



СОЗДАНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА КРЫЛАТОГО *NICOTIANA ALATA* С КОНСТИТУТИВНОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ ГЕНА *ARGOS-LIKE* И ИХ МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Кулуев Б.Р., Князев А.В., Бережнева З.А., Чемерис А.В.

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук, kuluev@bk.ru

Резюме

Табак крылатый *Nicotiana alata* является декоративным растением с красивыми, но не крупными цветками. Поэтому для увеличения декоративной привлекательности этого вида растения актуально увеличение размеров его цветков. С этой целью нами были проведены работы по агробактериальной трансформации листовых дисков *N. alata* генно-инженерной конструкцией, содержащей ген *ARGOS-LIKE Arabidopsis thaliana* и промотор вируса мозаики георгина. Нами были созданы две линии трансгенных растений табака крылатого. Одна из линий трансгенных растений отличалась увеличением длины листьев на 21% и высоты стебля на 10% по сравнению с диким типом. Другая линия трансгенных растений характеризовалась увеличением размеров цветков: диаметра цветка на 13% и длины цветка на 8%, по сравнению с диким типом. Таким образом, в ходе проведенной работы нами показана возможность создания трансгенных растений *N. alata* путем агробактериальной трансформации листовых дисков. Конструкция гена *ARGOS-LIKE* с промотором вируса мозаики георгина может быть рекомендована для модификации размеров цветка у табака крылатого.

Ключевые слова: *Nicotiana alata*, табак крылатый, ARGOS, промотор вируса мозаики георгина, размеры органов, цветков, трансгенные растения

Введение

Табак крылатый *Nicotiana alata* Link & Otto относится к роду табак (*Nicotiana*) семейству пасленовых (*Solanaceae*) и культивируется по всему миру как декоративное растение. *N. alata* по сравнению с *Nicotiana tabacum* имеет более крупные и красивые цветки (рис. 1), которые полностью раскрываются только вечером, причем растение цветет всю ночь. В природе табак крылатый встречается в Южной и Центральной Америке. Растение многолетнее

травянистое, выращиваемое в умеренном климате как однолетнее, так как морозоустойчивость у *N. alata* очень низкая. Стебли прямостоячие, ветвистые, 60-70 см высотой. Листья небольшие, ланцетовидные или удлинённые. Все растение клейкое, покрыто железистыми волосками. Цветки белые, фиолетовые, пурпурные, трубчатые, около 7,5 см длиной, отгиб до 5 см в диаметре, собраны в крупное, рыхлое, метельчатое соцветие (рис. 1). В культуре с 1867 года [http://flower.onego.ru/annual/nicoti_d.html].



Рис. 1. Внешний вид табака крылатого.

Фото с опытного участка Института биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН.

Так как табак крылатый является декоративным растением, представляет большой интерес модификация размеров цветка этого растения. Одним из способов увеличения размеров цветка является трансформация растений генно-инженерными конструкциями, содержащими гены семейства ARGOS [Кулуев и др., 2011a]. Эта группа генов кодирует белки, являющиеся негативными регуляторами этиленового сигналинга и располагающиеся на эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи [Rai et al., 2015; Shi et al., 2016]. У резуховидки Таля *Arabidopsis thaliana* обнаружено и изучено четыре гена, кодирующие белки данной группы, а именно ARGOS, ARGOS-LIKE (ARL), OSR1 и OSR2 [Hu et al., 2003; 2006; Feng et al., 2011; Qin et al., 2014]. Первые исследования этой группы генов выявили вовлеченность кодируемых ими белков в регуляцию размеров органов растений. Сверхэкспрессия гомологов гена ARGOS способствовала существенному увеличению размеров органов трансгенных растений, как в гомологичных, так и в гетерологичных условиях [Hu et al., 2003; 2006; Кулуев и др., 2011b; 2013; 2014; 2016; Михайлова, Кулуев, 2015]. По всей видимости, кодируемые этими генами белки вовлечены в регуляцию роста растений как через влияние на клеточное деление, так и на клеточное растяжение.

Нами ранее были созданы трансгенные растения табака с конститутивной экспрессией генов ARGOS и ARL A. *thaliana* [Кулуев и др., 2011b; 2013]. Трансгенные растения характеризовались увеличением размеров стебля, листьев и цветков. Исходя из этих данных, можно предполагать, что конститутивная экспрессия генов семейства ARGOS может способствовать увеличению размеров органов и у других видов рода *Nicotiana*. Целью данной работы было создание трансгенных растений *N. alata* с конститутивной экспрессией гена ARL и их морфологический анализ.

Материалы и методы

Для трансформации *N. alata* использовали бактерии *Agrobacterium tumefaciens* штамма AGL0 содержащие генно-инженерную конструкцию гена ARL под контролем промотора вируса мозаики георгина в бинарном векторе pCambia 1301 [Кулуев и др., 2012; Михайлова, Кулуев, 2015]. Трансгенные растения *N. alata* получали методом агробактериальной трансформации листовых дисков, высеченных из листьев трехмесячных растений [Horsch et al., 1985]. Первичные трансгенные T₀-побеги отбирали на селективной среде (соли среды МС с добавлением 1 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП), 0,1 мг/л нафтилуксусной кислоты (НУК)),

содержащей 25 мг/л гигромицина. Качественную оценку активности репортерного гена GUS в листьях T₀-побегов определяли гистохимически, используя субстрат X-Gluc. Все полученные T₀ GUS+ побеги каждого варианта укореняли в присутствии 25 мг/л гигромицина, затем переносили в почвенную смесь, доводили до цветения, самоопыляли и получали семена (T₁ потомство).

Для контроля наследования трансгенов и определения количества вставок, часть T₁ семян каждой полученной линии поверхностно стерилизовали последовательным погружением в 70% спирт, 5% раствор гипохлорита натрия, промывали в стерильной дистиллированной воде и прорастивали на среде МС с добавлением гигромицина в климатической камере Binder (Германия). Через три недели производили подсчет устойчивых и неустойчивых к селективному агенту семян и определяли расщепление при наследовании гена селективного маркера. Результаты обрабатывали методом χ^2 по стандартной методике и выделяли для дальнейшей работы линии с одной интегрированной копией трансгенов. Тотальную ДНК из растений выделяли методом солевой экстракции [Aljanabi, Martinez, 1997]. Интеграцию целевого гена в растительные геномы определяли с помощью ПЦР анализа при использовании праймеров ARLPCRFR 5'-TCTACAAAACGACATCATAAACAT-3' и ARLPCRRL 5'-ACATAAAAAGTGGGAAGAAGAAGAAA-3'. Тотальную РНК из листьев выделяли используя тризол, строили кДНК при помощи олиго-dT праймера и MMuLV-обратной транскриптазы. Далее проводили качественную ОТ-ПЦР гена ARL при помощи тех же праймеров, использованных для ПЦР-анализа.

Растения трансгенных линий и контрольные растения (дикий тип) культивировали вначале в вегетационных сосудах объемом 450 мл (рис. 3а), заполненных универсальным грунтом ("Terra vita", Россия) в лабораторных условиях при температуре 28°C с освещенностью около 140 мкмоль на кв. м в сек и фотопериодом 16/8 часов (свет/темнота). Через полтора месяца молодые растения *N. alata* переносили из вегетационных сосудов на грунт в теплицу, где выращивали анализируемые растения до стадии плодоношения. В качестве контрольных использовали нетрансгенные растения *N. alata*, которые обозначали как дикий тип. Морфологический анализ растений проводили в период массового цветения растений который заключался в измерении высоты стебля, длины и ширины листьев, длины и диаметра цветка. По каждой линии трансгенных растений было отобрано по 10

растений (n=10), у которых измеряли по три крупных нижних листа в длину (первый, второй и третий листья, не считая листья розетки), начиная от начала листовой пластины, по центральной жилке до самого кончика. Также определяли ширину этих листьев в самой широкой части. Затем вычисляли средние значения длины и ширины листа для каждой линии. В каждом анализируемом растении определяли длину и диаметр пяти цветков. Длину цветка измеряли начиная от цветоножки и заканчивая краем желобка венчика (граница между сросшимися лепестками), и вычисляли среднее значение. Диаметр цветка определяли путем измерения расстояния от острого конца одного лепестка до острого конца второго лепестка, расположенного не по соседству, а через один лепесток.

Результаты исследований представляли в виде гистограмм со средними значениями выборки. Барями обозначали стандартную ошибку среднего (рис. 2). Достоверность различий во всех экспериментах оценивали при помощи *U*-критерия Манна-Уитни.

Результаты и их обсуждение

В результате агробактериальной трансформации листовых дисков *N. alata* было получено 14 регенерантов, из которых на селективной среде МС укоренились лишь 8 растений. После гистохимического GUS-анализа и ПЦР-анализа для дальнейшей акклиматизации были

отобраны 4 растения. Эти растения были доведены до стадии плодоношения и у них были получены семена. Анализ устойчивости семян к гигромицину показал характерное расщепление 3:1 только у двух линий трансгенных растений *N. alata*, которые и были отобраны для дальнейшей работы по морфологическому анализу (линии 1 и 6). ОТ-ПЦР-анализ показал, что в обеих линиях содержится мРНК гена *ARL*, что свидетельствует о наличии экспрессии трансгена.

Морфологический анализ проведенный в период цветения показал, что по высоте стебля трансгенные растения *N. alata* линии 1 были больше растений дикого типа в среднем на 10% (рис. 2а). В то же время по данному параметру роста трансгенные растения линии 6 не отличались от контроля. Длина листьев также была наибольшей у линии 1, причем разница с диким типом составила в среднем 21% (рис. 2б; 3б). По ширине листьев между растениями дикого типа и трансгенными линиями достоверных различий не обнаруживалось. Если по размерам стебля и листьев дикий тип превосходила только линия 1, то по размерам цветка ситуация была обратная. По длине цветка дикий тип и линия 1 не отличались друг от друга, а по диаметру цветка отличия были весьма незначительными (рис. 2в, г). В то же время диаметр цветка у трансгенных растений линии 6 был больше, чем у контроля в среднем на 13%, а длина цветка на 8% (рис. 2в, г; 3в, г).

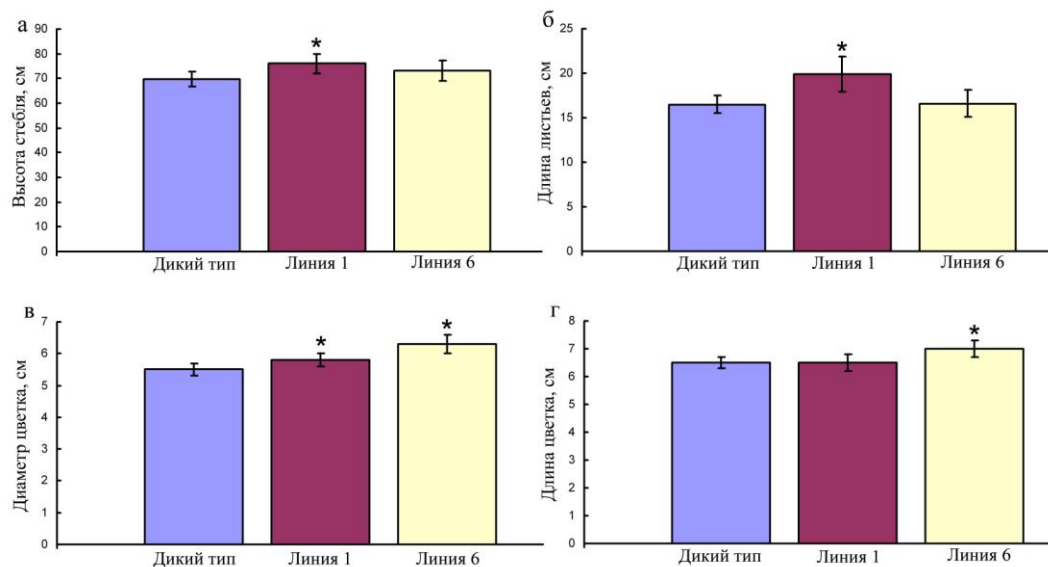


Рис. 2. Результаты морфометрического анализа трансгенных растений *N. alata*: а – высота стебля, см; б – длина листьев, см; в – диаметр цветка, см; г – длина цветка, см. n = 10. * - p<0.01.

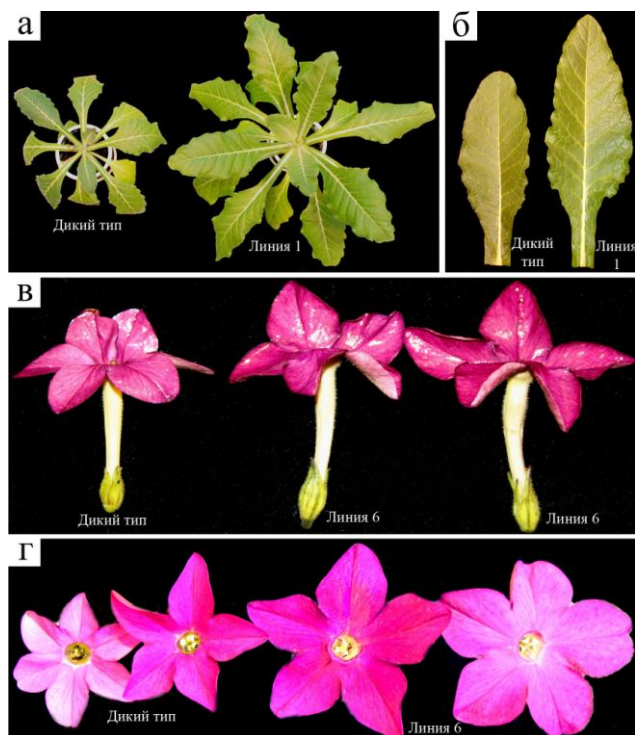


Рис. 3. Особенности фенотипа трансгенных растений *N. alata*, сверхэкспрессирующих ген *ARL*:
 а – сравнение трансгенных и нетрансгенных растений в период предварительного проращивания в вегетационных сосудах до высадки на грунт;
 б – сравнение листьев трансгенных и нетрансгенных растений в период цветения;
 в – цветки анализируемых растений сбоку;
 г – цветки анализируемых растений сверху.

Итак, нами были созданы две линии трансгенных растений *N. alata* экспрессирующие ген *ARL A. thaliana*. Трансгенные растения линии 1 отличались от контрольных растений увеличением размеров вегетативных органов, а именно листьев и стебля. В то же время линия 6 характеризовалась увеличением размеров цветков. Ранее нами были созданы и проанализированы трансгенные растения *N. tabacum* с конститутивной экспрессией гена *ARL A. thaliana* [Кулуев и др., 2013]. Некоторые линии трансгенных растений *N. tabacum* характеризовались увеличением высоты стебля до 10-25% (в зависимости от линии), по сравнению с контролем. На трансгенных растениях *N. alata* были получены сходные данные, и одна из линий показала увеличение высоты стебля на 10%. Часть линий трансгенных растений *N. tabacum* с конститутивной экспрессией гена *ARL* характеризовалась также увеличением длины листьев, причем в некоторых случаях разница достигала 23%. На примере *N. alata* нам также удалось продемонстрировать схожий

эффект, так у линии 1 длина листьев в среднем была больше на 21% по сравнению с диким типом. Интересно отметить, что цветки у трансгенных растений *N. tabacum* не отличались по размеру от растений табака дикого типа [Кулуев и др., 2013]. В то же время у трансгенных растений *N. alata* линии 6 размеры цветков были достоверно больше, чем у дикого типа. На примере *N. tabacum* мы ранее также демонстрировали возможность увеличения размеров цветков, однако для этих целей тогда был использован другой ген семейства ARGOS [Кулуев и др., 2011б].

Таким образом, в ходе проведенного исследования нами было показано, что для агробактериальной трансформации *N. alata* может быть применен стандартный метод, который используется при работе с *N. tabacum*. Ранее уже проводились работы по агробактериальной трансформации листовых дисков табака крылатого [Schroeder et al., 2001], однако авторы данной работы для регенерации растений в питательную среду добавляли только 6-БАП. Мы же для трансформации *N. alata* использовали среду МС с добавлением как 6-БАП, так и НУК, как и при трансформации *N. tabacum* [Кулуев и др., 2011б]. При этом частота трансформации и эффективность регенерации у *N. alata* были гораздо ниже, чем у *N. tabacum*. Именно поэтому нам удалось получить только две линии трансгенных растений табака крылатого. Schroeder et al. [2001] в ходе своей работы также получили всего лишь 5 линий трансгенных растений. Поэтому при работе с *N. alata* целесообразно увеличивать количество листовых эксплантов с целью увеличения числа генерируемых линий трансгенных растений.

В результате проведенной нами работы было показано, что генно-инженерная конструкция гена *ARL* с промотором вируса мозаики георгина может быть использована для модификации размеров органов у *N. alata*. Трансгенные растения табака крылатого линии 6 могут быть рекомендованы как исходный материал при создании новых ГМ-сортов этого растения с крупными размерами цветков.

Литература

1. Кулуев Б.Р. Генетическая регуляция величины органов у растений // Биомика. 2011а. Т. 2. №1. С. 33–46.
2. Кулуев Б.Р., Князев А.В., Ильясова А.А., Чемерис А.В. Конститутивная экспрессия гена *ARGOS* в растениях табака под контролем промотора вируса мозаики георгина // Физиология растений. 2011б. Т. 58. №3. С. 443–452.
3. Кулуев Б.Р. Каулимовирусы и их полногеномные промоторы // Биомика. 2012. Т. 4. №1. С. 1–19.

4. Кулуев Б.Р., Князев А.В., Сафиуллина М.Г., Чемерис А.В. Влияние конститутивной экспрессии гена *ARGOS-LIKE* на размеры клеток и органов трансгенных растений табака // Генетика. 2013. Т.49. №5. С. 587–594.
5. Кулуев Б.Р., Князев А.В., Никонов Ю.М., Чемерис А.В. Эстрадиол-индуцибельная и цветоспецифичная экспрессия генов *ARGOS* и *ARGOS-LIKE* в трансгенных растениях табака // Генетика. 2014. Т. 50. №8. С. 918–929.
6. Кулуев Б.Р., Михайлова Е.В., Таипова Р.М., Чемерис А.В. Изменение фенотипа трансгенных растений амаранта *Amaranthus retroflexus* L. с конститутивной экспрессией гена *ARGOS-LIKE* // Генетика. 2016. Т. 52. №12. С. 1388–1397.
7. Михайлова Е.В., Кулуев Б.Р. Создание трансгенного рапса (*Brassica napus* L) с конститутивной экспрессией гена *ARGOS-LIKE Arabidopsis thaliana* методом погружения цветков // Биотехнология. 2015. №5. С. 49–58.
8. Aljanabi S.M., Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques // Nucleic Acids Res. 1997. V. 25. P. 4692–4693.
9. Feng G., Qin Z., Yan J., Zhang X., Hu Y.: *Arabidopsis ORGAN SIZE RELATED1* regulates organ growth and final organ size in orchestration with *ARGOS* and *ARL* // New Phytologist. 2011. V. 191. P. 635–646.
10. Horsch R., Fry J., Hoffmann N., Eichholtz D., Rogers S., Fraley R. A simple and general method for transferring genes into plants // Science. 1985. V. 227. P. 1229–1231.
11. Hu Y., Xie Q., Chua N. The *Arabidopsis* auxin-inducible gene *ARGOS* controls lateral organ size // Plant Cell. 2003. V. 15. P. 1951–1961.
12. Hu Y., Poh H., Chua N. The *Arabidopsis ARGOS-LIKE* gene regulates cell expansion during organ growth // The Plant Journal. 2006. V. 47. P. 1–9.
13. Qin, Z., Zhang, X., Zhang, X., Feng, G., Hu, Y. The *Arabidopsis* *ORGAN SIZE RELATED 2* is involved in regulation of cell expansion during organ growth // BMC Plant Biol. 2014. V. 14. 349.
14. Rai M.I., Wang X., Thibault D.M., Kim H.J., Bombyk M.M., Binder B.M., Shakeel S.N., Schaller G.E.. The *ARGOS* gene family functions in a negative feedback loop to desensitize plants to ethylene // BMC Plant Biol. 2015. V. 15. 157.
15. Schroeder K.R., Stimart, D.P., Nordheim, E.V. Response of *Nicotiana glauca* to insertion of an autoregulated senescence-inhibition gene // J Amer Hort Sci. 2001. V. 125. P. 523–530.
16. Shi J., Drummond B.J., Wang H., Archibald R.L., Habben J.E. Maize and *Arabidopsis ARGOS* proteins interact with ethylene receptor signaling complex, supporting a regulatory role for *ARGOS* in ethylene signal transduction // Plant Physiol. 2016. V. 171. P. 2783–2797.

GENERATION OF TRANSGENIC *NICOTIANA ALATA* PLANTS WITH CONSTITUTIVE EXPRESSION OF *ARGOS-LIKE* GENE AND THEIR MORPHOLOGICAL ANALYSIS

Kuluev B.R., Knyazev A.V., Berezhneva Z.A., Chemeris A.V.

Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Scientific Center of RAS, Ufa, kuluev@bk.ru

Resume

Jasmine tobacco *Nicotiana glauca* is an ornamental plant with beautiful, but not large flowers. Therefore, to increase the decorative appeal of this plant is actual increase the size of its flowers. To this end, we carried out *Agrobacterium*-mediated transformation of *N. glauca* leaf discs with a genetic engineering construction containing the *ARGOS-LIKE* gene of *Arabidopsis thaliana* and the dahlia mosaic virus promoter. We generated two lines of transgenic jasmine tobacco plants. One of the lines of transgenic plants was characterized by an increase in the length of the leaves by 21% and the stem height by 10% compared to the wild type. Another line of transgenic plants was characterized by an increase in the size of flowers: flower diameter by 13% and flower length by 8%, compared to wild type. Thus, in the course of the work we have shown the possibility of generating of transgenic *N. glauca* plants by *Agrobacterium*-mediated transformation of leaf discs. The *ARGOS-LIKE* gene with the dahlia mosaic virus promoter can be recommended for the modification of flower sizes for jasmine tobacco.

Keywords: *Nicotiana glauca*, jasmine tobacco, *ARGOS*, dahlia mosaic virus promoter, organ size, flower, transgenic plants