

АНАЛИЗ НАСЛЕДОВАНИЯ ТРАНСГЕНА *cry3aM* У ПОТОМСТВА МОДИФИЦИРОВАННЫХ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ

Е.В. Исаенко, Н.А. Картель

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси», Минск, Беларусь
iahenka@mail.ru

Современные методы генной инженерии позволяют получать сельскохозяйственно-ценные сорта культурных растений путем прямого введения в растительный геном гетерологичных нуклеотидных последовательностей, содержащих целевой ген. Одним из экономически востребованных направлений селекции современных сортов является создание растений с повышенными показателями устойчивости к насекомым-вредителям. Широко распространен подход, основанный на переносе в геном растений ДНК-последовательностей, ответственных за синтез инсектицидных белков *Bacillus thuringiensis* (*Cry*-белки).

Успешная интродукция гетерологичных генов не представляет больших трудностей для многих сельскохозяйственных культур. Однако введение в растительный геном чужеродной генетической информации не всегда обеспечивает стабильное фенотипическое проявление и классическое менделевское наследование. Такая генетическая нестабильность может быть связана как с делецией или мутацией введенной ДНК [1, 2], так и с инаktivацией трансгена [3].

Стабильное наследование трансгена является необходимой предпосылкой для заключения об успехе применения генно-инженерных линий в последующем селекционном процессе.

Картофель, используемый в нашей работе, относится к виду *S. tuberosum* и является аутотетраплоидом. В процессе мейоза хромосомы этого культурного вида картофеля формируют квадриналенты и многие локусы наследуются по типу тетрасомии. Особенности расщепления у аутотетраплоидов определяются наличием четырех гомологичных хромосом, случайной их конъюгацией в мейозе и случайным распределением по гаметам.

В нашей работе используется последовательность гена *cry3a B. thuringiensis*, белковый продукт которого проявляет инсектицидные свойства в отношении колорадского жука. С целью повышения уровня экспрессии в клетках растений нуклеотидная последовательность гена (*cry3aM*) была изменена и приближена по кодонному составу к ДНК генома растений [4].

С использованием гена *cry3aM* сконструированы системы для экспрессии в растениях, которые содержат нативный и гибридный ген *cry3aM* под контролем различных регуляторных элементов, а именно: конститутивного 35S РНК *CAMV* промотора, обеспечивающего экспрессию перенесенных генов и синтез белкового продукта независимо от внешних условий (освещения) и светоиндуцибельного промотора малой субъединицы гена РБФК *Arabidopsis thaliana*, обеспечивающего преимущественную экспрессию контролируемых генов только в зеленых тканях растения. Для различной компартментализации в растительных клетках белкового продукта гена *cry3aM* использовали слияние последовательности целевого гена с последовательностью лидерного пептида гена *rbcS* гороха, ответственного за локализацию генных продуктов в хлоропластах растений, а также с последовательностью лидерного пептида гена экстенсина моркови, обеспечивающего перенос генных продуктов в апопласт.

На основе базовых векторных молекул были сконструированы вектора для экспрессии в растениях, в составе Т-ДНК которых в качестве маркерного находился ген неомицинфосфотрансферазы типа II (*nptII*), обуславливающий устойчивость растений-трансформантов к антибиотику канамицину. Поскольку данный маркерный ген находится в составе Т-ДНК, которая интегрируется в геном растения целиком, первичный анализ наследования гена *cry3aM* проводили по фенотипическому расщеплению проростков

картофеля в условиях воздействия селективного агента канамицина. Полученные данные планируется в дальнейшем подтвердить с использованием метода ПЦР.

Полученные растительные вектора были использованы для агробактериальной трансформации растений картофеля сорта белорусской селекции Скарб [5].

Отобранные в экспериментах по агробактериальной трансформации трансгенные линии картофеля были выборочно переведены в условия грунта. Цветущие растения были искусственно самоопылены, а также перекрестно опылены с растениями исходного нетрансформированного сорта Скарб. В эксперименте использовали 46 растений, относящихся к 16 различным линиям. В конце вегетационного периода собрано 57 плодов с 11 независимых линий, а также плоды с исходного нетрансформированного сорта. После шестимесячного периода покоя из вызревших ягод извлечены семена для последующего анализа фенотипического расщепления.

Контрольный семенной материал, полученный от нетрансформированного сорта Скарб использовали для подбора необходимой концентрации селективного агента, которую в дальнейшем планировалось использовать в качестве пороговой для отделения канамицин-устойчивых проростков от чувствительных. Контрольные семена по 15-20 шт. высаживали на неселективные MS среды и среды содержащие канамицин в качестве в конечных концентрациях 50, 75 и 100 мкг/мл. На средах, не содержащих канамицина, проростки картофеля имели нормальный фенотип, т.е. образовывали корневую систему с придаточными корнями. На средах с канамицином наблюдалось угнетение роста корней у проростков, хотя зеленые части растений как на селективных, так и на неселективных средах имели схожий внешний вид. Из данных, представленных на рисунке 1, видно, что проростки картофеля, находящиеся на среде с канамицином в концентрации 50 мкг/мл имеют несколько более удлиненные корешки, чем на средах с концентрациями 75 и 100 мкг/мл, где длина корней визуальнo не отличается. Исходя из этих наблюдений достаточной концентрацией, необходимой для торможения развития корневой системы проростков была определена 75 мкг/мл.

Для анализа наследования гетерологичной вставки по фенотипическому расщеплению семена от самоопыления и анализирующих скрещиваний растений картофеля в количестве 23-25 штук высаживались на селективные MS среды. В качестве контроля прорастания семена трансгенных растений так же помещали на неселективные среды по 10-15 штук. Высевы проводили в двухкратной повторности.

Количество содержащих и не содержащих гетерологичную вставку семян определялось фенотипически по развитию корневой системы проростков.

Трансгенные проростки имели абсолютно нормальную корневую систему в присутствии канамицина, в отличие от нетрансгенных, корневая система которых оставалась в зачаточном состоянии, отличалась отсутствием придаточных корней и длиной не более 1 см (рис. 2).

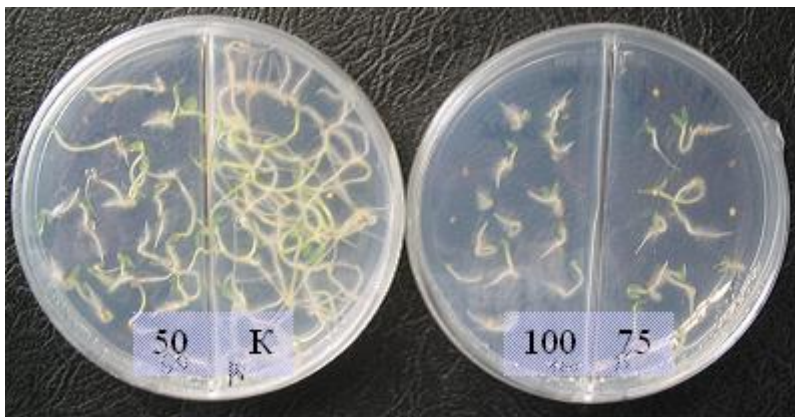


Рис. 1. Подбор селективных сред для анализа расщепления семян. К – среды без добавления канамицина; 50, 75, 100 среды с добавлением канамицина в соответствующих концентрациях в мкг/мл..

Результаты фенотипического расщепления по признаку устойчивости к канамицину приведены в таблице. У растений четырех тестируемых линий 82-2, 155-1, 161-1, 169-1 наблюдаются расщепления, близкие к 3:1, что является результатом самоопыления родительских растений. В результате анализирующего скрещивания родительских форм 19-6 и 38-3 с растениями исходного нетрансформированного сорта наблюдается характерное расщепление 1:1. Эти данные согласуются с гипотезой моногенного наследования признака и соответствуют расщеплению симплексной гетерозиготы Аааа, что, в данном случае, является следствием интеграции одной или нескольких копий трансгена в одну гомологичную хромосому.

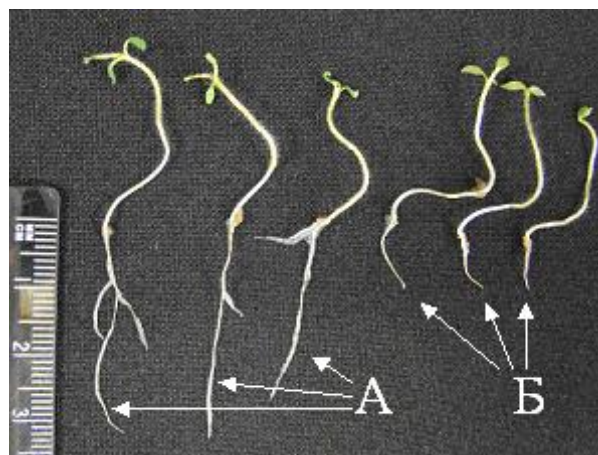


Рис. 2. Внешний вид устойчивых (А) и неустойчивых (Б) к канамицину проростков картофеля.

Таблица

Анализ фенотипического расщепления проростков картофеля

Линии растений	Количество семян на ½ MS			Количество семян на ½ MS + Km ₇₅			Количество проростков на ½ MS + Km ₇₅		Отношение res: sens проростков		Достоверность расщепления		Модель расщепления
	a	b	%	a	b	%	res	sens	Ф	Т	χ ²	Р	
82-2с	14	12,0	85,7±14,3	25	21,5	86,0±6,0	31	12	31:12	32:11	0,122<3,841	0,05	3:1
36-6с	19	15,5	81,6±2,6	25	21,5	86,0±2,0	41	2	41:2	40:3	0,36<3,841	0,05	15:1
54-5 х Скарб	25	15,5	62,0±6,0	25	18,5	74,0±6,0	19	18	19:18	18,5:18,5	0,027<3,841	0,05	1:1
155-1с	12	9,0	75,0±8,3	23	17	73,9±4,3	26	8	26:8	25,5:8,5	0,039<3,841	0,05	3:1
161-1с	10	7,5	75,0±5,0	25	20,5	82,0±2,0	32	9	32:9	31:10	0,132<3,841	0,05	3:1
15-3 х Скарб	16	12,0	75,0±12,5	25	19	76,0±4,0	0	38	0:38	-	-	-	-
19-6 х Скарб	22	15,0	68,2±4,5	25	18	72,0±8,0	16	20	16:20	18:18	0,444<3,841	0,05	1:1
15-3с	14	3,0	21,4±14,3	25	9	36,0±4,0	0	18	0:18	-	-	-	-
38-3 х Скарб	17	17,0	100,0±0,0	25	24	96,0±0,0	26	22	26:22	24:24	0,333<3,841	0,05	1:1
169-1с	19	14,5	76,3±7,9	24	19,5	81,3±6,3	31	8	31:8	29:10	0,538<3,841	0,05	3:1

Примечание: а-высажено семян в каждой повторности; б-среднее количество проростков; res-устойчивые к канамицину проростки; sens- проростки, чувствительные к канамицину; Ф-фактическое соотношение устойчивых и неустойчивых к канамицину проростков; Т-теоретически ожидаемое соотношение; после процентного показателя приведено отклонение среднего.

У линии 36-6 при самоопылении 41 проросток оказался устойчивым к канамицину и только 2 чувствительными, что можно объяснить расщеплением гетерозиготы по двум неаллельным генам 15:1 при полном доминировании.

В случае линии 15-3 наблюдается отсутствие устойчивости к канамицину у всех проростков без исключения как при самоопылении, так и в результате скрещивания с исходным сортом. Данный феномен, возможно, обусловлен явлением сайленсинга, что планируется в дальнейшем подтвердить или опровергнуть дополнительным анализом методом ПЦР.

Полученные данные, несмотря на различное количество вставок гетерологичной последовательности и различное положение их в геноме растений, соответствуют схеме менделевского расщепления и могут служить основой для заключения о стабильном и предсказуемом характере наследования интегрированной в геном трансгенной вставки, содержащей гены *nptII* и *cry3aM*.

1. C.H. Hanisch ten Cate [et al.], Frequent spontaneous deletions of Ri T-DNA in *Agrobacterium rhizogenes* transformed potato roots and regenerated plants // Plant Mol.Biol. - 1990. - V. 14. - P. 735-741.
2. Y.S. Kim [et al.], Frequent occurrence of transgene deletion in transgenic plants // Mol.Cells. - 1998.- V. 8. - P. 705-708.
3. С.Д. Курочкина [и др.], Генетическая трансформация растений, процессы рекомбинации и регуляции экспрессии генов у трансгенных растений // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. - 1998.- №. 4. - С. 3-12.
4. G.R. Salehi Jozani, I.V Goldenkova, E.S Piruzian, Full modification of the coding sequence for enhancing potato expression of insect control protein *cry3a* gene // Proceeding book of XVII European Association for Research on Plant Breeding conference on «Genetic Variation for Plant Breedin», Tulln, Austria. – 2004. - P. 239-245.
5. Е.В. Исаенко, И.В. Голденкова-Павлова, Н.А. Картель, Перенос гена *cry3aM* в геном растений картофеля // Сборник научных трудов «Картофелеводство». - Т. 12. - 2007. - С. 14-21.

ИНБРИДИНГ И ПОПУЛЯЦИОННАЯ СТРУКТУРА У БЕРЁЗЫ ПУШИСТОЙ

И.Ю. Исаков

Воронежская государственная лесотехническая академия, Воронеж, Россия

leskul@vgtla.vrn.ru

Древесные растения являются важным экологическим ресурсом планеты, поэтому необходимо расширять наши знания о полиморфизме естественных популяций древесных пород с целью дальнейшего максимального использования их генетического потенциала. Род *Betula* L. является сложным в систематическом отношении. Имеются противоречивые данные о возможности естественной гибридизации у видов этого рода. Требуют уточнения и некоторые репродуктивные и селекционные особенности видов берёзы, как на индивидуальном, так и на популяционном уровнях. Виды берёз являются удобным модельным объектом среди древесных видов в связи с ранним вступлением в стадию семеношения и быстрой сменой генераций.

Целью исследования является проверка гипотезы, кратко выраженной в словах Ч. Дарвина «природа испытывает отвращение к постоянному самоопылению». На протяжении долгого времени полагали, что развитие растительного мира в большей мере зависит от аутбридинга (случайного опыления). Одним из негативных сопутствующих процессов, проявляющемся в гибели потомства и снижении средних фенотипических значений признаков биопродуктивности, считался инбридинг. Основной задачей работы является выявление реакции отдельных деревьев естественных популяций берёзы повислой и б. пушистой на разные способы опыления – инбридинг, аутбридинг и кроссбридинг; а также характера наследования признаков продуктивности в первом и втором поколениях.