

УДК 581.1:577.214.625:578.853

ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ФРАГМЕНТЫ ГЕНОВ *ARGOS* И *NtEXPA4* В АНТИСМЫСЛОВОЙ ОРИЕНТАЦИИ

© 2014 г. Б. Р. Кулуев, А. В. Князев, Б. Н. Постригань, А. В. Чемерис

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук, Уфа 450054

e-mail: kuluev@bk.ru

Поступила в редакцию 05.06.2013 г.

Получены трансгенные растения табака, экспрессирующие фрагменты генов *ARGOS* и *NtEXPA4* в антисмысловой ориентации. Отмечено, что пять линий трансгенных растений из 11 исследованных характеризовались уменьшением размеров листьев и цветков, по сравнению с контролем, размеры стебля уменьшались лишь при использовании фрагмента гена *NtEXPA4*, причем размеры органов у опытных растений уменьшались за счет снижения уровней как клеточного деления, так и клеточно-го растяжения. Обнаружено, что две линии трансгенных растений табака, экспрессирующих участок гена *ARGOS* в антисмысловой ориентации, характеризовались снижением уровня экспрессии генов *NtEXPA1* и *NtEXPA4*.

DOI: 10.7868/S001667581401007X

Одно из перспективных направлений современного фитодизайна — выращивание крупных растений в миниатюре. Однако для выращивания таких растений обычно тратится много усилий и времени. Сократить время получения карликовых растений могут современные технологии генной инженерии растений. Согласно имеющимся в литературе данным при изменении уровня экспрессии некоторых генов в растениях наблюдается уменьшение размеров их органов [1, 2].

Размеры органов у растений контролируются в основном путем регуляции клеточного деления и клеточного растяжения. В регуляции клеточного деления в растениях участвуют такие гены, как *AINTEGUMENTA*, *ARGOS*, *CYCLIND3; 1*, *WUSCHEL*, *CLAVATA3* и многие другие [3]. Геном *ARGOS* *A. thaliana* кодируется трансмембранный белок, участвующий в трансдукции сигналов от фитогормонов к транскрипционным факторам [1]. Известно, что сигналы от белка *ARGOS* передаются на ген транскрипционного фактора *AINTEGUMENTA*, который в свою очередь контролирует клеточное деление в зачатках надземных органов [4]. Было показано, что повышение уровня экспрессии как гена *ARGOS*, так и гена *AINTEGUMENTA* способствует увеличению размеров всех надземных органов за счет более длительного поддержания меристематической компетентности клеток в зачатках органов. Это приводит к возрастанию числа клеток, приходящихся на один орган. Снижение же уровня экспрессии данных генов способствует уменьшению размеров надземных органов у *Arabidopsis thaliana* [1, 4].

В регуляции клеточного растяжения у растений участвуют экспансины, эндоглюконазы, ксиллоглюканэндоглюкозилосилазы, а также ряд трансмембранных белков и транскрипционных факторов [3]. Из литературных источников следует, что повышение уровня экспрессии, например, экспансинов может привести к увеличению размеров органов. Так, трансгенные по гену *AtEXPA10* растения *A. thaliana* характеризуются увеличением длины черешков и площади листовой пластинки [5]. В то же время трансгенные растения *A. thaliana*, экспрессирующие участок гена *AtEXPA10* в антисмысловой ориентации, характеризуются уменьшением размеров органов. Экспансины у растений кодируются мультигенным семейством генов. Например, у табака на данный момент идентифицированы шесть генов экспансинов [6], которые получили названия *NtEXPA* с порядковыми номерами от 1 до 6, и их нуклеотидные последовательности имеются в GenBank (AF049350–AF049355).

Исходя из вышеизложенного, можно предположить, что снижение уровня экспрессии генов *ARGOS* и экспансинов будет способствовать уменьшению размеров органов у трансгенных растений за счет уменьшения в первом случае числа клеток, а во втором — размеров клеток.

Одна из наиболее эффективных стратегий подавления экспрессии генов на посттранскрипционном уровне у растений — РНК-интерференция [7]. Для этого довольно часто клонируют короткий участок целевого гена в смысловой или антисмысловой ориентации по отношению к промотору и проводят трансформацию растений. Такие работы в основном ведутся на модельном

объекте *A. thaliana*. О функционировании описанных в литературе генно-инженерных конструкций в других растениях известно мало. В связи с тем что геномы многих растений не секвенированы и клонирование генов каждого растения занимает определенное время, представляет особый интерес создание универсальных генно-инженерных конструкций, которые будут функционировать во многих двудольных растениях. Апробация созданных в ходе работы генно-инженерных конструкций должна происходить не только на *A. thaliana*, но и на других модельных растительных объектах, например на табаке.

Цель работы – клонирование коротких консервативных участков генов *ARGOS* и экспансинов в антисмысловой ориентации и получение на основе этих генно-инженерных конструкций трансгенных растений табака.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальные клетки, штаммы, плазмиды, генно-инженерные манипуляции. В работе использованы бактерии *Escherichia coli* штамма XL1-Blue и *Agrobacterium tumefaciens* штамма AGL. При создании генно-инженерных конструкций использовали T-вектор pKRX и бинарный вектор pCambia 1301 с 35S-промотором, с геном устойчивости к гиромоцину и репортерным геном *GUS* (CAMBIA, Австралия). Участок гена *ARGOS* размером 171 пн был выделен из геномной ДНК *A. thaliana* с помощью праймеров ARGiF (CGGC-GAATTATTTTCAGTTT TAGAG) и ARGiR (GAGAA-GAAGGCATGAAGGCAAGAA). Для амплификации участка гена *NtEXPA4* размером 227 пн использовали праймеры EXPiF (AATACTGCAG-CTTTAAGCACAGC) и EXPiR (GCAATGTGTTG-GAAGACAGGCTG). Для поиска целевых клонов при лигировании в векторе pCambia 1301 использовали праймер 35SCambF (AGAGGACCTAACA-GAAGCTCG) в паре с праймером 1301R (TGCTC-TAGCATTCGCCATTC). Секвенирование проводили на автоматическом анализаторе нуклеиновых кислот ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Поиск и выравнивание последовательностей нуклеотидов генов осуществляли с помощью программ MegAlign пакета Lasergene (DNASTAR, США) и программы MegaBlast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Получение трансгенных растений табака, морфофизиологическая характеристика и условия выращивания растений. Трансгенные растения табака *Nicotiana tabacum* L. сорта Petit Havana линии SR1 получали методом агробактериальной трансформации листовых дисков, высеченных из листьев трехмесячных растений [8]. Качественную оценку активности репортерного гена *GUS* в листьях T₀-побегов определяли гистохимически. Для этого образцы ткани листьев инкубировали в течение ночи при 37°C в 0.1%-ном растворе

X-Gluc (натриевая соль 5-бром-4-хлор-3-индолил-β-D-глюкуроновой кислоты) (Fermentas, Литва), содержащем 0.1 М натриевый фосфатный буфер (pH 7.0), 10 мМ Na₂EDTA и 0.1% (w/v) Triton X-100. После инкубации с гистохимическим реактивом в течение ночи, зеленые ткани обесцвечивали обработкой 70%-ным этанолом и исследовали под стереомикроскопом на наличие синей окраски [9]. Для контроля наследования участков ДНК генов *ARGOS* и *NtEXPA4* и определения числа вставок часть T₁-семян каждой полученной линии проращивали на среде MC с добавлением гиромоцина в климатической камере Binder (Германия). Через три недели подсчитывали устойчивые и неустойчивые к селективному агенту сеянцы и определяли расщепление при наследовании гена селективного маркера. Результаты обрабатывали методом χ^2 по стандартной методике, а для дальнейшей работы выделяли линии, характеризующиеся расщеплением 3 : 1.

Растения трансгенных линий и контрольные растения культивировали в вегетационных сосудах объемом 450 мл, заполненных универсальным грунтом (Terra vita, Россия), на открытой светоплощадке при температуре 25–27°C с освещенностью ~4000 лк и фотопериодом 16/8 ч (свет/темнота). За растениями поколения T₁ наблюдали от стадии адаптации к выращиванию в почве в условиях теплицы до получения семян, что занимало от четырех до шести месяцев. В качестве контрольных использовали нетрансгенные растения табака сорта Petit Havana SR1, выращенные на среде MC без добавления антибиотиков и адаптированные к условиям почвы (SR1). Также для контроля использовали трансгенные растения, содержащие T-ДНК бинарного вектора pCambia 1301 без целевого гена (1301). Длину и площадь листьев определяли в период цветения. Для каждой линии было отобрано по пять растений, у которых измеряли длины трех крупных нижних листьев (первый, второй и третий листья) от начала листовой пластины по центральной жилке до самого кончика. Длину стебля определяли в период цветения. У каждого растения также измеряли длины пяти цветков, начиная от цветоножки и заканчивая краем желобка венчика, и вычисляли средние значения. Через пять дней после начала плодоношения для каждого растения измеряли длины трех семенных коробочек и вычисляли средние значения. Для определения средней площади клеток нижнего эпидермиса листьев и наружного эпидермиса венчика цветков с помощью пинцета со средней части трех нижних листьев и средней части трех венчиков цветков отбирали слой эпидермиса площадью 0.5–1 см², располагали его на предметном стекле, добавляли физиологический раствор и накрывали покровным стеклом. Измерения проводили с помощью универсального флуоресцентного микроскопа модели

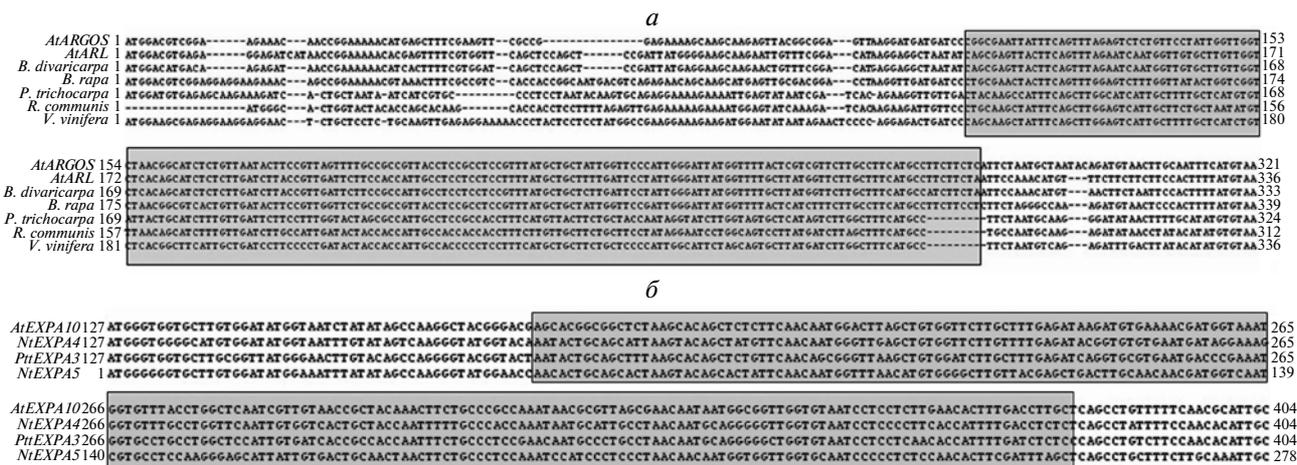


Рис. 1. Поиск консервативных участков в последовательностях нуклеотидов генов *ARGOS* и *NiEXPA4*. а – результаты выравнивания открытых рамок считывания генов *ARGOS* и *ARL*, а также гомологичных участков ДНК *Boechera divaricarpa*, *Brassica rapa*, *Ricinus communis*, *Vitis vinifera* и *Populus trichocarpa*; б – результаты выравнивания открытых рамок считывания генов *AtEXPA10*, *NiEXPA4*, *PtEXPA3* и *NiEXPA5*. Серым цветом выделены фрагменты целевых генов, которые были амплифицированы и клонированы в бинарном векторе pCambia 1301.

Axio Imager M1 (Carl Zeiss, Германия) с использованием оригинального программного обеспечения.

Тотальную РНК из исследуемых растений выделяли с тризолом, первую цепь кДНК строили с помощью олиго(dT)праймера (Силекс, Россия) и MMuLV-ревертазы (NEB, США). ОТ-ПЦР гена *NiEXPA1* осуществляли с помощью праймеров AACATTGGCATTTCACAGAGGTG и AAGGGTTG-GCCATTGAGATA. Для ОТ-ПЦР гена *NiEXPA4* использовали праймеры TGTAATCCTCCCCTTAC-SAT и ATAATTGTTGTTTGGCCAGTPTTG. В качестве референсного гена использовали ген α -тубулина табака, ОТ-ПЦР которого осуществляли с помощью праймеров CCAAGGTGCAAA-GGGCTGTAT и TTCCTCGTTATCATCGTCT-TCTCC.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Поиск и клонирование консервативных фрагментов генов *ARGOS* *A. thaliana* и *NiEXPA4* *N. tabacum*

В GenBank имеются нуклеотидные последовательности гена *ARGOS* многих растений: *A. thaliana* (NM115853.4), *Arabidopsis lyrata* (XM002880036.1), *Boechera divaricarpa* (DQ226826.1), *Brassica rapa* (FJ171724.1), *Vitis vinifera* (AM475052.1), *Ricinus communis* (XM002533293.1), *Solanum lycopersicum* (NM001247750.1), *Populus trichocarpa* (XM002310336.1, XM002331606.1), *Picea sitchensis* (EF678316.1), *Oryza sativa* (DQ641272.1), *Zea mays* (AEQ59626.1), *Hordeum vulgare* (AK369743.1). Высоким уровнем сходства с геном *ARGOS* отличается также ген *ARGOS-LIKE* *A. thaliana* (NM180078.3). Ранее нами было показано, что к гену *ARGOS* *A. thaliana* наиболее близки по нуклеотидному составу гомологичные участки ДНК *B. divaricarpa*, *B. rapa*, *R. communis*, *V. vinifera* и *P. trichocarpa* [8].

Открытые рамки считывания генов *ARGOS* этих растений были выравнены между собой и с геном *ARGOS-LIKE* в целях поиска консервативных участков. Однако такой участок ДНК в гене *ARGOS* найти не удалось, поэтому было решено отобрать фрагмент ДНК размером 171 пн, отличающийся наибольшей консервативностью (рис. 1,а). Этот участок ДНК был амплифицирован из геномной ДНК *A. thaliana* и клонирован в бинарном векторе pCambia 1301 в антисмысловую ориентации.

Затем были выравнены нуклеотидные последовательности открытых рамок считывания генов различных экспансинов. Было показано, что по нуклеотидному составу к гену *AtEXPA10* наиболее близки гены *NiEXPA4* табака, *PtEXPA3* тополя и *NiEXPA5* табака. Из-за близости к гену *AtEXPA10* предполагается, что именно экспансин *NiEXPA4* в первую очередь принимает участие в регуляции роста листьев [5]. Нуклеотидные последовательности этих генов были снова выравнены для поиска консервативного участка. В ходе работы было решено отобрать фрагмент гена *NiEXPA4* табака размером 227 пн (рис. 1,б). Этот фрагмент ДНК был амплифицирован и клонирован в бинарном векторе pCambia 1301 в антисмысловую ориентации. Полученные в ходе работы генно-инженерные конструкции были внедрены в клетки *A. tumefaciens*.

Сравнительная морфофизиологическая характеристика трансгенных растений табака, экспрессирующих участки генов *ARGOS* *A. thaliana* и *NiEXPA4* *N. tabacum* в антисмысловой ориентации

С помощью генно-инженерной конструкции фрагмента гена *ARGOS* *A. thaliana* были получены

17 побегов, из которых на селективной среде укоренились 12 растений. Пять растений были отброшены из-за отрицательных результатов при ПЦР-анализе и анализе экспрессии репортерного гена *GUS*. В целом к условиям почвы удалось адаптировать семь растений под номерами 2, 3, 9, 12, 13, 14 и 17. Расщепление 3 : 1 было показано только для линий 3, 9, 12, 14 и 17, которые и использовались в дальнейших экспериментах по их морфологической характеристике. Сеянцы, не дающие расщепления на селективной среде, в данной работе не отбирали из-за большой длительности вегетационного периода у табака, т.е. для морфологического анализа использовали как гомозиготные, так и гетерозиготные растения.

При использовании вектора *pCambia 1301* с фрагментом гена *NtEXPA4* после трансформации было получено 43 побега, из которых на селективной среде укоренились 20 растений. После ПЦР-анализа и анализа экспрессии репортерного гена *GUS* из этих 20 растений были отобраны лишь 12. Из них выжили и были адаптированы к условиям почвы 10 растений под номерами 1, 5, 15, 19, 27, 29, 30, 31, 35 и 36. Семена этих растений рассеивали на селективной среде с гигромицином, и расщепление 3 : 1 было показано для линий 5, 15, 19, 27, 29 и 30. Эти растения адаптировали к выращиванию в почве в условиях теплицы, и в период цветения проводили их морфологический анализ.

В случае использования конструкции фрагмента гена *ARGOS* в антисмысловой ориентации из пяти линий растений достоверным уменьшением размеров органов характеризовались лишь линии под номерами 3 и 12, остальные линии трансгенных растений не отличались от контроля (рис. 2). Длины листьев у линий 3 и 12 были в среднем на 13% меньше, чем у контроля (рис. 2,а), а площадь листьев – на 16% (рис. 2,б). По высоте стебля контрольные и опытные растения статистически не различались между собой (рис. 2,в). По длине цветка некоторые опытные растения характеризовались статистически достоверным уменьшением: на 6% у линии 3, на 2% у линии 9, на 4% у линий 12 и 14. У линии 17 длина цветков не отличалась от контроля (рис. 2,г). При этом длина коробочек была уменьшена лишь у линий 3 и 12 (на 17 и 13% соответственно) (рис. 2,д).

Часть трансгенных растений табака, экспрессирующих фрагмент гена *NtEXPA4* в антисмысловой ориентации, также характеризовалась статистически достоверным уменьшением размеров органов (рис. 2), причем в первую очередь это было характерно для линий 15, 19 и 29. По длине листьев опытные растения отличались уменьшением этих органов у линии 15 на 12%, у линии 19 на 13%, а у линии 29 на 14% (рис. 2,а). По площади листьев эти же линии отличались уменьшением по сравнению с контролем в среднем на 19, 11 и 16% соответственно (рис. 2,б). По высоте стебля лишь линии 15 и 27 характеризовались уменьше-

нием на 24 и 33% соответственно (рис. 2,в). По длине цветка было зафиксировано уменьшение для линии 5 на 5%, линии 15 на 6%, линии 19 на 4%, линии 27 на 2%, линии 29 на 5% и линии 30 на 3% (рис. 2,г). В ходе наблюдений было замечено, что у некоторых цветков опытных растений уменьшались не только длина, но и диаметр (рис. 3). По длине коробочек опытные растения статистически не отличались от контрольных растений (рис. 2,д).

Внутри каждой линии как трансгенных, так и контрольных растений различия в размерах листьев и стебля между разными вариантами выборки никогда не превышали 10%, а в размерах цветков – 1%. В то же время внедрение Т-ДНК бинарного вектора также значительно не влияло на морфологические параметры исследуемых растений (рис. 2 и 4). Это означает, что уменьшение размеров органов трансгенных растений, вероятнее всего, обуславливалось специфическим влиянием полученных в ходе работы генно-инженерных конструкций.

Уменьшение размеров органов у растений может обуславливаться снижением уровня клеточного деления или частичного блокирования роста клеток растяжением. В связи с этим для выяснения причин уменьшения размеров органов нами были проведены измерения размеров клеток эпидермиса листьев и цветков исследуемых растений. Было показано, что опытные растения, экспрессирующие фрагмент гена *ARGOS*, характеризуются различными размерами клеток эпидермиса листьев в зависимости от линии (рис. 4,а). Трансгенные растения линий 3 и 12 отличаются уменьшением размеров клеток эпидермиса листьев на 26 и 14% соответственно. Можно предположить, что уменьшение размеров листьев у этих растений обуславливалось в первую очередь именно уменьшением размеров клеток, однако уменьшение числа клеток, вероятнее всего, тоже играет определенную роль в данном случае. Интересно отметить, что у линий 9, 14 и 17, у которых размеры органов не уменьшались, обнаруживаются, наоборот, более крупные, чем в контроле клетки (рис. 4,а). Например, размеры клеток у линии 9 увеличены на 16%, у линии 14 на 51%, а у линии 17 на 41%. Площади клеток эпидермиса цветков у линий 3 и 12 также были немного уменьшены (на 11 и 5% соответственно), а у линий 9, 14 и 17 наблюдалось увеличение в размерах (на 5, 18 и 10% соответственно) по сравнению с контролем (рис. 4,б).

В случае с трансгенными по фрагменту гена *NtEXPA4* растениями наблюдалась примерно такая же картина. У линий, характеризующихся уменьшением размеров органов, уменьшались также и размеры клеток эпидермиса листьев (рис. 4,а). Размеры клеток уменьшались у линии 15 на 25%, у линии 19 на 16% и у линии 29 на 21% по сравнению с контрольными. Линии трансгенных растений, у которых размеры органов оставались в пределах нормы, наоборот, характеризовались

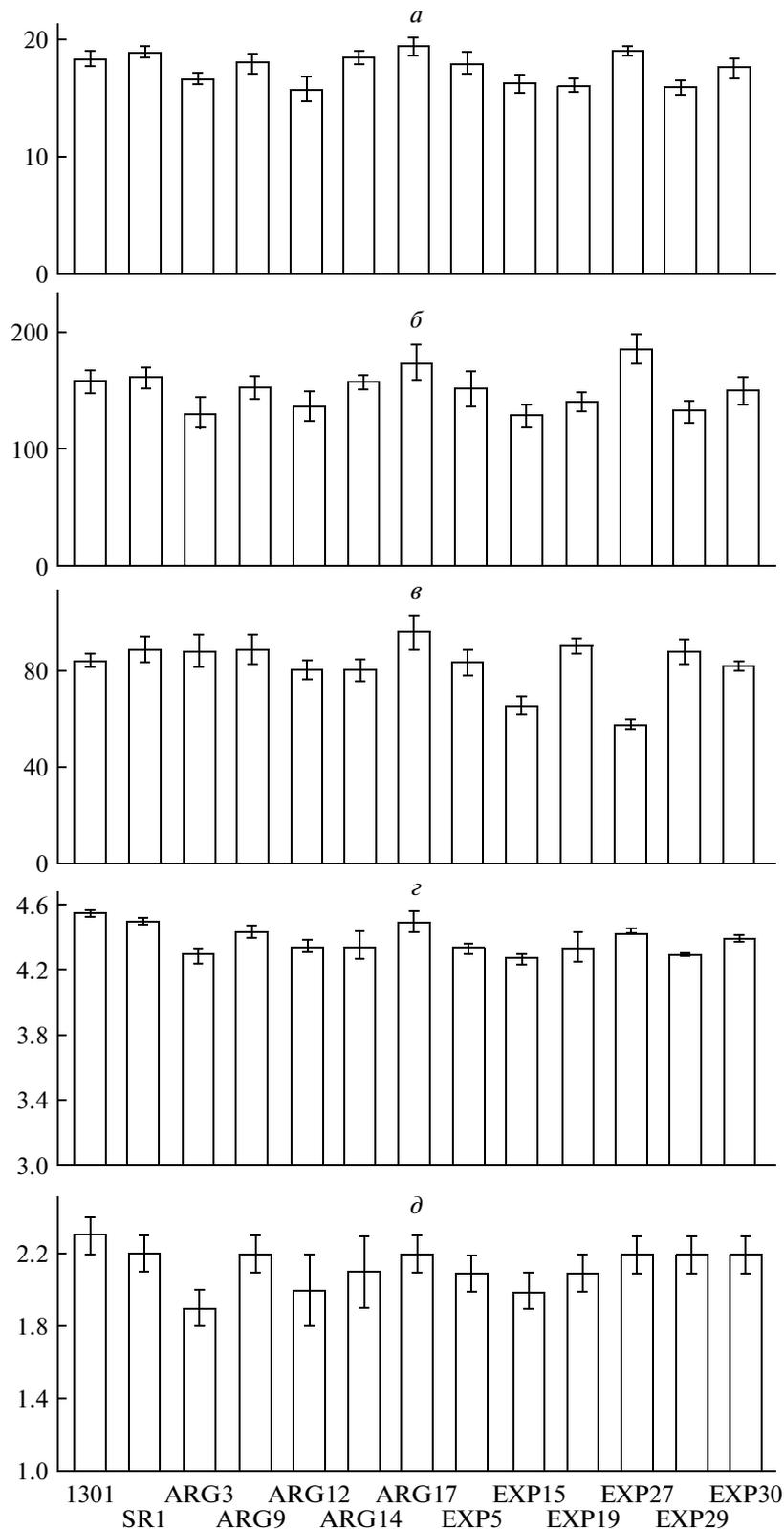


Рис. 2. Морфологические параметры трансгенных и контрольных растений. *a* – длина листьев в период цветения, см; *б* – площадь листьев в период цветения, см²; *в* – высота стебля в период цветения, см; *г* – длина цветков, см; *д* – длина коробочек, см. 1301 – контрольные трансгенные растения табака, содержащие Т-ДНК бинарного вектора pCambia 1301 без целевого гена. SR1 – контрольные растения табака дикого типа. ARG3–17 – линии опытных растений табака, экспрессирующих фрагмент гена *ARGOS* в антисмысловой ориентации. EXP5–30 – линии опытных растений табака, экспрессирующих фрагмент гена *NiEXPA4* в антисмысловой ориентации.



Рис. 3. Цветки контрольных и опытных растений, экспрессирующих фрагмент гена *NiEXPA4* в антисмысловой ориентации. *a* – цветок контрольных растений табака дикого типа; *б* – цветок трансгенного растения табака линии 15.

увеличением размеров клеток нижнего эпидермиса листьев (рис. 4,*a*). Например, у линии 30 размеры клеток увеличивались на 37%. У всех трансгенных растений, экспрессирующих участок гена *NiEXPA4*, размеры клеток наружного эпидермиса цветков характеризовались незначительным уменьшением по сравнению с контролем (в среднем на 12%) (рис. 4,*б*). Этим они отличались от трансгенных растений, экспрессирующих фрагмент гена *ARGOS* в антисмысловой ориентации, у части которых наблюдалось увеличение размеров клеток эпидермиса цветков.

Нами ранее было показано, что сверхэкспрессия гена *ARGOS-LIKE* способствует увеличению уровня экспрессии экспансинов табака [8]. Исходя из того, что гены *ARGOS* и *ARGOS-LIKE* гомо-

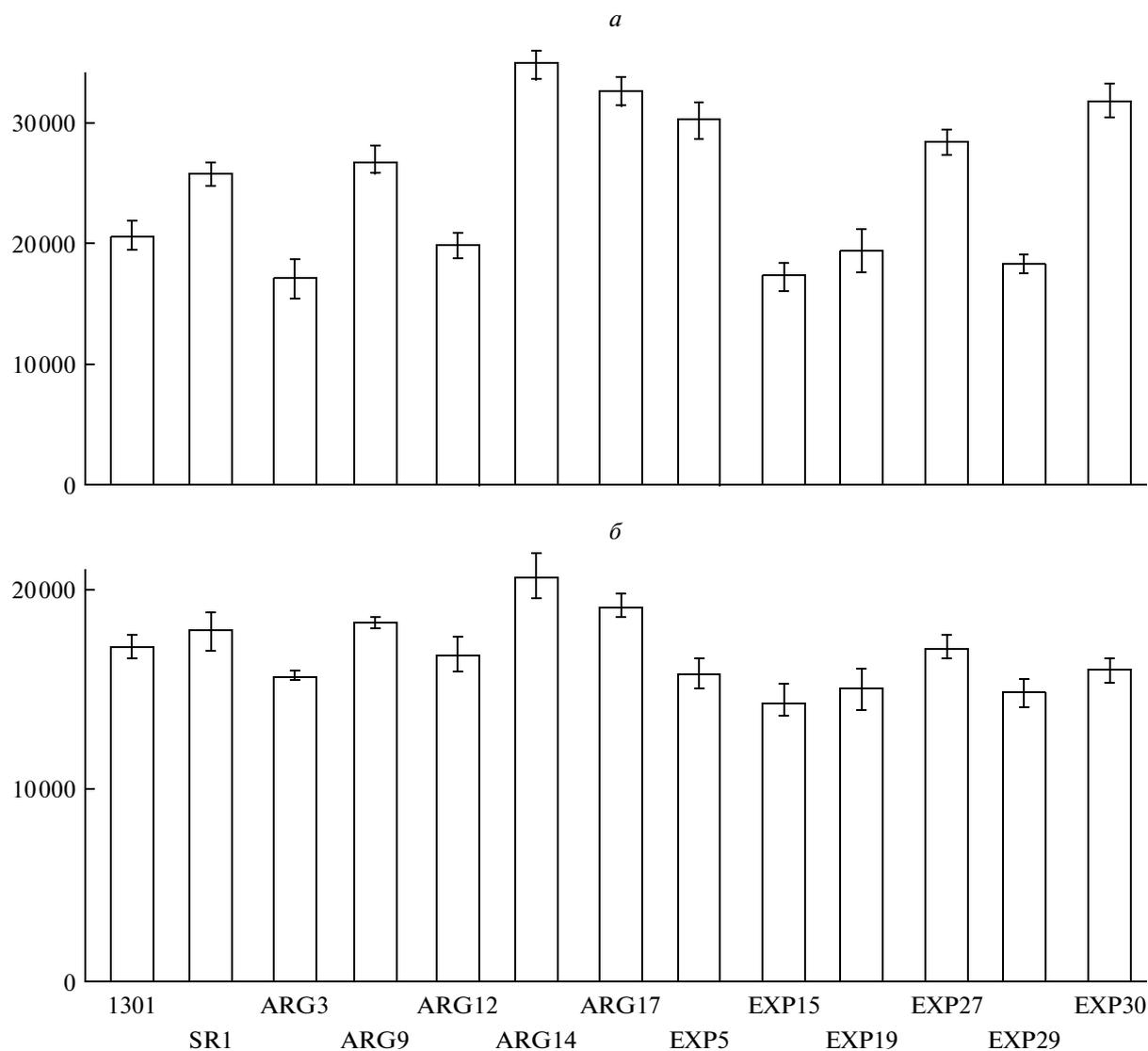


Рис. 4. Сравнительный анализ размеров клеток эпидермиса листьев и цветков контрольных и опытных растений. *a* – площадь клеток нижнего эпидермиса листьев табака, $\mu\text{м}^2$; *б* – площадь клеток наружного эпидермиса цветков табака, $\mu\text{м}^2$. 1301 и SR1 – контрольные растения. ARG3–17 и EXP5–30 – линии опытных растений.

логичные, предположим, что в трансгенных растениях, экспрессирующих фрагмент гена *ARGOS* в антисмысловой ориентации, может быть понижен уровень экспрессии генов некоторых экспансинов. Для подтверждения данного предположения была проведена полуколичественная ОТ-ПЦР генов *NtEXPA1* и *NtEXPA4* в молодых растущих листьях табака [6]. Уровень экспрессии генов *NtEXPA1* и *NtEXPA4* оказался довольно высоким именно в верхушках побегов, молодых цветках и листьях (данные не представлены), что свидетельствует об участии данных экспансинов в процессе роста органов (рис. 5, 1, 2). В то же время в молодых листьях трансгенных растений линий 3 и 12 наблюдалось заметное уменьшение уровня экспрессии генов *NtEXPA1* и *NtEXPA4* (рис. 5, 3, 5). Необходимо отметить, что именно для этих растений было показано уменьшение размеров органов. А в листьях трансгенных растений линии 9 уровень экспрессии генов *NtEXPA1* и *NtEXPA4* оставался в пределах нормы (рис. 5, 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

Как и ожидалось, часть трансгенных растений табака, экспрессирующих фрагменты генов *ARGOS* и *NtEXPA4* в антисмысловой ориентации, действительно характеризуются уменьшением размеров органов. В то же время большинство линий трансгенных растений не отличалось по морфологическим признакам от контроля. Так как у растений, размеры органов которых не изменялись, были увеличены размеры отдельных клеток, то можно предполагать о существовании компенсаторного механизма, который способствует поддержанию размеров органов в пределах нормы. Например, в случае уменьшения уровня экспрессии гена *ARGOS* должно уменьшаться число клеток, приходящихся на один орган, однако за счет стимуляции роста клеток растяжением размеры органов сохраняются в пределах нормы (у линий 9, 14 и 17). Однако у линий 3 и 12 размеры клеток были не больше, а даже меньше, чем у контроля. Именно поэтому размеры органов этих растений оказались меньше, чем в контроле. Ответить на вопрос, почему именно в этих линиях растений не наблюдается компенсаторное увеличение размеров клеток, очень трудно. Можно предположить, что в этих растениях уменьшается уровень экспрессии не только гена *ARGOS*, регулирующего клеточное деление [1], но и его гомолога *ARGOS-LIKE*, отвечающего за регуляцию клеточного растяжения [10]. По нашим данным, экспрессия гена *ARGOS-LIKE* способствует повышению уровня транскрипции генов экспансинов [8]. Именно поэтому нами был проведен анализ уровня экспрессии генов *NtEXPA1* и *NtEXPA4* в исследуемых растениях. Данный эксперимент показал, что уменьшение размеров органов и клеток у линий трансгенных растений 3 и 12 может быть свя-

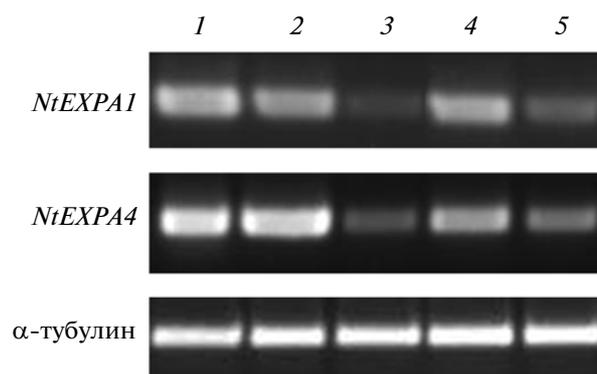


Рис. 5. Электрофореграммы результатов ОТ-ПЦР в молодых листьях трансгенных растений, экспрессирующих фрагмент гена *ARGOS* в антисмысловой ориентации. 1 – контрольные трансгенные растения табака, содержащие Т-ДНК бинарного вектора рCambia 1301 без целевого гена; 2 – контрольные растения табака дикого типа; 3–5 – опытные растения табака линий 3, 9 и 12 соответственно.

зано со снижением уровня экспрессии некоторых экспансинов.

Как и в нашей предыдущей работе [8], было показано, что размеры цветков у трансгенных растений табака изменяются в меньшей степени, чем размеры листьев и стебля. Размеры цветков уменьшались у четырех линий растений, содержащих фрагмент гена *ARGOS*, но размеры клеток цветков только у линий 3 и 12 оказались меньше, чем в контроле, что также свидетельствует о частичном блокировании компенсаторных механизмов именно в этих растениях. Возможно, в данном случае также наблюдается снижение уровня экспрессии некоторых экспансинов, связанных с генами *ARGOS* и *ARGOS-LIKE* в единую генную сеть.

Три линии трансгенных растений табака, экспрессирующих участок гена *NtEXPA4* в антисмысловой ориентации, характеризовались уменьшением размеров органов за счет уменьшения размеров отдельных клеток. Согласно литературным данным эти морфологические особенности трансгенных растений действительно могут быть обусловлены снижением уровня экспрессии гена *NtEXPA4*, так как его белковый продукт принимает участие в клеточном растяжении [5]. Отметим, что отличительная особенность гена *NtEXPA4* по сравнению с геном *ARGOS* в нашей работе проявилась в способности первого воздействовать на длину стебля (рис. 2, в). Судя по всему, органы у трансгенных по участку гена *NtEXPA4* растений табака уменьшались не только за счет уменьшения размеров клеток, но и за счет уменьшения их числа, приходящегося на один орган. Именно поэтому линии опытных растений, у которых размеры органов не изменялись, характеризовались увеличением размеров отдельных клеток. В дан-

ном случае компенсаторный механизм, влияющий на клеточное растяжение, может быть обусловлен функционированием других экспансинов в листьях табака [6].

Отметим, что в цветках всех опытных растений экспрессирующих фрагмент гена *NtEXPA4*, наблюдалось уменьшение размеров клеток (рис. 4,б). Это означает, что размеры цветков, например, у линий 27 и 30 достигали нормы за счет стимулирования клеточного деления, в котором мог принимать участие и ген *ARGOS*. К сожалению, гены *ARGOS* и *ARGOS-LIKE* у табака не секвенированы и проверить уровень их экспрессии в трансгенных растениях пока невозможно. В случае с цветками в отличие от листьев ни у одной линии не происходило компенсаторного увеличения размеров клеток, что может свидетельствовать о большом значении экспансина *NtEXPA4* в регуляции клеточного растяжения в цветках. В листьях же, вероятно, функционируют и другие экспансины, которые могут продублировать функцию *NtEXPA4*.

Необходимо отметить, что экспрессия участков генов *ARGOS* и *NtEXPA4* в антисмысловой ориентации не привела к значительному уменьшению размеров органов у трансгенных растений (например, в 2–3 раза по сравнению с контролем). Возможно, для этого необходимы другие подходы, используемые при блокировании экспрессии у растений. В то же время созданные нами генно-инженерные конструкции могут быть применены для получения трансгенных растений с уменьшенными размерами органов. Однако для достижения более ощутимого результата, видимо, требуются тщательный отбор соответствующих линий и применение методов селекции.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 12-04-31292).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hu Y., Xie Q., Chua N.* The Arabidopsis auxin-inducible gene *ARGOS* controls lateral organ size // *Plant Cell*. 2003. V. 15. P. 1951–1961.
2. *Gao K., Лю К., Лю И.Т.* Специфическая роль *ATEXP1* при росте и адаптации растений *Arabidopsis* к стрессу // *Физиология растений*. 2010. Т. 57. № 2. С. 245–253.
3. *Кулуев Б.Р.* Генетическая регуляция величины органов у растений // *Биомика*. 2012. Т. 2. № 1. С. 33–47.
4. *Mizukami Y., Fischer R.L.* Plant organ size control: *AINTEGUMENTA* regulates growth and cell numbers during organogenesis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. V. 97. P. 942–947.
5. *Cho H.T., Cosgrove D.J.* Altered expression of expansin modulates leaf growth and pedicel abscission in *Arabidopsis thaliana* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. V. 97. P. 9783–9788.
6. *Link B.M., Cosgrove D.J.* Acid-growth response and α -expansins in suspension cultures of bright yellow 2 tobacco // *Plant Physiol*. 1998. V. 118. P. 907–916.
7. *Рукавицова Е.Б., Алексеева В.В., Бурьянов Я.И.* Применение РНК-интерференции в метаболической инженерии растений // *Биоорган. химия*. 2010. Т. 36. № 2. С. 159–169.
8. *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.
9. *Stomp A.M.* Histochemical localization of β -glucuronidase // *S.R. Gallagher GUS Protocols: Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression*. San Diego: Acad. Press, 1992. P. 103–113.
10. *Hu Y., Poh H., Chua N.* The Arabidopsis *ARGOS-LIKE* gene regulates cell expansion during organ growth // *Plant J*. 2006. V. 47. P. 1–9.

The Creation of Transgenic Tobacco Plants Expressing Fragments of the *ARGOS* and *NtEXPA4* Genes in Antisense Orientation

B. R. Kuluev, A. V. Knyazev, B. N. Postrigan, and A. V. Chemeris

Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Scientific Centre, Russian Academy of Sciences, Ufa 450054, Russia

e-mail: kuluev@bk.ru

Transgenic tobacco plants expressing the fragments of the *ARGOS* and *NtEXPA4* genes in antisense orientation have been created. Eleven lines of transgenic plants were investigated and five of them were characterized by a decrease in the sizes of the leaves and flowers as compared to control. Stalk sizes decreased when only the *NtEXPA4* gene fragment was used. The organ size of the experimental plants decreased because of a reduction in the level of both cell division and cell expansion. Two lines of transgenic tobacco plants expressing the part of the *ARGOS* gene in antisense orientation were characterized by a reduction in the level of the *NtEXPA1* and *NtEXPA4* gene expression.