений (рис. 4 а, б). При заражении трансгенных растений штаммом N2² различия были менее выражены, а при заражении аттенуированным штаммом АТ-16 - различий в симптоматике заболевания не выявлено.

А. штамм N2²

Б. штамм аукуба



В. штамм AT-16

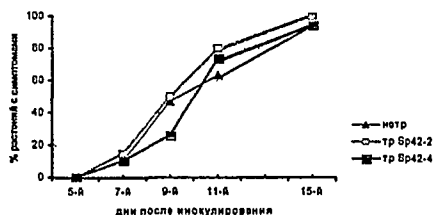


Рисунок 4. Динамика проявления симптомов заболевания на растениях табака при заражении разными штаммами ВТМ.

Оценивалась степень пораженности выборки в % ((число растений с симптомами / инокулированные растения) × 100). Контроль - (нетр), линия Sp42 №2 - (тр Sp42-2), Sp42 №4 - (тр Sp42-4).

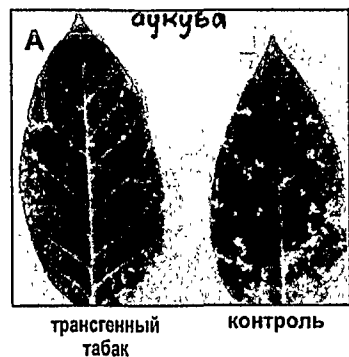


Рисунок 5. Симптомы, образующиеся после 4-х недель заражения штаммом ВТМ аукуба: А - верхние неинокулированные листья; В - общий вид пораженных растений, правый ряд - трансгенные растения.

Эти результаты позволили нам сделать вывод об увеличении устойчивости к заражению ВТМ у трансгенных растений табака, экспрессирующих двунитевую РНК. При этом наблюдалась дифференцированная реакция на разные штаммы.

1.5. Изучение спектра растворимых белков листьев.

Для изучения биохимических изменений в трансгенных растениях табака нами был использован электрофоретический анализ водорастворимых белков листьев в неденатурирующих условиях, а в случае необходимости определения молекулярной массы – в денатурирующих условиях по методу Лэммли, успешно применяемому для обнаружения белков, индуцирующихся при вирусной инфекции (PR-белков).

Анализ белковых экстрактов, полученных из здоровых, трансгенных и нетрансгенных растений, показал, что трансгенные и контрольные растения не различаются по компонентному составу (рис.6.).

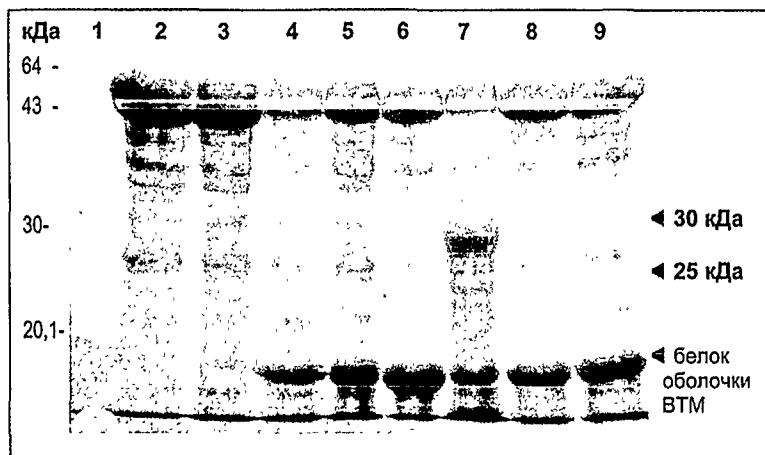


Рисунок. 6. Электрофоретическое разделение белков листьев табака в 10% полиакриламидном геле в присутствии SDS, линия Sp42 №2 :

1 - маркеры массы; 2,3 - здоровые неинфицированные растения, нетрансгенные и трансгенные; 4, 6, 8 – нетрансгенные растения, зараженные ВТМ, штамм аукуба, штамм N2², штамм AT-16, соответственно; 5, 7, 9 - трансгенные растения, зараженные ВТМ, штамм аукуба, штамм N2², штамм AT-16, соответственно.

Для исследований изменений в белковых спектрах листьев в процессе развития инфекции у растений отбирались пробы на 3, 7 и 15 -й день после инфицирования вирусом. Изменения в компонентном составе были обнаружены в пробах, взятых на 7-ой день после заражения. При электрофоретическом исследовании в неденатурирующих условиях белков листьев растений табаков, зараженных штаммом N2² ВТМ, у трансгенных

растений были обнаружены два новых полипептида, не соответствующих по электрофоретической подвижности ни одному из PR-белков, присутствующих в экстрактах инфицированных сверхчувствительных табаков с некротической реакцией на ВТМ. Были определены молекулярные массы этих полипептидов - 25 и 30 кДа (рис. 6.). Обнаруженные полипептиды оказались крайне нестабильными, что, по-видимому, свидетельствует о том, что они являются индуцибельными короткоживущими белками.

Следует также отметить, что в экстракте листьев трансгенных растений, пораженных штаммом N2², белок оболочки ВТМ (17,6 кДа) содержался в значительно меньшем количестве, чем в нетрансгенном образце (рис. 6.), это свидетельствует об уменьшении накопления вирусных частиц в трансгенных растениях и повышенном уровне устойчивости этих растений.

Поскольку компонент с молекулярной массой 30 кДа был преобладающим, именно он был подвергнут более детальному структурному анализу. На хроматограмме, полученной в результате разделения смеси пептидов после гидролиза этого белка *in situ*, удалось выявить 24 пика, 7 из которых преобладали в количественном отношении. Два из них (№6 и №18) был подвергнуты автоматическому секвенированию. N-концевые аминокислотные последовательности этих пептидов оказались следующими:

№ 6 *Val-Leu-Pro-Val-Ala-Gln-Gln*; №18: *Asp-Thr-Pro-Ile-Gln-Ala-Phe*.

Эти данные позволили осуществить поиск гомологичных последовательностей с помощью программы SRS-FastA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) в банках данных PIR и SWISSPROT. Оказалось, что пептид № 18 гомологичен (83,3 %) ксилотригалактарику эндотоксином томата, содержащей 296 аминокислотных остатков (Okazawa et al., 1993). Среди гомологичных пептидов белков имелись также предшественники ксилотригалактарику эндотоксином арабидопсиса, однако степень гомологии в этом случае был ниже. Пептид № 6 обнаружил гомологию (66,7%) с глюкан эндотоксином 1,3-β-глюкозидазой сои длиной 315 аминокислотных остатка (Takeuchi et al., 1990). Среди найденных гомологичных белков не оказалось ни одного из известных белков табака, в том числе и PR-белков. Следует отметить, что белки, несущие гомологию с исследуемыми пептидами, относятся к одному функциональному семейству растительных β-эндотригалактарику, состоящему из 3-х групп (1,3-β-глюканазы, 1,3-1,4-β-глюканазы и 1,4 -β-глюканазы). Все они связаны с метаболизмом углеводных компонентов клеточной стенки: Биологические функции 1,3-β-глюканаз в высших растениях очень разнообразны и часть их связана с защитой от патогенов (Beffa et al., 1996). Большинство из них относится в группу так называемых PR-белков, индуцирующихся в растениях в ответ на заражение различными патогенами, в том числе и вирусными. Относительно недавно была показано, что одна из β-1,3-глюканаз, субстратом которой является каллоза, участвует в вирусном патогенезе, влияя на способность

растительной клетки пропускать вирусную РНК через каналы плазмодесм (Bucher et al., 2001).

1.6. Исследование морфофизиологических характеристик трансформантов табака.

Для выявления возможных рецессивных генетических изменений, а также их наследуемости, оценка пров потомков.

По строению цветков и соцветий, а также по одилась на протяжении 3-х поколений (T_1 - T_3), при отборе трансгенных Км-устойчивых о срокам цветения трансгенные растения табака T_1 , T_2 и T_3 не отличались от контрольной группы. Как видно из данных, представленных на рис. 7., в поколении T_2 у 90% трансгенных линий с данной вставкой наблюдались нарушения жизнеспособности растений, выраженные в пониженной всхожести семян, полученных при самоопылении трансформантов., у 90% линий всхожесть семян T_2 была не более 5%. У 8 из 10 линий всхожесть семян

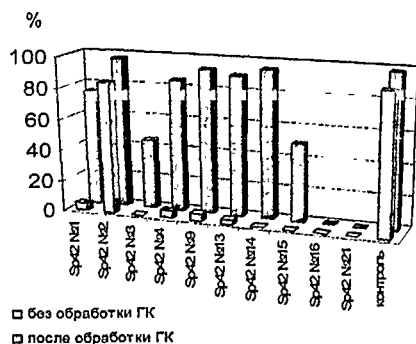


Рисунок 7. Всхожесть семян T_2 разных трансгенных линий табака (% от высеванных семян).

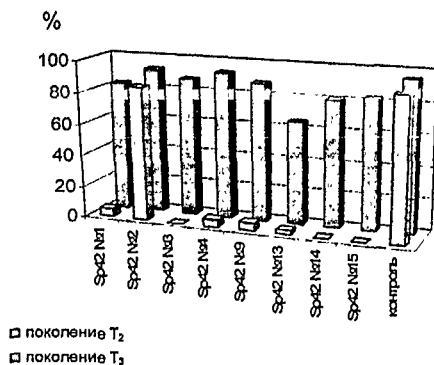


Рисунок 8. Наследуемость уровня всхожести семян.

восстанавливалась при обработке их раствором гибберелловой кислоты. Всхожесть семян, полученных от этих растений была в среднем на уровне контрольных нетрансгенных (рис. 8). То есть нарушения всхожести не являлись наследуемыми.

При наблюдении за развитием трансгенных регенерантов T_1 не было отмечено визуально заметных отличий от морфотипа контрольных регенерантов. Однако среди потомков T_2 - T_3 трансформантов нами наблюдались следующие множественные морфологические отклонения, проявляющиеся на разных стадиях развития:

- отрицательный гравитропизм корней у проростков;
- снижение апикального доминирования (образование боковых побегов на ранних стадиях развития);

- появление аномальных форм при проращивании в культуральных условиях (рис.9.)
- изменение формы листовой пластинки (сужение и вытягивание);

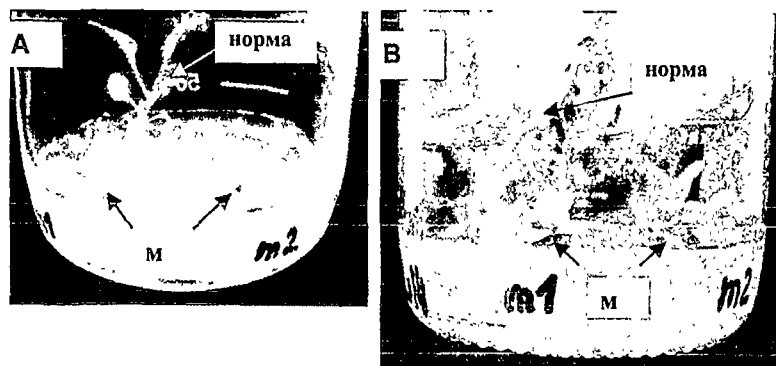


Рис. 9. Проростки табака Т₂ линии Sp42 №14 с аномальным фенотипом, отобранные на среде с Km (150 мг/л). А - 1 неделя после пересадки на среду без Km: норма – трансгенный проросток с нормальным фенотипом, м – проростки с мутантным фенотипом; В – через 6 недель.

Таблица 2. Морфологические отклонения, встречающиеся у трансформантов табака Т₂- Т₃. Цветом выделены данные линий, имеющие статистически значимые отклонения от контроля по данному признаку.

Линия	Тип наследования Т- ДНК	Изменения формы листа, встречаемость (+/-)		Образование боковых побегов (% от выборки)		Отрицательный гравитропизм корней		Потомки с аномальным фенотипом, % выборки	
		Т ₂	Т ₃	Т ₂	Т ₃	Т ₂	Т ₃	Т ₂	Т ₃
контроль		-	-	7,1	0	-	-	-	-
Sp42 №1	монокенное	-	-	0	Не испл	-	-	-	5,43-0,48
Sp42 №2	монокенное	-	-	12,5	Не испл	-	-	-	-
Sp42 №3	монокенное	+	-	0	Не испл	-	-	-	-
Sp42 №4	монокенное	-	-	25	Не испл	+	-	4,65	4,12-0,71
Sp42 №9	монокенное	-	-	80	0	-	+	-	+
Sp42 №13	дигенное	+	-	0	Не испл	-	+	-	-
Sp42 №14	монокенное	-	-	33	0	+	-	3,75	2,06
Sp42 №15	монокенное	-	-	67	7,1	-	-	-	1,17

Следует заметить, что все отклонения, за исключением случаев снижения апикального доминирования, не выявлялись в группе нетрансгенных растений (табл. 2). Но по этому признаку показано, что частота появления растений с увеличенным боковым побегообразованием в трансгенных линиях Sp42 №9 и Sp42 №15 статистически значимо выше, чем в нетрансгенной группе ($P > 0,05$). Снижение апикального доминирования не может быть результатом стимуляции семян гиббереловой кислотой, так как в норме у табака обработка ею приводит к повышению апикального доминирования и подавлению образования боковых побегов (Гребинский С.О., 1961). У некоторых линий (Sp42 №9, Sp42 №4, Sp42 №14) наблюдались изменения разного типа одновременно (табл. 2).

Ненаследуемость всех наблюдаемых морфологических изменений в следующем поколении указывает на то, что изменения являются результатом мутационного происхождения (в результате инсерции Т-ДНК), так и об их соматоклональной природе, и свидетельствует скорее об их эпигенетической природе.

Обращает на себя внимание тот факт, что каждое морфологическое отклонение выявляется не у одной линии, а сразу у нескольких линий, проявляясь в разных поколениях. Однотипность наблюдаемых изменений предполагает воздействие на растения некоторого общего фактора, которым, по-видимому, является экспрессия трансгенной вставки.

2. Получение и исследование трансгенных растений пшеницы.

2.1. Получение трансгенных растений.

Применяемая нами методика трансформации пшеницы требовала использования достаточно большой выборки реципиентных растений. Проблему составлял и первичный отбор трансформантов, поскольку не существовало уверенности в корректной экспрессии маркерного гена *hpt* в геноме пшеницы. Была применена ступенчатая система отбора: растения были объединены в группы, на первом этапе проведен анализ суммарных проб ДНК группы проростков (10-12 растений в группе) методом Саузерн-дот-гибридизации с [32 P] – меченным зондом, полученным из ДНК плазмиды pSIR 42., отбор «+» групп и процедура ПЦР-амплификации с пробами ДНК индивидуальных растений на заключительном этапе. Опыт был проведен в двух вариантах.

Так, в первом варианте опыта от 100 растений, подвергшихся процедуре трансформации в условиях теплицы, было получено 66 зерен (табл. 3). С «+» пробами для дополнительной проверки была проведена ПЦР-амплификация с праймерами Ic и IIc, подтвердившая присутствие трансгенного фрагмента (рис.10). В конечном итоге нами было получено 11 растений, амплификаты ДНК которых показали присутствие 0,35 тпн фрагмента, от них путем самоопыления (с использованием изоляторов) были получены зерна следующего поколения.

Во втором варианте эксперимента, который проводился в полевых условиях, для увеличения вирулентности агробактерий использовалась стимуляция ацетосирингоном. Выращенные из зерен растения были проанализированы на

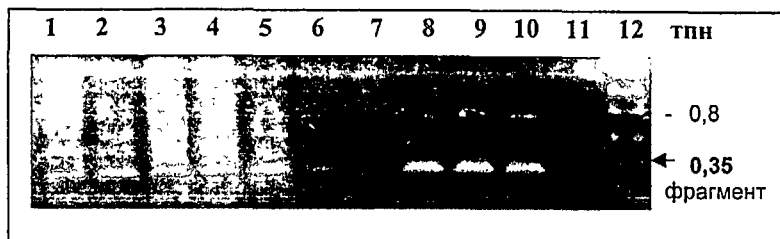


Рисунок. 10. Электрофореграмма продуктов ПЦР-амплификации ДНК растений пшеницы и табака с праймерами Ic и IIc, 2% агарозный гель.

1-5 пробы трансформированной пшеницы Т₁ групп 1, 2, 3, 5, 6; 6 – проба трансгенного гибридного табака (Смирнов, 1993); 7 – проба контрольной пшеницы сорта «Хакасская»; 8-10 – пробы табака Т₀ Sp42 №1, №3, №13; 11- проба контрольного табака сорта Samsun, 12 – ДНК фара λ / PstI.

присутствие Т-ДНК по схеме, описанной выше, за исключением того, что для отбора использовали не Саузерн-дот-гибридизацию, а ПЦР-анализ.

В результате суммарно в двух вариантах опыта было получено 80 линий трансформантов Т₁.

2.2. Наследование трансгенной вставки.

Были проанализированы потомства Т₂ 47 (8+39) линий со всхожими семенами из 80 первичных трансформантов путем проведения ПЦР-анализа с праймерами Ic и IIc, или только с праймером Ic на сохранение трансгенной вставки в виде инвертированного повтора. Исследуемые линии различались по количеству семян, полученных от растений Т₀ – от 3 до 31 зерновки. Образцы, в которых искомый фрагмент не амплифицировался, подвергались повторной проверке для избежания выбраковки из-за случайных причин.

Из 47 исследованных по индивидуальным пробам линий у 38 (7+31) линий все исследованные потомки несли трансгенную вставку. Расщепление в потомстве по признаку наличие/отсутствие трансгенного фрагмента обнаружили 8 (1+7) линий, была выявлена единственная линия, с18р6, у которой не наблюдалось сохранения вставки в Т₂. Отдельно следует отметить отсутствие расщепления в потомстве у большей части проанализированной выборки. Отсутствие расщепления в случае линий с малочисленным потомством можно объяснить вероятностными причинами, при этом следует помнить, что вероятность выщепления потомков без трансгена в небольшой выборке значительно уменьшается у линий с двумя и более независимыми вставками.

2.3. Анализ растений на отсутствие агробактерий.

Поскольку в ряде работ сообщалось, что при агробактериальной трансформации *in vitro* и *in planta* существует возможность сохранения агробактерий в межклеточном пространстве растительных тканей, у части выборки трансформантов был проведен анализ на присутствие

агробактериального вектора. Для этого использовали следующий подход: присутствие агробактерий в предполагаемом трансформанте определялось по наличию в его ДНК-пробе последовательностей Тi-плазмиды, находящихся вне области Т-ДНК. Были подобраны 25-нуклеотидные праймеры *AmpI* и *AmpII* к последовательности гена устойчивости к ампициллину, локализованного в *pSIR42* вне области Т-ДНК (рис. 1), длина амплификата с этих праймеров составляет 0,45 тпн. Последовательность, гомологичную гену *Ar^R* (фрагмент

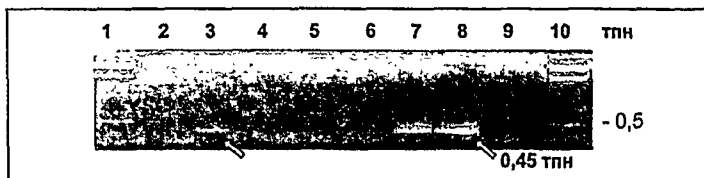


Рис. 11. Электрофореграмма продуктов ПЦР-амплификации ДНК с праймерами *AmpI* и *AmpII*, 1,6 % агарозный гель. 1,10 – ДНК фага λ , рестрицированная *HindIII*; 2, 3, 4 – пробы табака трансгенных линий Sp42 №4, №9, №14; 5 – контрольная нетрансформированная пшеница; 6, 7 – пробы пшеницы T_2 линии c28p4 и c28p5; 8 – проба плазмиды *pSIR42*; 9 – проба без ДНК.

0,45 тпн) была обнаружена у 3х линий пшеницы из 11 исследованных линий, проверенных ранее на присутствие инвертированного повтора, а также у одной линии табака (Рис. 11).

Однако при интеграции Т-ДНК в геном хозяина с довольно высокой частотой происходит встраивание прилегающих к ней векторных последовательностей (Филиппенко и др., 2000), поэтому делать однозначный вывод о присутствии агробактерий на основании полученных данных не вполне корректно. Но растения, пробы которых не дают сигнала на *Ar^R* последовательность, можно считать свободными от агробактериального вектора. Следовательно, как минимум у 8 растений (72,7 % исследованной группы) амплификация целевого гена шла с геномной ДНК растения.

2.4. Проверка устойчивости к канамицину.

Для проверки активности гена *nptII*, сцепленного с трансгенной последовательностью, нами был проведен физиологический тест на устойчивость к канамицину. Исследовали потомства T_2 5 линий, у каждого растения наличие вставки проверялось ПЦР-анализом. Было выявлено, что желтый (неустойчивый) фенотип проявлялся как у нетрансгенных, так и у трансгенных потомков, в то время как зеленый фенотип (устойчивый) проявлялся только у трансгенных. Это может объясняться нестабильностью экспрессии гена *nptII* в составе Т-ДНК, встроенной в геном пшеницы.

2.5. Эффективность трансформации пшеницы.

Трансформация злаков до настоящего времени остается достаточно сложным и трудоемким процессом. Методики трансформации растений *in planta*

лишены сложности культуральных процедур, успешно применяются на многих культурах (Feldmann and Marks, 1987; Clough and Bent, 1998; Ye G.N. et al, 1999; Bent, 2000). Для пшеницы методика *in planta* при оплодотворении была впервые применена группой немецких исследователей (Hess et al, 1990). Трансформация обеспечивалась внесением суспензии агробактерий в колоски пшеницы в момент созревания пыльцы.

Наши данные по трансформации пшеницы *in planta* суммированы в таблице 3. Эффективность трансформации мы оценивали по числу линий, сохранивших трансгенную вставку в растениях поколения T_2 . Наблюдаемая значительная разница в числе трансформантов между поколениями T_1 и T_2 в значительной степени обусловлена невсхожестью семян T_2 , полученных от ряда «+»растений T_1 - 33 (3+30). Из числа трансформантов мы также исключили линии, обнаруживающие последовательность векторной плазмиды pSIR42, не принадлежащую Т-области (3 линии). В конечном результате она составила 0,55 % в первом варианте опыта и 2,91 % во втором, с применением ацетосирингона. Наблюдаемое увеличение эффективности трансформации (табл. 3), по-видимому, объясняется тем,

Таблица 3. Результаты трансформации пшеницы.

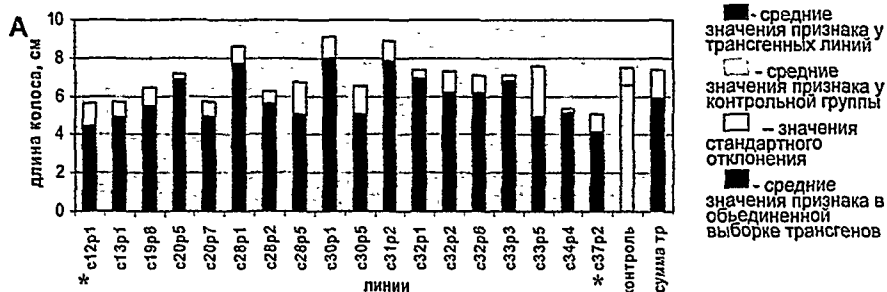
варианты опыта	число обработанных завязей	число завязавшихся зерен	% завязывания	кол-во растений T_1 с «+» сигналом	число линий T_2 с «+» сигналом	% трансформации
1	2000	66	3	11	8	0,55
2	1200	254	20,8	69	35	2,91

что результативность примененной методики в большей степени зависит от условий при завязывании семян, чем от применения дополнительного стимулятора в виде ацетосирингона.

Эффективность агробактериальной трансформации *in planta*, проведенной по нашей методике, оказалась выше, чем описано в литературе для пшеницы (Hess et al, 1990).

2.6. Изменения признаков у трансформантов пшеницы T_2 .

Изменения признаков трансформантов, обусловленные активностью перенесенных генов, часто, при доминантности генов проявляются уже в первом поколении трансформантов – T_1 , при использовании методик трансформации *in planta*, морфологические изменения, обусловленные мутациями, выявляются на растениях T_2 поколения. Визуально трансформанты пшеницы T_1 не отличались от нетрансгенных растений контрольной группы. Однако известно, что большинство мутаций, связанных с инсерцией Т-ДНК, являются рецессивными и фенотипически проявляются только при гомозиготном статусе растения. В T_2 мы столкнулись с невсхожестью семян (41,25% всех «+» линий T_1 , при 71,66% всхожести у контроля). Наблюдая за развитием растений поколения T_2 , мы не выявили

**Б**

	SS	df	ms	Средняя по опыту	= 6.011
Общее	168.269	86		Стандартная ошибка	= 0.523
Варианты	86.990	18	4.8328	Относительная ошибка	= 8.693%
Ошибка	81.278	68	1.1953	Средневзвешенная повторность	= 4.377
				F-критерий Фишера	= 4.043*
				HCP	= 1.474

Рисунок 12. Изменчивость по признаку *длина главного колоса* у T_2 .

А – диаграмма разброса средних значений признака по выборке, * - линии, значительно отличающиеся по критерию Дункана; Б – таблица дисперсионного анализа данных по признаку: * - различия значимы, SS – сумма квадратов, df – число степеней свободы, ms – средний квадрат, HCP – наименьшая существенная разность

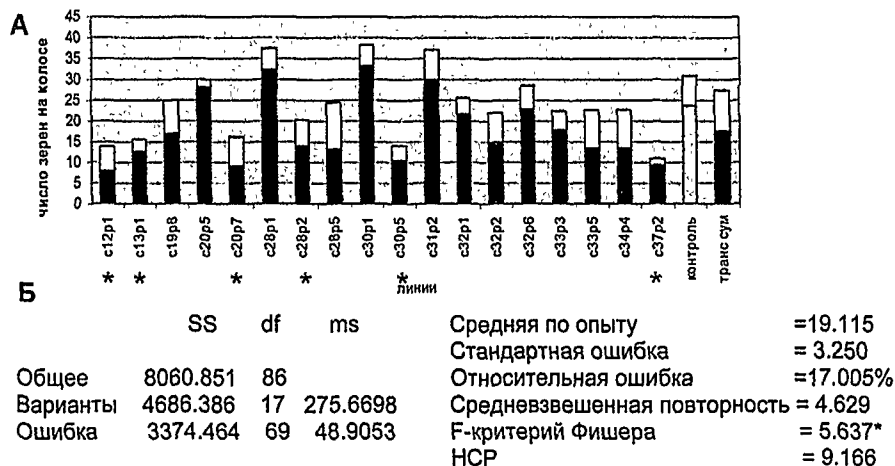


Рисунок 13. Изменчивость по признаку *число зерен на главном колосе* у T_2 .

А – диаграмма разброса средних значений признака по выборке; Б – таблица дисперсионного анализа.

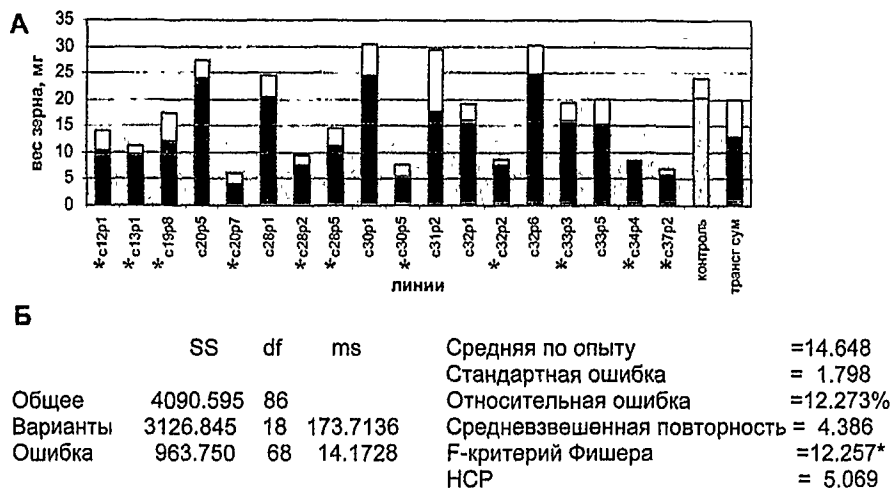


Рисунок 14. Изменчивость по признаку *средний вес зерновки* у T_2 .

А – диаграмма разброса средних значений признака по выборке; Б – таблица дисперсионного анализа.

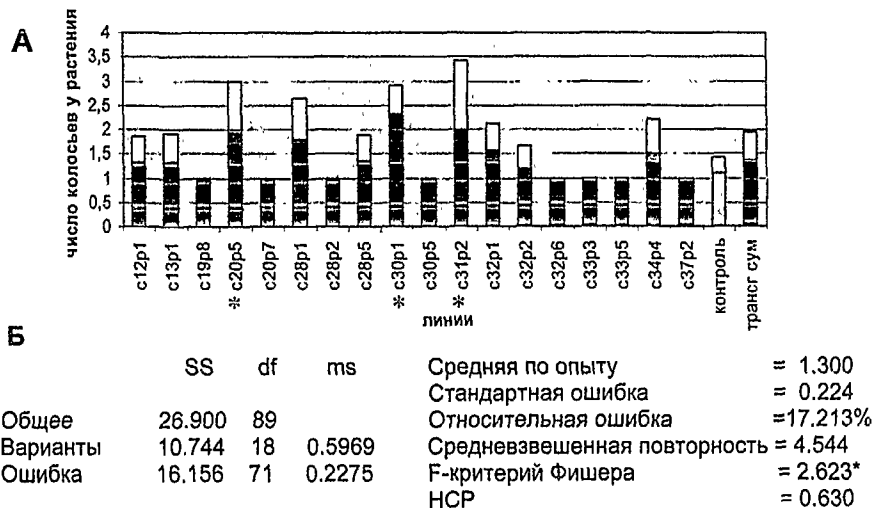


Рисунок 15. Изменчивость по признаку *продуктивная кустистость* у трансформантов T_2 разных линий. А – диаграмма разброса средних значений признака по выборке; Б – таблица дисперсионного анализа.

явных морфологических отклонений. Однако в трансгенной группе было отмечено увеличение размаха изменчивости по некоторым количественным признакам, в первую очередь по продуктивному кущению. Для проверки случайности наблюдаемых различий, был проведен однофакторный дисперсионный анализ с использованием метода неорганизованных повторений и критерия Дункана для оценки разнородности групп. Оценивали изменчивость по группе признаков, связанных с продуктивностью растений, таких как: 1) *продуктивное кущение* (число колосьев на растение), 2) *длина главного колоса*, 3) *число колосков в колосе*, 4) *число зерен на главном колосе*, 5) *средний вес зерновки*.

В эксперименте было проанализировано потомство 18 независимых трансгенных линий. От каждой линии высаживали по 5-10 зерен. Контрольная группа состояла из 20-ти растений пшеницы сорта «Хакасская». Для каждой линии проводили ПЦР-анализ для подтверждения присутствия трансгенной вставки и выявления расщепления в потомстве T_2 . Результаты исследования представлены на рис. 12-15 (кроме признака *число колосков на колосе*).

По всем признакам у трансгенных растений выявлены следующие закономерности:

- изменение средних значений признаков (объединенных данных по всем линиям) по сравнению с контрольной группой при увеличении по ним стандартных отклонений, в разной степени по каждому признаку. За исключением признака *число колосков на колос* (не представлено в автореферате), разница средних значений признаков у трансгенной выборки и нетрансгенной значительно превышает 5% уровень случайной ошибки. По одному из признаков (*продуктивное кущение*) у трансформантов наблюдалось увеличение средних значений, по остальным четырем – их снижение.
- значительный разброс частных средних по каждому признаку между линиями независимых трансформантов.

Было показано, что по каждому из признаков группа трансгенных растений (потомства T_1 ряда линий) статистически значимо отличается от растений контрольной группы, значения F- критерия выше критических для данных степеней свободы. Сводные данные представлены в табл.4.

Таблица 4. Результаты дисперсионного анализа различий потомств T_2 трансгенных линий от контрольной группы по признакам, связанным с продуктивностью.

Признаки	Относительная ошибка, %	Число степеней свободы	Значение F-критерия	% линий, отличающихся от контроля
<i>Продуктивная кустистость</i>	17,23	18 / 89	2,623	16,17
<i>Длина главного колоса</i>	8,69	18 / 86	34,043	11,1
<i>Число колосков на колосе</i>	4,21	18 / 115	7,118	27,8
<i>Число зерен на главном колосе</i>	17,00	18 / 86	5,637	33,3
<i>Средняя масса зерновки</i>	12,27	18 / 86	12,257	61,1

Однотипность изменений, наблюдавшихся у разных линий, исключала инсерционный мутагенез. Для проверки влияния возможно сохранившихся агробактерий на изменение признаков пшеницы с группой растений был проведен ПЦР-анализ на присутствие векторной последовательности (рис. 11). В линиях, демонстрировавших отклонения, не обнаружено присутствия агробактериальной последовательности, за исключением линии с28p5.

Для проверки наследуемости изменений исследовали потомства T_3 у 6-ти линий с наиболее выраженными отклонениями по 4 признакам. От каждой линии было высажено по 5-6 зерен, контрольная группа состояла из 18 растений. Выращенные потомки T_3 оценивались по тем же параметрам, что и родительские растения T_2 . По результатам ПЦР-амплификации индивидуальной ДНК растений с праймером Ic была проведена селекция на сохранение вставки и отбраковка нетрансгенных экземпляров.

Дисперсионный анализ данных, полученных по поколению T_3 , показал, что из всех признаков достоверные различия между трансгенами T_3 и контрольной группой выявляются только по признаку *продуктивная кустистость* (увеличен у трансгенных линий с повышенным кущением в T_1). Таким образом, из всех отклонений наблюдавшихся в T_2 , наследовались только изменения *продуктивной кустистости*.

Заключение

В результате проведенных экспериментов были получены 8 трансгенных линий табака и 43 линии трансгенной пшеницы, стабильно сохраняющие на протяжении 3-х поколений (до T_2) конструкцию, несущую экспрессируемую последовательность бактериального происхождения в виде протяженного инвертированного повтора. Данная конструкция обеспечивает синтез в трансгенных растениях РНК, имеющую шпильчатую, двунитевую структуру, что было показано ранее (Смирнов и др., 1993), а также подтверждено в нашем эксперименте с трансгенными растениями табака.

Как известно, двунитевая РНК, экспрессируемая чужеродной последовательностью, вызывает в организме растений инициацию процессов РНК-интерференции, приводящих к выключению активности (на уровне РНК) как введенного гена, так и гомологичных ему генов хозяина.

Нами было выявлено повышение уровня устойчивости к ВТМ у трансгенных растений табака разных линий, экспрессирующих днРНК, выражавшееся в задержке развития заболевания у инфицированных растений, изменения характера симптомов, а при заражении штаммом ВТМ N2² - уменьшении накопления белка оболочки вируса. Наблюдаемое у трансгенного табака повышение уровня устойчивости к вирусу нельзя отнести за счет интерферирующего действия днРНК, так как ее нуклеотидная последовательность не имеет гомологии с ВТМ. Можно предположить, что

конститутивный синтез днРНК в растении, индуцируя начальные стадии PTGS/РНК-интерференции, активирует и ряд участвующих в нем белковых факторов (или увеличивает их экспрессию). Их активное состояние, повышенный уровень содержания этих факторов в трансгенных растениях в момент начальных событий инфекции может обеспечивать наблюдаемое повышение уровня устойчивости.

Нами были выявлены неизвестные полипептиды, с молекулярной массой 25 и 30 кДа, синтезирующиеся *de novo* в трансгенных растениях при вирусной инфекции. Проведенное исследование полипептида массой 30 кДа позволило определить аминокислотную последовательность фрагмента молекулы и выявить его гомологию с растительными β -эндоглюканазами. Можно предположить, что индуцированный инфекцией в трансгенных растениях белок с молекулярной массой 30 кДа является новым неизвестным представителем семейства β -эндоглюканаз, в регуляции экспрессии которого участвует днРНК. Видимо, активация его синтеза зависит не только от присутствия днРНК, но требует участия некоторого вирусного фактора, т. к. данный белок обнаруживался только в зараженных трансгенных растениях. Это говорит о том, что его функции в растении, по-видимому, связаны с защитой или патогенезом. При этом следует отметить, что индукция этой β -эндоглюканазы происходит не под контролем гена *N*, как у известных глюканаз из группы PR-белков.

На двух видах растений - табаке и пшенице, на независимо полученных линиях, наблюдались множественные изменения морфологических, физиологических и количественных признаков, большинство из которых оказались ненаследуемыми. Использование способа трансформации *in planta* исключает объяснения, связанные с соматональной изменчивостью (как результат культивирования организма в условиях *in vitro*). Сходство наблюдаемых нами отклонений у разных видов, повторяемость однотипных отклонений в разных линиях, (повышенное боковое побегообразование у табаков и повышенная продуктивная кустистость у пшеницы; пониженная всхожесть семян, полученных от T_1) при разных способах трансформации указывает на роль общего фактора - экспрессии трансгенной вставки. Мы считаем, что наблюдаемые отклонения связаны с синтезом двунитовой РНК. Полученные нами данные по множественным морфофизиологическим отклонениям и нарушению всхожести семян у трансгенных растений мы связываем с неспецифическим влиянием процессов сайленсинга, запускаемых экспрессируемой в растениях дцРНК. С начала использования антисенс-технологии для изучения функций генов и решения прикладных задач достаточно регулярно поступают сообщения о нарушениях у нокаутных трансгенных растений морфологии, об отклонениях по признакам, связанным с генеративной сферой, с продуктивностью (Поройко и др., 2000; Xiao et al., 2003; De Ronde, 2004). Следует отметить, у растений существуют белковые факторы, участвующие в процессах РНК-интерференции, узнающие днРНК и способные влиять на морфогенез растений (Lu C., 2000; Vazquez F., 2004).

В заключение можно сказать, что по-видимому, при планировании исследований растительных объектов с использованием антисенс-методов, как и для таких экспериментов на животных, необходимо минимизирование длины двунитевой РНК во избежание нежелательных вторичных эффектов. Также нежелательно использование конститутивных промоторов, конструкций в виде инвертированных повторов, обеспечивающих синтез чужеродной днРНК на эмбриональных и ранних стадиях развития растений.

Выводы:

1. Получены трансгенные растения табака *Nicotiana tabacum* cv. Samsun (8 линий) и трансгенной пшеницы *Triticum aestivum* L. (43 линии) несущие гетерологичную последовательность бактериального происхождения, организованную в виде инвертированного повтора и детерминирующую в растении синтез двунитевой РНК. Показано, что трансгенные растения табака и пшеницы сохраняют данную вставку на протяжении трех поколений (T_1 - T_3). На трансгенных растениях табака поколении T_2 показана экспрессия двунитевой РНК.
2. Впервые показано, что в трансгенных растениях табака с чувствительным к ВТМ генотипом, экспрессирующим гетерологичную двунитевую РНК, не несущую гомологии с геномом вируса, повышен уровень устойчивости при поражении ВТМ. Проявление устойчивости зависит от степени патогенности штамма ВТМ, при заражении слабопатогенным штаммом изменения уровня устойчивости не наблюдается.
3. Показано, что изменение уровня устойчивости трансгенных растений табака при инфицировании штаммом ВТМ N2² сопровождается синтезом *de novo* полипептидов с молекулярной массой 25 и 30 кДа, индуцирующихся до формирования выраженных симптомов заболевания.
4. Проведено автоматическое секвенирование аминокислотных последовательностей триптических пептидов белка с молекулярной массой 30 кДа. Компьютерным анализом установлена его гомология с ферментами семейства β -эндогликоканаз растений. Гомологии с известными PR-белками растений рода *Nicotiana* не выявлено.
5. У потомства трансформантов поколений T_2 и T_3 выявлены множественные изменения как морфологических, так и количественных признаков, связанных с продуктивностью. У трансгенных растений табака (90 % линий) и пшеницы (41,25 % линий) показано нарушение всхожести семян, полученных от растений поколения T_1 . Все изменения, кроме повышения продуктивного кущения у пшеницы, не являются наследуемыми. Для обоих видов наблюдаемые изменения, по - видимому, обусловлены экспрессией двунитевой РНК в растениях.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. Пухальский В.А., Смирнов С.П., Коростылева Т.В., Билинская Е.Н., Елисеева А.А. Генетическая трансформация мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) с помощью *Agrobacterium tumefaciens* // Генетика. 1996. Т 32. №.11. С. 1696-1500.
2. Коростылева Т.В., Петрова О.С., Андреева Э.Н., Одинцова Т.И., Смирнов С.П., Пухальский В.А. Устойчивость к ВТМ трансгенных растений табака, продуцирующих двунитевую РНК. Тезисы докладов VII международной конференции «Биология клеток растений *in vitro*, биотехнология и сохранение генофонда». Москва, 1997. С. 268-269
3. Пухальский В.А., Смирнов С.П., Коростылева Т.В., Билинская Е.Н., Елисеева А.А. Генетическая трансформация мягкой пшеницы. Тезисы докладов VII международной конференции «Биология клеток растений *in vitro*, биотехнология и сохранение генофонда». Москва, 1997. С. 298-299.
4. Коростылева Т.В., Одинцова Т.И., Козловская Г.В., Пухальский В.А. Исследование белков листьев трансгенных растений табака, экспрессирующих двунитевую РНК, при вирусной инфекции // Генетика. 2004. Т. 40. № 4. С. 531-537.
5. Korostyleva T.V., Kozlovskaya G.V., Pukhalskiy V.A. Morphogenetic changes in transgenic plants bearing the insertion expressing double stranding RNA. Сборник материалов международного симпозиума «Физиология трансгенного растения и проблемы биобезопасности». Москва, 2004. С. 13.
6. Korostyleva T.V., Kozlovskaya G.V., Pukhalskiy V.A. The alteration in several yield-contributing traits in transgenic wheat // Annual Wheat Newsletters. 2005. v. 51. p. 151-152.

Напечатано с готового оригинал-макета

Издательство ООО "МАКС Пресс"

Лицензия ИД N 00510 от 01.12.99 г.

Подписано к печати 04.09.2006 г.

Формат 60х90 1/16. Усл.печ.л. 1,5. Тираж 100 экз. Заказ 579.

Тел. 939-3890. Тел./Факс 939-3891.

119992, ГСП-2, Москва, Ленинские горы, МГУ им. М.В. Ломоносова,
2-й учебный корпус, 627 к.

1006A
21812

21812