

На правах рукописи

Маренкова

МАРЕНКОВА ТАТЬЯНА ВЛАДИСЛАВОВНА

**ИЗУЧЕНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ ЭКСПРЕССИИ ЧУЖЕРОДНЫХ ГЕНОВ
У ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА (*Nicotiana tabacum* L.)**

Генетика – 03.00.15

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск
2005

Работа выполнена в лаборатории гетерозиса растений Института цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, г. Новосибирск.

Научный руководитель: доктор биологических наук
Елена Викторовна Дейнеко
Институт цитологии и генетики
СО РАН, г. Новосибирск

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Илья Кузьмич Захаров
Институт цитологии и генетики
СО РАН, г. Новосибирск

доктор биологических наук
Ирина Васильевна Голденкова
Институт общей генетики
им. Н.И. Вавилова, г. Москва

Ведущее учреждение: Санкт-Петербургский государственный университет

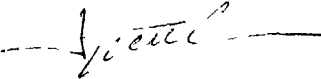
Защита состоится 25 мая 2005 г. на утреннем заседании Диссертационного совета по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук (Д-003.011.01) при Институте цитологии и генетики Сибирского отделения РАН по адресу: 630090, г. Новосибирск, пр. академика Лаврентьева, 10.

Факс: (3832) 33-12-78; e-mail: dissov@bionet.nsc.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии и генетики Сибирского отделения РАН.

Автореферат разослан 19 апреля 2005 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета
доктор биологических наук

 А.Д. Груздев

Введение

Актуальность темы. Бурное развитие генетической инженерии и биотехнологии, разработка методов переноса генетического материала в растительную клетку позволило модифицировать геном многих видов растений. Трансгенные растения представляют собой яркий пример преодоления физических, эволюционных и генетических барьеров, которые изолируют геномы различных организмов (Miki, McNugh, 2004). К настоящему времени накоплены экспериментальные данные о нестабильности экспрессии чужеродной генетической информации в растительном геноме, связанные, главным образом, с инактивацией и изменениями в экспрессии гетерологичных генов (Flavel, 1994; Matzke, Matzke, 1995; Matzke et al., 2000). На трансгенных растениях табака, риса и *Arabidopsis thaliana* получены модельные линии, позволяющие изучать данный феномен (Kilby et al., 1992; Matzke et al., 1994a; Voucheret et al., 1994; Davies et al., 1997; Mittelsten Sheid et al., 1998; Fu et al., 2000). Матзке с соавт. на трансгенном табаке исследовали свойства и структуру трансгенного Н локуса, который включает серию аллелей. Аллели со сложной структурой Г-ДНК (с дупликациями, векторными последовательностями) способны вызывать процесс транс-инактивации других чужеродных генов под управлением *NOS* промотора в геноме гибридов (Matzke et al., 1989, 1994a; Jakowitsch et al., 1999). Достаточно хорошо исследован мультикопийный locus 271, способный вызывать замолкание экспрессии трансгенов, находящихся под управлением 35S промотора ВМЦК у трансгенных растений табака (Voucheret et al., 1994; Park et al., 1996). Именно на трансгенных растениях петунии и томата в 1990 году впервые был описан феномен косупрессии – координированного подавления экспрессии трансгенов и гомологичных им хозяйских генов, связанного с посттранскрипционным разрушением мРНК в цитоплазме (Napoli et al., 1990; Van der Krol et al., 1990; Smith et al., 1990). Данное явление в настоящее время обнаружено у нематоды *Caenorhabditis elegans* (Fire et al., 1998), *Drosophila melanogaster* (Misquitta et al., 1999; Pal-Bhadra et al., 2002), *Trypanosoma brucei* (Ngo et al., 1998), *Paramecium* (Ruiz et al., 1998), млекопитающих (Wianny et al., 2000) и получило название РНК интерференция.

Сходный феномен инактивации множественных копий генов в ядерном геноме в настоящее время активно исследуется у низших грибов *Neurospora crassa* (Selker, 1997), *Ascobolus immersus* (Rhounum et al., 1992), *Coprinus cinereus* (Freedman, Pukila, 1993), *Magnaporthe grisea* (Ikeda et al., 2002) и *Podospora anserina* (Graia et al., 2001). Показано, что интеграция множественных тандемных копий гена *white* в геном *Drosophila melanogaster* приводила к нарушению стабильности экспрессии трансгена, что проявлялось либо как мозаицизм, либо как отсутствие ожидаемого фенотипа (Dorer, Henikoff, 1997). Авторами была установлена отрицательная корреляция между числом встроенных копий трансгена и стабильностью его экспрессии. Взаимосвязь между числом копий гена и уровнем его экспрессии обнаружена и для ряда собственных растительных генов (Todd, Vodkin, 1996; Luff et al., 1999). Так ген *pai1-pai4 A thaliana* линии Wassilewska, организованный в виде инвертированного повтора, подавляет экспрессию трех гомологичных однокопийных генов *pai1*, *pai2*, *pai3* линии Colombia при объединении их в геноме гибридов (Luff et al., 1999).

Таким образом, в связи с интенсивным развитием генетической инженерии и биотехнологии растений проблема инактивации экспрессии чужеродных генов в трансгенных растениях представляется весьма актуальной. Важность данных исследований очевидна, так как усилия многих исследователей по реконструкции генома растений могут не привести к желаемым результатам. Исследования феномена инактивации экспрессии чужеродных генов в геноме трансгенных растений вносят существенный вклад и в решение фундаментальных задач – выявления новых механизмов регуляции экспрессии растительных генов и устойчивости к вирусам, ТЭ, основанных на гомологии нуклеотидной последовательности (Fagard, Vaucheret, 2001; Vance, Vaucheret, 2001; Matzke, Matzke, 2004). Однако, несмотря на очевидный прогресс данного научного направления, остается еще много неясных вопросов. Поэтому изучение стабильности экспрессии чужеродных генов у трансформантов и их потомков, у гибридов от различных видов скрещиваний, получение новых модельных систем на трансгенных растениях представляется чрезвычайно актуальным.

Цель и задачи исследования. Целью настоящего исследования являлось изучение стабильности экспрессии чужеродных генов у трансгенных растений табака (*Nicotiana tabacum* L.) в поколениях от самоопыления и гибридах от различных типов скрещиваний. Для достижения поставленной цели было необходимо решить следующие задачи:

1. Провести гибридологический анализ стабильности экспрессии маркерного гена *nptII* у трансгенных растений табака с одной инсерцией Т-ДНК в ядерном геноме.
2. Проанализировать стабильность наследования гена *nptII* у трансгенных растений табака с множественными событиями интеграции Т-ДНК.
3. Выделить модельные линии трансгенных растений табака, содержащих в составе области Т-ДНК прямые или инвертированные повторы гена *uidA*, с нестабильным характером экспрессии маркерных генов.
4. Провести гибридологический анализ наследования мозаичного характера проявления экспрессии гена *nptIII* в трансгенных растениях табака модельной линии Nu 21.

Научная новизна и практическая ценность. Для изучения наследования и стабильности экспрессии чужеродных генов были выделены модельные линии трансгенных растений табака: 1) трансгенные растения с одиночными и множественными вставками Т-ДНК; 2) трансформанты, имеющие в геноме Т-ДНК инсерцию с дупликацией гена *uidA* и одной копией гена *nptII*; 3) трансгенное растение табака Nu 21 с мозаичным характером проявления экспрессии маркерного гена *nptIII*. В исследовании представлены различные варианты организации инсерций Т-ДНК, при этом, использование маркерных генов позволило на больших выборках проследить особенности их наследования в поколениях и гибридах трансгенных растений. Проведен гибридологический анализ характера наследования маркерного гена *nptIII* в поколениях от самоопыления исходных трансформантов, а так же гибридов от различных видов скрещиваний. Установлено, что частота инактивации гомологичных трансгенов существенно возрастает в геноме гибридных растений. Впервые показано, что наличие дупликации гена *uidA* в составе Т-ДНК инсерции оказывает существенное влияние на стабильность экспрессии рядом расположенного другого маркерного гена *nptII*, при этом инактивированное состояние по гену

uidA влияло на стабильность экспрессии гена *nr11* преимущественно в гемизиготе. Впервые проведен гибридологический анализ наследования мозаичного характера экспрессии маркерного гена *nr11* у потомков (T_1 – T_4) и гибридов от скрещиваний с диким типом трансгенных растений табака. Отобраны гибридные комбинации и потомки от самоопыления, представляющие несомненный интерес для дальнейшего более детального изучения молекулярно-генетических механизмов инактивации экспрессии трансгенов.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы были представлены на следующих конференциях, симпозиумах и конгрессах: международной конференции, посвященной памяти академика А.А. Баева (Москва, 1996 г.); German-Russian Cooperation in Biotechnology. Workshop IV (Russia, St -Peterburg, 1996 г.); международной конференции «Биология клеток растений *in vitro*, биотехнология и сохранение генофонда» (Москва, 1997 г.); международной конференции «Новые направления биотехнологии» (Москва, 1998 г.); International Congress «Plant Biotechnology and in vitro biology in the 21st century» (Jerusalem, Israel, 1998 г.); всероссийском симпозиуме «Изучение генома и генетическая трансформация растений» (Иркутск, 1999 г.); II съезде Всесоюзного общества генетиков и селекционеров (Санкт-Петербург, 2000 г.); конференции молодых ученых, посвященной 100-летию со дня рождения М.А. Лаврентьева (Новосибирск, 2000 г.); международном симпозиуме «Молекулярные механизмы генетических процессов и биотехнология» (Москва–Минск, 2001 г.); I-м международном конгрессе «Биотехнология – состояние и перспективы развития» (Москва, 2002 г.); 8-й международной конференции «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология» (Саратов, 2003 г.); III съезде ВОГиС «Генетика в XXI веке: современное состояние и перспективы развития» (Москва, 2004 г.); международной научной конференции «Молекулярная генетика, геномика и биотехнология» (Минск, 2004 г.); а также в качестве устных докладов на отчетных сессиях ИЦиГ СО РАН (2001, 2004 гг.).

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, трех глав, заключения, выводов, списка цитируемой литературы (276 наименований). Работа изложена на 172 страницах, включает 29 рисунков и 26 таблиц в тексте диссертационной работы.

По теме диссертации опубликовано 7 работ в российских и международных рецензируемых журналах.

Материалы и методы

Исходным материалом для проведения исследований послужили трансгенные растения табака, полученные на основе линии SR1 *Nicotiana tabacum* L. (семена любезно предоставлены доктором Р. Менделем, Институт генетики и растительных ресурсов (IPR), Гатерслебен, Германия). Трансформанты получали методом агробактериальной трансформации листовых дисков по стандартной методике (Дрейпер и др., 1991) с использованием штамма *A. tumefaciens* C58C1 Rif^R (PGV 2260) (Deblacere *et al.*, 1987) (штамм был предоставлен д.б.н. М.И. Ривкиным). Для трансформации табака были использованы различные типы генетических конструкций, сконструированных в секторе геномной инженерии растений ИЦиГ СО РАН д.б.н. М.И. Ривкиным, к.б.н. А.В. Кочетовым, к.б.н. М.В. Пилугиным, Е.А. Трифоновой, В.В. Лукашевой (1991–1995 гг.). Растения под номерами Nu 41, Nu 44, Nu 45, Nu

48, Nu 49, Nu 411, 43, 44, 45, 410, 412, 78, 714, Nu 21 были выделены из популяции трансгенных растений табака, полученных ранее (Дейнеко и др., 1999)

Исходные трансгенные растения были обозначены как T_0 (трансформант), растения, полученные от самоопыления исходного трансформанта, соответственно обозначены T_1 (первое поколение), T_2 (второе поколение) и т. д.

Исследовали стабильность экспрессии маркерного гена *nptII* (обеспечивающего устойчивость трансформантов к антибиотику канамицину) и репортерного гена *uidA* (кодирующего фермент β -глюкуронидазу). Стабильность экспрессии гена *nptII* оценивалась по соотношению канамицин-устойчивых (Km^r) и канамицин-неустойчивых (Km^s) потомков на среде с добавлением антибиотика канамицина (200 мг/л). Стабильная экспрессия трансгена проявлялась в наследовании согласно законам Менделя как доминантной мутации при полном доминировании. У растений с нестабильной экспрессией анализируемого гена в поколениях наблюдали отклонения от менделевского расщепления, мозаичность в проявлении Km -устойчивого фенотипа на уровне соматических тканей (чередование белых и зеленых секторов на листьях) и полную потерю устойчивости к антибиотику. Соответствие фактического расщепления теоретическому оценивали по критерию χ^2 , достоверность различий между группами от скрещиваний растений T_1 по стабильности экспрессии гена *nptII* оценивали по формуле Фишера (Урбах, 1964).

Скрещивание трансгенных растений проводили в 2–3 повторностях для одного и того же варианта с предварительным удалением пыльников и изоляцией цветков на материнском растении. В ходе гибридологического анализа моноинсерционных трансгенных растений Nu 41, Nu 44, Nu 45, Nu 48, Nu 49, Nu 411 были проанализированы первое и второе поколения от самоопыления исходных трансформантов и гибриды F_1 , F_2 от скрещиваний гомозиготных по трансгену растений T_1 . При анализе стабильности экспрессии гена *nptII* у трансгенных растений табака с множественными инсерциями Т-ДНК (под номерами 43, 44, 45, 410, 412, 78, 714) было проанализировано первое и второе поколения от самоопыления и гибриды от скрещивания потомков T_1 между собой по циклической схеме. Для гибридологического анализа стабильности экспрессии гена *nptII* у трансгенных растений с уникальными и повторными последовательностями гена *uidA* (в прямой и обратной ориентацией) в структуре Т-ДНК были проанализированы первое и второе поколения от самоопыления исходных трансформантов и были выполнены следующие типы скрещиваний: с нетрансгенным табаком; скрещивания исходных трансформантов между собой и скрещивания растений первого поколения. Были выполнены три варианта гибридизации исходных трансформантов: 1) скрещивания между собой контрольных растений табака с одной копией гена *uidA* (121 × 121), 2) скрещивания между собой растений с прямой дупликацией гена *uidA* (16 × 16), 3) скрещивания между контрольными растениями и растениями с дупликацией (16 × 121). Для проведения скрещиваний гемизиготных и гомозиготных по трансгену растений первого поколения были отобраны потомки трансформантов 16.40, 16.53 и 121.94. Ген *uidA* в трех типах инсерций был обозначен как А, В и С. Трансен в гемизиготном состоянии, например у потомков 16.40, обозначен А*а (звездочкой помечено инактивированное состояние трансгена), в гомозиготном - А*А*. Инсерция Т-ДНК с дупликацией гена *uidA* в растениях T_1 16.40 - А*abbcc, в потомках T_1 растения 16.53 - aaBbcc, инсерция в контрольных растениях T_1 121.94 с одной копией гена *uidA* - aabbCc. Гибридологический анализ наследования фенотипа мозаичной экспрессии маркерного гена *nptII* у трансгенных растений модельной

включал анализ первого, второго, третьего и четвертого поколений от самоопыления исходного трансгенного растения и гибридов F₁ от анализирующего прямого и обратного скрещиваний растений первого и второго поколений с нетрансгенными растениями табака.

Определение активности фермента NPTII в экстрактах из листьев табака проводилось по стандартной методике (Herrera-Estrella *et al.*, 1988). Флуориметрическое определение активности β-глюкуронидазы проводилось по методике (Дрейпер и др., 1991). Выделение геномной ДНК из листьев табака проводилось с помощью ЦТАБ-буфера (Rogers, Bendich, 1985). Саузерн блот-гибридизация *EcoRI* и *HindIII*-гидролизатов ДНК трансгенных растений проводили на нейлоновых фильтрах («Hybond-N+», «Amersham», Англия) по методу Саузерна с модификациями (Дрейпер и соавт., 1991). В качестве зонда использовали ПЦР продукт на последовательность гена *nptII*. Выделение тотальной РНК из листьев табака осуществлялось по стандартному протоколу (Nagy *et al.*, 1988) с использованием растворов, обработанных 0,1 % диэтилпирикарбонатом. Точечный нозерн-блоттинг проводили по (Дрейпер и др., 1991). В качестве зонда использовали ПЦР продукт на последовательность гена *uidA*. Мечение ДНК (α-³²P)dATP («Amersham», Англия) проводили согласно инструкции производителя набора «Мечение ДНК (реддомпрайм)» фирмы «Силекс М» (г. Москва).

Для подтверждения наличия прямого tandemного повтора гена *uidA* в структуре Т-ДНК у трансгенных растений был использован метод ПЦР. Использовали праймеры на ген *uidA*. Праймеры были подобраны к.б.н. М.Л. Филипенко (ИХБиФМ СО РАН).

Результаты и обсуждение

1. Стабильность экспрессии маркерного гена *nptII* у гибридов от скрещивания трансгенных растений табака с одной и множественными инсерциями Т-ДНК

Известно, что одним из условий инактивации трансгенов является наличие множественных инсерций в геноме трансгенного растения. Проанализирована стабильность экспрессии маркерного гена *nptII* у гибридов от скрещивания между собой растений первого поколения (Т₁) от самоопыления двух случайных выборок исходных трансформантов с одной (шесть растений) и множественными инсерциями Т-ДНК (семь растений).

Показано, что в Т₁ и Т₂ поколениях от самоопыления исходных трансформантов в обеих выборках выявлялась стабильная экспрессия маркерного гена *nptII*. При гибридизации между собой растений Т₁ с несколькими чужеродными инсерциями отклонения от меделевского расщепления, вызванные инактивацией маркерного гена, выявлялись уже в F₁ в 14,3 % случаев (из 42 прямых и обратных скрещиваний). При скрещиваниях гомозиготных моноинсерционных растений табака Т₁ отклонения от ожидаемого дигибридного расщепления отмечались только в F₂ в девяти гибридных комбинациях (в 18 % из 50 прямых и обратных скрещиваний). Данные гибридологического анализа для нескольких гибридных вариантов трансгенных растений с одной инсерцией Т-ДНК были подтверждены Саузерн блот-гибридизацией геномных ДНК (рис. 1). Таким образом, не зависимо от числа встроенных Т-ДНК, проведение скрещиваний трансгенных растений может увеличивать вероятность нарушений стабильности экспрессии перенесенных генов у гибридов. Эти данные важно учитывать при селекционной доработке трансгенных растений.



Рис 1. Саузерн блот-гибридизация *EcoRI*-гидролизатов геномной ДНК из листьев трансгенных растений T_1 и гибридов F_1 .

1–4 растения T_1 Nu 49, Nu 44, Nu 45, Nu 411;

5–7 гибриды F_1 Nu 45 $\times$ Nu 411(2),

Nu 44 $\times$ Nu 49(1), Nu 49 $\times$ Nu 44(1)

2. Влияние наличия дупликации в структуре Т-ДНК на стабильность экспрессии маркерных генов *nrpII* и *uidA* в трансгенных растениях табака

Известно, что процесс инактивации экспрессии перенесенных генов может затрагивать как один (Meza *et al.*, 2001; Kohli *et al.*, 1999), так и все гены, расположенные в области чужеродной инсерции (Gong *et al.*, 2002; Sallaud *et al.*, 2003). Частота инактивации может существенно возрастать, если в состав генетической конструкции включены тандемные копии генов, как в прямой, так и в обратной ориентации (Wang, Waterhouse, 2000; Ma, Mitra, 2002). Поэтому в задачу исследования входило проследить влияние наличия дублицированных фрагментов в структуре Т-ДНК на стабильность экспрессии двух маркерных генов: *uidA* и *nrpII*, как у исходных трансформантов, так и у потомков от самоопыления и гибридов от различных типов скрещиваний трансгенных растений табака.

2.1. Сравнительный анализ стабильности экспрессии гена *nrpII* в первом и втором поколениях от самоопыления трансгенных растений табака (с одной копией гена *uidA* и с дубликациями данного гена в составе Т-области)

Результаты по анализу первого поколения от самоопыления трех групп независимо полученных трансформантов представлены в табл. 1. Были выделены два варианта экспрессии маркерного гена: стабильный и нестабильный. Существенное снижение доли стабильной экспрессии маркерного гена *nrpII* до 20 % в первом поколении происходило только у трансгенных растений с обратной дубликацией гена *uidA*. Это было связано с достоверным, по сравнению с контролем, увеличением до 61,3 % числа трансформантов, у которых в первом поколении с различной частотой выявлялись потомки-мозаики по экспрессии гена *nrpII*. Для растений с прямым тандемным повтором достоверных отличий с контрольной группой растений выявлено не было. Поэтому представляло интерес выяснить, будет ли стабильная экспрессия маркерного гена у данных растений сохраняться во втором поколении от самоопыления. Для этого из групп растений с уникальной последовательностью гена *uidA* (контрольные растения) и прямым тандемом гена *uidA* (опытная группа) случайным образом было отобрано по семь растений. Наличие дубликации гена *uidA* в прямой ориентации в области Т-ДНК подтверждалось методом ПЦР (рис. 2).

Для каждого номера из двух групп трансформантов табака с одной и двумя копиями гена *uidA* в составе Т-ДНК на селективной среде были отобраны от 10 до 27

Таблица 1. Характер экспрессии маркерного гена *nptII* в потомстве от самоопыления трех групп исходных трансгенных растений табака (в %)

Характер экспрессии гена <i>prtIII</i>		Номер трансгенного растения		
		121 (контроль)	16 (с прямой дупликацией гена <i>uidA</i>)	10 (с обратной дупликацией гена <i>uidA</i>)
Стабильный уровень экспрессии		65,0	62,6	20,0
Нестабиль- ный уровень экспрессии	Отклонения от менделев- ского расщепления	7,2	8,1	16,0
	Полная потеря экспрессии	1,0	3,0	2,7
	Мозаичный фенотип	26,8	26,3	61,3*
Всего проанализировано трансформан- тов		97	99	75

* Имеется достоверное различие по сравнению с контролем, $\chi^2_{\text{ст } 0,05} = 3,841$ (d.f. = 1).

растений T₁. В контрольной группе растений с одной копией гена *uidA* в области Т-ДНК у всех проанализированных потомков T₂ расщепление на канамицине соответствовало ожидаемому моногибридному, что свидетельствовало о стабильном уровне экспрессии гена *nptII*. У трансформантов с дупликацией по гену *uidA* стабильное наследование гена *nptII* отмечено только у одного растения, в то время как у остальных шести растений в T₂ выявлены отклонения, вызванные инактивацией экспрессии маркерного гена и появление мозаичных потомков.

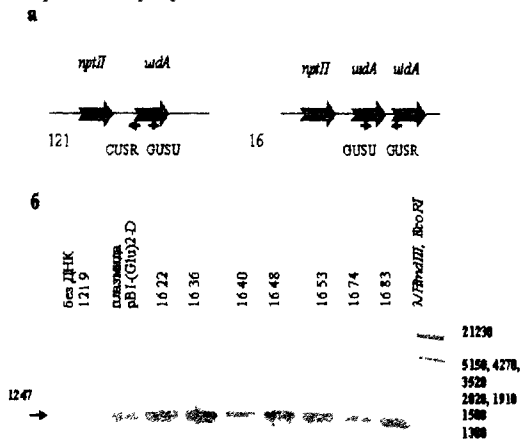


Рис. 2. ПЦР-анализ исходных трансгенных растений табака с прямой дупликацией гена *uidA* в структуре Т-ДНК.

Обозначения:

а – схема расположения праймеров на кодирующую последовательность гена *uidA* GUSU и CUSR;
б – электрофореграмма продукта ПЦР.

На основании полученных данных можно сделать вывод, что в опытной группе растений, у которых ген *nptII* находится в соседстве с дупликацией гена *uidA*, среди потомков T₁ (в случае инвертированной дупликации) и в T₂ (в случае прямой дупликации) происходило нарушение экспрессии *nptII* гена, тогда как в контрольной группе растений наблюдалась стабильная экспрессия маркерного гена

2.2. Анализ активности фермента β -глюкуронидазы в двух группах трансгенных растений табака (с одной копией гена *uidA* и прямой дубликацией данного гена)

Данные количественного флуориметрического анализа экспрессии гена *uidA* у исходных трансформантов и потомков первого поколения от самоопыления представлены в виде диаграммы на рис. 3. Уровень экспрессии репортерного гена варьировал среди исходных независимо полученных трансформантов в обеих группах растений с одной и двумя копиями гена *uidA*. Отмечался достоверно более высокий уровень активности анализируемого фермента у растений, у которых ген *uidA* был представлен в виде двух копий. Только у одного растения из данной группы (16.40) наблюдалось значительное снижение количества фермента β -глюкуронидазы у потомков T_1 , которое согласно точковому Нозерн-блоттингу (рис. 4) коррелировало с уменьшением количества мРНК, транскрибируемой с гена *uidA* и указывало на процесс инактивации экспрессии репортерного гена.

В литературе описаны как факты инактивации (Wang, Waterhouse, 2000; Ma, Mitra, 2002), так и стабильной экспрессии генов, представленных в виде tandemных повторов (Conceizro *et al.*, 1994; Lechtenberg *et al.*, 2002). Известно, что даже встраивание гена *uidA* в один и тот же район хромосомы с помощью системы *Cre/lox* рекомбинации может вести к вариативности экспрессии между исходными трансформантами (Day *et al.*, 2000). В нашей работе получены как данные о стабильной экспрессии репортерного гена, представленного в виде дубликации, у независимо полученных исходных трансформантов и их потомства T_1 , так и возможность снижения уровня экспрессии фермента β -глюкуронидазы уже в первом поколении от самоопыления.

2.3. Анализ стабильности экспрессии гена *nptII* у гибридов F_1 от различных типов скрещиваний трансгенных растений табака

Необходимо отметить, что инактивирование трансгенов наблюдается не только при наличии tandemных повторов в структуре чужеродной инсерции, но и при различных типах скрещиваний трансгенных растений (Mittelsten Scheid *et al.*, 1991; Cherdshewasart *et al.*, 1993; Van Houdt *et al.*, 2000). В связи с этим, представляло интерес смоделировать нестабильный уровень экспрессии маркерного гена *nptII* посредством скрещиваний трансформантов с дубликацией в области Т-ДНК.

Стабильность экспрессии гена *nptII* у гибридов от анализируемого скрещивания исходных трансформантов с нетрансгенными растениями табака. При гибридизации контрольных растений с нетрансгенным табаком во всех 12 проанализированных скрещиваниях (прямых и обратных) отмечалось расщепление $1Km^r:1Km^s$, что подтверждало наличие одной встройки Т-ДНК в ядерном геноме исходных трансформантов и свидетельствовало о стабильности экспрессии гена *nptII*. В анализируемом скрещивании исходных трансформантов с двумя копиями гена *uidA* в области чужеродной инсерции с нетрансгенными растениями табака отклонения от ожидаемого расщепления в сторону инактивации экспрессии маркерного гена наблюдалось в 28,6 % (из 14 прямых и обратных скрещиваний). Таким образом, в опытной группе растений, у которых ген *nptII* находится в соседстве с дубликацией гена *uidA*, среди потомков F_1 от скрещивания с диким типом происходило нарушение экспрессии гена *nptII*.

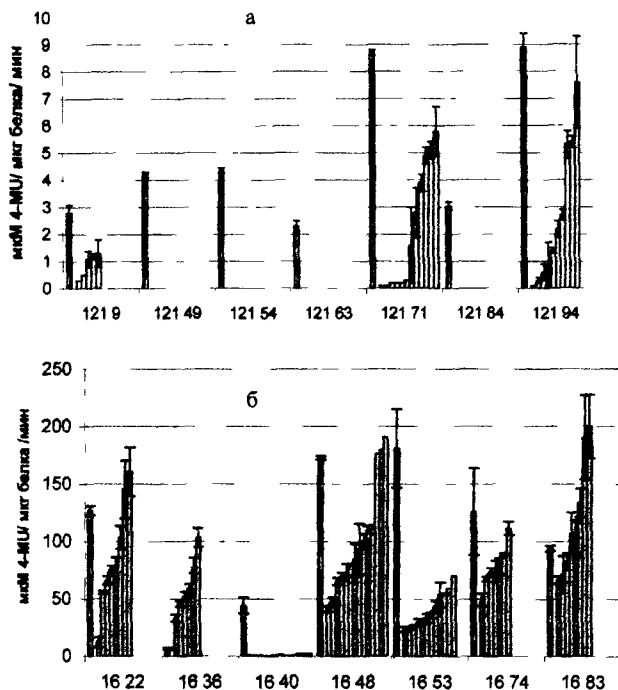


Рис. 3. Активность β -глюкуронидазы у трансгенных растений табака (T_0 и T_1):

а) с одной копией гена (контроль);

б) с двумя копиями гена в составе Т-ДНК инсерции

Обозначения:



T_0 – исходные трансгенные растения;

T_1 – первое поколение от самоопыления T_0 -растений.

	контроль	растения T_1 16.40			
	отриц. полож	1	2	3	4
0,5 мкг мРНК					
0,1 мкг мРНК					
0,05 мкг мРНК					

Рис. 4. Точечный Нозерн-блоттинг тотальной мРНК трансгенных растений T_1 с *uidA*-зондом.

Стабильность экспрессии гена *nrpII* у гибридов при скрещивании исходных трансформантов между собой. Обобщенные данные (в %) расщеплений в F_1 , полученных от скрещиваний трансгенных растений T_0 с одной (растения №121) и двумя копиями (растения №16) гена *uidA* в структуре Т-ДНК, представлены в табл. 2.

Таблица 2. Расщепление по устойчивости к канамицину в F_1 при скрещивании между собой исходных трансформантов табака

Расщепления в F_1		Тип скрещиваний		
		121 × 121	16 × 16	16 × 121
Отклонения от менделевского расщепления	Расщепление по дигибриднему типу	4,0%	—	0,3%
	Инактивация экспрессии гена <i>nrpII</i>	1,6 %	35,7 % $\chi^2 = 48,306^*$	10,3 % $\chi^2 = 9,439^*$
Согласно Менделю		94,4 %	64,3 %	89,4 %
Общее количество скрещиваний		126	126	291
Появление мозаичных растений		7,9 %	51,6 % $\chi^2 = 57,420^*$	25,1 % $\chi^2 = 16,220^*$

* Достоверное отличие по сравнению с контролем, $\chi^2_{0,05} = 3,841$ (d.f. = 1), нулевая гипотеза – достоверных отличий между группами нет

У гибридов контрольной группы маркерный ген наследовался, как правило, стабильно. Из 126 прямых и обратных комбинаций скрещиваний только в семи случаях наблюдались отклонения от менделевского расщепления, что составило 5,5 % от общего числа проанализированных вариантов и в 7,9 % появлялись мозаичные растения. Анализ гибридов F_1 от скрещивания трансгенных растений табака с тандемным повтором гена *uidA* в прямой ориентации показал достоверное увеличение до 35,7 % доли растений с отклонениями от менделевского расщепления в сторону инактивации экспрессии маркерного гена. Также достоверно увеличилась частота появления в F_1 мозаичных потомков до 51,6 %. При скрещиваниях между собой контрольной группы растений и растений с прямой дупликацией гена *uidA* в 10,3 % случаев отмечены отклонения от ожидаемого расщепления и в 25,1 % случаев появляются растения-мозаики.

Таким образом, сравнительный анализ расщеплений в F_1 , полученных от различных типов скрещиваний трансформантов показывает, что наличие дупликации гена *uidA* в составе Т-ДНК оказывало существенное влияние на стабильность экспрессии рядом расположенного маркерного гена *nrpII*.

Стабильность экспрессии гена *nrpII* у гибридов при различных типах скрещиваний растений первого поколения. Среди исследуемых растений наибольший интерес для дальнейшего гибридологического анализа стабильности экспрессии маркерного гена *nrpII* представляло растение 16.40, потомки T_1 которого характеризовались низким уровнем экспрессии гена *uidA* (рис. 3). В табл. 3 приведены обобщенные результаты при различных типах скрещиваний растений первого поколения. При скрещиваниях трансгенных растений с генотипом **A*abbcc** (16.40) с растениями **aaBbcc** (16.53) и **aabbCc** (121.94) в F_1 вместо теоретически ожидаемого расщепления $3K_m^+1K_m^-$, в около 60 % скрещиваний наблюдались отклонения от расщепления в сторону инактивации гена *nrpII* ($2K_m^+1K_m^-$

или 1Km⁺:1Km⁻) и появление мозаичных потомков (45,5 % и 38,8 % соответственно). Скрещивание же растений T₁ **aaBbcc** (16.53) с высоким уровнем экспрессии гена *uidA* с контрольными растениями T₁ **aabbCc** (121.94) вызывало лишь небольшой процент нарушений (2,2 %). Это позволило сделать вывод, что скрещивания с растениями T₁ 16.40, характеризующимися низким уровнем экспрессии β-глюкуронидазы, приводило к резкому нарушению экспрессии гена *nptII* у гибридов. При данных типах скрещиваний у потомков F₁ возникают три варианта генотипов по трансгенным локусам (гибриды гемизиготные по двум инсерциям T-ДНК и гемизиготы по одной из родительских инсерций). Для того чтобы выявить, с каким генотипом происходит инактивация маркерного гена, были проведены дополнительные скрещивания.

При скрещиваниях растений **A*A*bbcc** (16.40; гомозиготы), с растениями **aaBbcc** (16.53; гемизиготы), в F₁ частота отклонений от ожидаемого расщепления составила 75,0 %. Нестабильность экспрессии гена *nptII* у гибридов характеризовалась появлением Km-неустойчивых потомков и мозаиков (табл. 3). В обратной комбинации, где скрещивали растения **A*abbcc** (16.40; гемизиготы) с **aaBbcc** (16.53; гомозиготы), в гибридном потомстве частота отклонений была достоверно меньше – 5,9 % (по формуле Фишера $p = 0,001$, при $p_{ст.0.05} = 0,01$ (d.f. = 1)). При данных скрещиваниях получаются только два генотипа, один из которых является одинаковым в обоих направлениях скрещиваний и включает по одной инсерции от каждого родителя **A*aBbcc**, в то время как генотипы гемизиготных потомков отличаются. В первом скрещивании получается гемизигота с инактивированным геном *uidA* **A*abbcc**, а во втором – с нормально экспрессирующимся **aaBbcc**. Следовательно, это сравнение позволяет предположить, что в первом скрещивании именно у ряда растений F₁, гемизиготных по инактивированному трансгену происходил процесс инактивации экспрессии маркерного гена *nptII*. Такую же картину мы наблюдали при скрещивании T₁ 16.40 с контрольными растениями T₁ 121.94 (табл. 3). В зависимости от направления скрещивания наблюдалась инактивация экспрессии гена *nptII* у части гибридных растений F₁. Данное явление не наблюдалось, если в качестве контроля по такой же схеме скрещивали растения T₁ 16.53 и T₁ 121.94. Во всех проанализированных комбинациях наследование маркерного гена *nptII* было стабильное (табл. 3).

Таким образом, выполненный гибридологический анализ позволяет сделать вывод, что инактивированное состояние по гену *uidA* влияет на стабильность экспрессии рядом расположенного гена *nptII* преимущественно в гемизиготе. В гибридах, где происходит комбинация с другим трансгеном, нормально экспрессирующим ген *uidA* явление инактивации экспрессии гена *nptII* не наблюдалось или регистрировалось лишь в небольшом проценте случаев. Следовательно, можно предположить, что активная копия гена *uidA*, при объединении в геноме гибридов с другой неаллельной инактивированной дупликацией гена *uidA*, вызывает процесс транс-активации экспрессии репортерного гена, что в свою очередь способствует стабильной экспрессии рядом расположенного маркерного гена *nptII*. В гемизиготном же состоянии инактивированный ген *uidA* оказывает супрессирующее действие на экспрессию гена *nptII*.

Известно, что вероятность инактивации экспрессии перенесенных генов может значительно увеличиваться (до 100 %) при транс-инактивации, когда в растительном геноме объединяют посредством двойной трансформации или скрещиваний чужеродную инсерцию с активным геном с инактивированным гомологичным ге-

Таблица 3. Схема скрещиваний трансгенных растений 16.40, 16.53, 121.94 (T₁) геми- и гомозиготных по T-ДНК инсерции

Р ♀/♂	aaBbcc	aabbCc	aaBBcc	aabbCC
A*abbcc	61,4 % отклонений, 45,5 % появление мозаиков F₁: A*aBbcc A*abbcc aaBbcc aabbcc (44 скрещивания)	61,2 % отклонений, 38,8 % появление мозаиков F₁: A*aabbCc A*abbcc aabbCc aabbcc (49 скрещиваний)	5,9 % отклонений F₁: A*aBbcc aaBbcc (17 скрещиваний)	2,5 % отклонений F₁: A*aabbCc aabbCc (40 скрещиваний)
aaBbcc		2,2% отклонений F₁: aaBbCc aaBbcc aabbCc aa bbcc (46 скрещиваний)		нет нарушений (32 скрещивания)
A*A*bbcc	75 % отклонений, 75 % появление мозаиков F₁: A*aBbcc A*abbcc (8 скрещиваний)	33,3 % отклонений, 33,3 % появление мозаиков F₁: A*aabbCc A*abbcc (9 скрещиваний)		
aaBBcc		нет нарушений (14 скрещиваний)		

Примечание. Инсерция T-ДНК в растениях T₁ 16.40 – **A*aabbcc**, 16.53 – **aaBbcc**, 121.94 **aabbCc**. Скрещивания проводились по циклической схеме в 1–2 повторностях, % отклонений от теоретически ожидаемого расщепления подсчитан от общего числа проанализированных расщеплений, указанных в скобках.

ном (Matzke *et al.*, 19946; 2000). Однако, в нашем исследовании выполненный гибридологический анализ показал, что скрещивания растений T₁ с инактивированным дуплицированным геном *uidA* с растениями T₁, включающими одну или две активные копии гена *uidA*, может способствовать восстановлению экспрессии гена *nptII* в гибридах, в отличие от нарушений стабильной экспрессии данного маркерного гена в растениях гемизиготных по инактивированному гену *uidA*.

Итак, наблюдаемый высокий процент потомков с нестабильным уровнем экспрессии гена *nptII* у трансформантов с инвертированным тандемным повтором в структуре T-ДНК в первом поколении от самоопыления, а также у растений с прямым тандем-

ным повтором во втором поколении и у гибридов от различных типов скрещиваний наводит на мысль, что наличие дупликаций в составе Т-ДНК оказывает определенное влияние на реализацию механизмов инактивирования чужеродных генов. Гибридологический анализ потомков от различных типов скрещиваний растений T_1 позволил выявить, что в гибридах гемизиготных по инактивированной дупликации гена *uidA* происходило нарушение экспрессии рядом расположенного другого маркерного гена *nptII*.

3. Мозаичный характер проявления экспрессии гена *nptII* в трансгенных растениях табака модельной линии Nu 21

Трансгенное растение табака Nu 21 представляет собой уникальную модель для изучения мозаичного характера экспрессии маркерного гена *nptII* на уровне соматических тканей. Данное растение привлекло к себе внимание необычным фенотипом потомков первого поколения, выращенных на среде с канамицином. 4–6-недельные растения имели ярко выраженную пятнистую окраску листьев. Чередование белых и зеленых секторов. Частота появления мозаично окрашенных растений в T_1 составила порядка 100 %. Возникновение таких белых пятен на листьях связано с тем, что в них отсутствует экспрессия перенесенного маркерного гена *nptII*. На представленной автордиограмме видно, что в зеленой части листа активность фермента NPTII *in situ* была высокая, а в белой – минимальная (рис. 5)

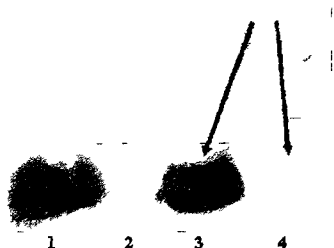


Рис. 5. Автордиограмма активности фермента NPTII *in situ* в листовых пластинках трансгенных растений табака:

1 – трансгенное растение табака (положительный контроль), 2 – нетрансгенные растения табака (отрицательный контроль), 3 – зеленая часть листьев мозаичных потомков T_1 , 4 – белая часть листьев мозаичных потомков T_1

Фенотип мозаичной экспрессии гена *nptII* наследовался при самоопылении исходного трансформанта в первом, втором, третьем и четвертом поколениях и при скрещиваниях с нетрансгенными растениями табака растений T_1 и T_2 . Частота появления мозаичных потомков в поколениях от самоопыления и в гибридах F_1 варьировала в широких пределах, как среди индивидуальных растений, так и между разными семенными коробочками у одного и того же растения. По сравнению со 100 % проявления признака мозаицизма в T_1 ; в T_2 и T_3 и в гибридах от скрещивания с диким типом с различной частотой выявлялись зеленые растения. По данному признаку можно было выделить три группы: растения с низкой частотой проявления мозаицизма (0–21,8 %); растения с высокой частотой появления мозаичных потомков (63,1–100 %) и растения с промежуточным типом, частота появления растений мозаиков варьировала в широких пределах от 0 до 100 %. Важно отметить, что даже если в T_2 для дальнейшего анализа были отобраны зеленые растения, то в T_3 и F_1 они

опять давали высокий процент появления потомков с мозаичной экспрессией гена *nptII* на уровне саматических тканей.

Саузерн блот-гибридизация геномной ДНК 9 растений первого и 11 второго поколений показала наличие двух фрагментов длиной порядка 4 и 5 т.п.н., что указывает на присутствие не менее двух инсерций Т-ДНК в растительном геноме (рис. 6). Следовательно, если предположить, что исходное растение содержит две вставки Т-ДНК в разных сайтах генома, то в последующих поколениях должна происходить их сегрегация и должны выплываться растения с одной инсерцией трансгена, ожидаемое расщепление в этом случае должно быть $15\text{Kм}^2:1\text{Kм}^2$, т.е. соответствовать дигибриднему. Однако данного типа расщепления никогда не регистрировалось. Следовательно, можно предположить, что если инсерции расположены в разных сайтах, то функционально активной является только одна вставка, либо две инсерции расположены близко к друг другу и наследуются в одной группе сцепления.

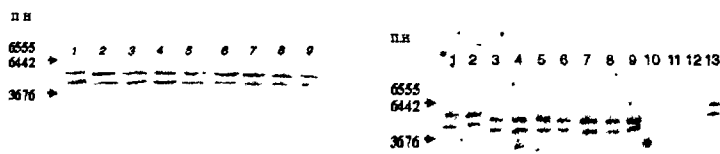


Рис. 6. Саузерн блот-гибридизация геномной ДНК из трансгенных растений табака первого (слева) и второго (справа) поколений от самоопыления трансформанта Nu 21 с ^{32}P -меченным фрагментом гена *nptII*. Геномная ДНК порезана ферментом *EcoRI*. п.н. – пар нуклеотидов.

Введение мозаичных растений табака в культуру *in vitro* приводило к восстановлению экспрессии маркерного гена. При этом при самоопылении зеленых растений-регенерантов у потомков снова происходило восстановление мозаичного характера проявления экспрессии гена *nptII*. Таким образом, несмотря на восстановление экспрессии гена в культуре *in vitro*, при проведении растения через половой цикл наблюдалась реверсия к исходному состоянию, то есть к восстановлению нестабильного характера экспрессии гена *nptII*. Это указывает на существование двух метастабильных состояний трансгена: активного и неактивного. Известно, что одним из механизмов, обеспечивающим изменения в активности генов, является метилирование нуклеотидной последовательности ДНК. При добавлении в культуральную среду 5-азациитидина (100 $\mu\text{M}/\text{мл}$), являющимся ингибитором метилирования ДНК, наблюдалась реактивация экспрессии маркерного гена (табл. 4). Добавление 5-азациитидина приводило к достоверному увеличению числа Км-устойчивых потомков в 4,5–16 раз. Явление реактивации экспрессии гена *nptII* также регистрировалось у растений T_2 Nu 21/6 после тепловой обработки 4–6-дневных проростков (один раз в день при 38°C 3 часа 3-кратно).

Таким образом, модельная линия Nu 21 характеризуется мозаичным характером экспрессии маркерного гена *nptII*, который проявляется на определенной стадии развития растений и наследуется в поколениях от самоопыления, и у гибридов от скрещиваний с диким типом. Особенности в организации структуры инсерции Т-

ДНК и местоположения в растительном геноме, по-видимому, вызвали проявление мозаицизма по экспрессии гена *nptII* у растений модельной линии Nu 21. Существование двух метастабильных состояния трансгена на уровне соматических тканей: активного и неактивного, вероятно, было связано с модификацией ДНК – метилированием цитозина в последовательности гена *nptII*.

Таблица 4. Расщепление по устойчивости к канамицину во втором поколении от самоопыления растения Nu 21/6 при выращивании на среде с 5-азацитидином

Номер коробочки	Км	Кп	Расщепление		χ^2	% мозаиков
			фактическое	теоретическое		
1						
контроль	63 *	109	0,6 : 1	1 : 1	12,302	100
5-азацитидин	61 *	99	0,6 : 1	1 : 1	9,025	100
Различия не достоверны, $\chi^2 = 0,559$						
2						
контроль	47 *	209	0,2 : 1	—	—	100
5-азацитидин	110 *	278	0,4 : 1	—	—	100
Различия достоверны, $\chi^2 = 13,525^*$						
3						
контроль	28 *	576	0,05 : 1	—	—	100
5-азацитидин	162 *	212	0,8 : 1	1 : 1	6,684	100
Различия достоверны, $\chi^2 = 220,730^*$						
4						
контроль	15 *	316	0,05 : 1	—	—	100
5-азацитидин	105 *	156	0,7 : 1	1 : 1	9,966	100
Различия достоверны, $\chi^2 = 115,067^*$						

* нулевая гипотеза – различий нет, $\chi^2_{st, 0,05} = 3,841$ (d.f = 1), м – мозаичные растения; процент растений мозаиков подсчитан от общего числа Км⁺ растений

Выводы

1. Чужеродные гены в новом генетическом окружении стабильно наследовались в поколениях T₁ и T₂, получаемых при самоопылении исходных трансформантов как с одной, так и множественными инсерциями Т-ДНК. Нестабильность экспрессии маркерного гена выявлялась у гибридов от скрещиваний трансформантов между собой. Показано, что у трансформантов со множественными инсерциями отклонения от ожидаемых расщеплений выявлялись уже среди гибридов F₁, тогда как у моноинсерционных трансгенных растений нестабильность в проявлении гена *nptII* обнаруживалась только среди потомков F₂. Трансформанты с одной инсерцией трансгена предпочтительны для дальнейшей селекционной доработки исходного материала.
2. Установлено, что присутствие дупликации (гена *uidA*) в составе Т-ДНК инсерции значительно снижало стабильность экспрессии рядом расположенного маркерного гена (*nptII*). Наличие дупликации в инвертированном виде вызывало резкое снижение стабильности экспрессии гена *nptII* (до 20%) в потомст-

ве первого поколения от самоопыления исходных трансформантов, в то время как в случае прямой дупликации нарушения стабильности экспрессии маркерного гена отмечались у потомков лишь во втором поколении от самоопыления трансгенных растений.

- 3 Наличие прямой дупликации гена *uidA* в области Т-ДНК существенно снижало стабильность экспрессии близлежащего гена *nptII* у гибридов от различных типов скрещиваний исходных трансформантов (с нетрансгенными растениями табака, между исходными трансформантами).
4. На основании гибридологического анализа впервые установлено, что нарушение экспрессии гена *nptII* происходило у гибридов, гемизиготных по инактивированной прямой дупликации гена *uidA*.
5. Установлено, что нестабильный уровень экспрессии перенесенных генов может проявляться в виде мозаичной экспрессии на уровне соматических тканей. Выделена модельная линия Nu 21 с мозаичным характером проявления экспрессии маркерного гена *nptII*. Показано наследование данного фенотипа (в Т₁-Т₄ и у гибридов F₁ от анализирующего скрещивания). Существование двух метастабильных состояния трансгена на уровне соматических тканей: активного и неактивного, вероятно, было связано с модификацией ДНК – метилированием цитозина в последовательности гена *nptII*.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Deineko E., Zagorskaya A., Filipenko E., Filipenko M., Novoselya T., Kochetov A., Komarova M., Shumnyi V. Instability of *nptII* gene expression in the progeny of transgenic tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L. and *N. plumbaginifolia* L.) // Biotechnology and biotechnological equipment. 1996. N 4. P. 89–92.

Дейнеко Е.В., Новоселя Т.В., Загорская А.А., Филипенко Е.А., Шумный В.К. Стабильность экспрессии гена *nptII* в популяции трансгенных растений табака // ДАН. 1999. Т. 369. С. 420–423.

Новоселя Т.В., Дейнеко Е.В., Шумный В.К. Стабильность экспрессии гена *nptII* у трансгенных растений табака (*Nicotiana tabacum* L.) с множественными инсерциями Т-ДНК // Генетика. 2000. Т. 36, № 3. С. 427–430.

Дейнеко Е.В., Новоселя Т.В., Загорская А.А., Филипенко Е.А., Шумный В.К. Нестабильность экспрессии чужеродных генов у трансгенных растений табака // Физиология растений. 2000. Т. 47, № 3. С. 394–399.

Дейнеко Е.В., Новоселя Т.В., Загорская А.А., Филипенко Е.А., Пухначева Н.В., Шумный В.К. Инактивирование чужеродных генов в геноме трансгенных растений // Изучение генома и генетическая трансформация растений. Новосибирск: Наука, 2001. С. 132–142.

Novoselya T.V., Deineko E.V., Filipenko E.A., Shumnyi V.K. Expression stability of marker gene *nptII* in transgenic plants *Nicotiana tabacum* L. with single T-DNA insertion // Biotechnology and biotechnological equipment. 2001. V. 15, N 2. P. 3–7.

Новоселя Т.В., Дейнеко Е.В. Моделирование нестабильной экспрессии гена *nptII* у трансгенных растений табака // Физиология растений. 2002. Т. 49, № 3. С. 437–443.

Подписано к печати 11.04.2005

Формат бумаги 60 × 90 1/16. Печ. л. 1. Уч. изд. л. 0,7

Тираж 100 экз. Заказ 56

Ротапринт Института цитологии и генетики СО РАН
630090, Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 10.

№ - 6507

РНБ Русский фонд

2006-4

4201