

На правах рукописи

ДЕЙНЕКО ЕЛЕНА ВИКТОРОВНА

**Изучение экспрессии гетерологичных
и собственных генов у трансгенных растений
(на примере *Nicotiana tabacum* L.)**

Генетика – 03.00.15

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Подписано к печати 9 апреля 2004г.
Формат бумаги 60 х 90. Печ.л. 2. Уч.изд.л. 1.4.
Тираж 100 экз. Заказ 41.

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

Москва
2004

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

Научный консультант:

доктор биологических наук,
профессор, академик РАН
В.К. Шумный

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
профессор, академик РАН
С.В. Шестаков

доктор биологических наук,
профессор
Э.С. Пирузян

доктор биологических наук,
профессор
Л.А. Лутова

Ведущая организация:

Центр «Биоинженерия» РАН,
Москва

Защита состоится 01 июня 2004 года в _____ часов на заседании Диссертационного совета Д002.214.01 при Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН по адресу: 119991, Москва, ул. Губкина, д. 3. Факс: (095) 132-89-62.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН.

Автореферат разослан 22 апреля 2004 года.

Ученый секретарь Диссертационного совета
кандидат биологических наук

Г.Н. Полухина

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Генетическая инженерия растений представляет собой новое направление в деятельности человека, позволяющее целенаправленно, по заранее намеченной программе экспериментально модифицировать геном растений. Необходимо подчеркнуть, что разработанные к настоящему времени генно-инженерные методы и подходы дают возможность перестраивать геном растения с использованием генетической информации из разных гетерологических систем: вирусов, бактерий, насекомых, животных и человека. Более того, при использовании генно-инженерных методов существенно расширяются возможности модификации генома и внутри растительного царства, снимающие естественные барьеры между отдаленными видами растений. Таким образом, дополнительно к традиционным селекционно-генетическим методам могут быть добавлены методы генетической инженерии, что позволит существенно расширить границы формообразовательного процесса при создании исходного материала. Реализация таких программ невозможна с использованием только традиционных методов селекции.

Успех любой селекционно-генетической программы, направленной на улучшение хозяйствственно ценных признаков у растений с применением методов генетической инженерии, определяется высоким и стабильным уровнем экспрессии перенесенных генов. Уже через несколько лет после создания первых трансгенных растений стало очевидно, что гетерологичные гены функционируют в новом окружении растительного генома не всегда так, как предполагалось (Matzke *et al.*, 1989; Linn *et al.*, 1990). Несмотря на то что интегрированные в геном растения-реципиента фрагменты экзогенной ДНК становились его obligатным компонентом (трансгеном), сохранялись в последующих поколениях как неотъемлемая часть генома и наследовались согласно законам Менделя (Potrykus *et al.*, 1985; Budar *et al.*, 1986; Heberle-Bors *et al.*, 1988; Christou *et al.*, 1989), к настоящему времени накоплено достаточно много примеров отклонений от mendelianского наследования, обусловленных инактивированием гетерологичных генов (Matzke *et al.*, 1989; 1998; Mejer *et al.*, 1992; Itoch *et al.*, 1997; Wang, 2000; Ma, Mitra, 2002). При создании трансгенных растений инактивирование трансгенов, известное как «gene silencing», представляется как нежелательное явление (Finnegan, McElroy, 1994; Brandle *et al.*, 1995; Palauqui, Vaucheret, 1995).

Необходимо отметить, что замолкание генов встречается не только у трансгенных растений. Так, парамутации у кукурузы были известны задолго до обнаружения эффекта инактивации перенесенных генов (Brink, 1973). Однако только сравнительно недавно стали обозначаться общие черты между этими явлениями (Matzke *et al.*, 2000). Трансгенные

растения, у которых перенесенные гены относительно легко идентифицируются и находятся в инактивированном состоянии, могут служить уникальными моделями для изучения молекулярно-генетических механизмов замолчания трансгенов, а также поиска путей преодоления этого феномена. Поэтому накопление любых экспериментальных фактов, касающихся феномена инактивации трансгенов, может послужить важным шагом в его понимании, что явится дополнением к фундаментальным представлениям о функционировании генов в растениях.

Применение новых технологий, позволяющих модифицировать геном растений введением в него чужеродных генов, ставит перед исследователями ряд проблем, связанных как с функционированием самих гетерологичных генов в новом окружении генома растений, так и их влиянием на функционирование собственных генов растения. Подобно мобильным генетическим элементам (McClintock, 1958), инсерции трансгенов в зависимости от места встраивания могут менять экспрессию отдельных генов у трансгенных растений, что фенотипически может выражаться в изменении каких-либо признаков у растений, в том числе и морфологических (Koncz *et al.*, 1990; Tinland, 1996; Klucher *et al.*, 1996; Azpiroz-Leehan *et al.*, 1997; Fu *et al.*, 2000). Изменения различных признаков, вызванные внедрением фрагментов экзогенной ДНК, классифицируются как инсерционные мутации (Feldmann *et al.*, 1989). В настоящее время мутации, индуцированные у трансгенных растений внедрением фрагментов экзогенной ДНК, достаточно широко используются в ряде ведущих зарубежных биотехнологических центров для идентификации и клонирования генов, что является важным направлением в исследованиях по анализу структурно-функциональной организации генома растений (Feldmann *et al.*, 1991; Rerie *et al.*, 1994; Ohshima *et al.*, 1997; Томилов и др., 1999).

Цель и задачи исследования. Цель данной диссертационной работы – исследование эффектов проявления гетерологичных генов в новом окружении растительного генома, а также эффектов проявления собственных генов (Т-ДНК мутации) у трансгенных растений.

Для достижения этой цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Дать оценку стабильности экспрессии перенесенных генов на примере случайной выборки независимо полученных трансгенных растений табака.
2. Проанализировать стабильность сохранения перенесенного гена *nptII* у потомков двух независимо полученных трансгенных растений с одной инсерцией Т-ДНК на геном в течение нескольких поколений (при самоопылении).

3. Создать трансгенные растения табака, моделирующие нестабильный уровень экспрессии маркерного гена *nptII* введением дуплицированных фрагментов в состав генетических конструкций. Исследовать стабильность экспрессии *nptII*-гена у полученных модельных трансгенных растений табака и их гибридов.

4. Создать модельные трансгенные растения табака на основе гибридов, полученных от скрещивания трансформантов со множественными инсерциями *nptII*-гена. Оценить влияние на стабильность проявления экспрессии маркерного гена *nptII* числа инсерций Т-ДНК.

5. Определить частоты появления растений с мутантным фенотипом среди трансгенных растений табака и создать коллекцию Т-ДНК индуцированных мутаций с измененным строением цветка и пониженной мужской fertильностью.

6. Изучить характер проявления и наследование мутантного фенотипа с измененным строением цветка и пониженной мужской fertильностью у созданных трансгенных растений табака. Описать цитологический фенотип проявления мутации (нарушения мейоза, микроспоро- и микрогаметогенеза).

7. Оценить частоты встраивания в геном трансгенных растений фрагментов векторных ДНК.

8. Провести анализ нуклеотидных последовательностей районов интеграции Т-ДНК инсерций у отдельных трансгенных растений.

Научная новизна и практическая ценность работы. В работе впервые проведен детальный анализ экспрессии гетерологичных и собственных генов на примере больших выборок исходных трансгенных растений табака (*N. tabacum* L.). Оценка стабильности экспрессии гетерологичных генов (в частности, маркерного гена *nptII*) проводилась у потомков от самоопыления как трансгенных растений, так и гибридов от их скрещивания в селективных условиях. Используемый подход позволяет применять микробиологические методы широкомасштабного скрининга больших выборок (тысячи и десятки тысяч индивидуальных трансгенных растений) и выявлять отдельные особенности функционирования трансгенов в новом окружении растительного генома.

На основании результатов, полученных при выполнении данной диссертационной работы, становится очевидным, что если гетерологичные гены и выступают как облигатный компонент генома в случайной выборке независимо полученных трансгенных растений табака, экспрессия их может быть нарушена и фенотипически они могут не проявляться среди потомков. Установлено, что у большей части независимо полученных методом агробактериального переноса трансгенных растений табака маркерный ген *nptII* наследуется потомками первого поколения от самоопыления в соответствии с законами Менделя, что свидетельствует о со-

хранении его стабильного уровня экспрессии. Отклонения от менделевского расщепления, характеризующие нестабильный уровень экспрессии гетерологичных генов, в долевом отношении выявляются в 6 % и полная потеря экспрессии – в 2 % случаев. На основании детального анализа наследования гетерологичных генов у гибридов от скрещивания трансгенных растений с одной и множественными Т-ДНК-инсерциями впервые показано, что среди 50 реципрокных комбинаций скрещиваний трансгенных растений табака с одной инсерцией Т-ДНК уже в F₂ наблюдаются отклонения от менделевского расщепления по дигибридной схеме. Увеличение числа инсерций, интегрированных в разные группы хромосом, не влияло на стабильность экспрессии гетерологичного гена: случаев полного инактивирования *nptII*-гена у гибридов от скрещивания трансформантов со множественными инсерциями Т-ДНК в разные группы хромосом не выявлено. Полученные результаты могут служить основой при создании хозяйствственно ценных сортов на основе объединения нескольких гетерологичных генов в геноме гибридов.

На примере линии T₀-5 трансгенных растений табака впервые выявлено три аллельных состояния *nptII*-гена (активное, инактивированное и реактивированное). Проведен генетический анализ взаимодействия аллелей *nptII*-гена. Установлен доминантный характер наследования аллеля, определяющего активное состояние *nptII*-гена по отношению к рецессивному характеру наследования аллеля, определяющего его инактивированное состояние. Реактивированное состояние аллеля обусловлено возможной мутацией другого гена растения.

Создана серия трансгенных растений табака, моделирующих нестабильный уровень экспрессии гена *nptII* введением дуплицированных повторенных фрагментов (в прямой и обратной ориентации) в состав Т-ДНК инсерций. Впервые показано, что инактивация гомологичных трансгенов существенно возрастает в геноме гибридных растений. Полученные результаты представляют большое значение для дальнейших как фундаментальных, так и прикладных исследований по изучению функционирования генов растений.

Впервые создана коллекция трансгенных растений табака, проявляющих мутантный фенотип (измененное строение цветка и пониженный уровень мужской fertильности). Установлено, что растения с мутантным фенотипом выявляются среди независимо полученных трансформантов с частотой около 5 %. Инсерционная природа наблюдаемых отклонений для большей части растений подтверждена сцепленным характером наследования измененного признака и устойчивости к антибиотику. Установлены причины, приводящие к снижению мужской fertильности: нарушения мейоза, связанные с образованием деформированных ядер в телофазе I, изменением ориентации веретен деления в

метафазе II мейоза, перфорацией клеточной стенки с образованием цитомиктических каналов и перемещением по ним хроматина из одного мейоцита в другой, а также нарушения на отдельных стадиях микроспоро- и микрогаметогенеза, связанные с разрушением содержимого пыльцевых зерен перед стадией первого постмейотического деления и массовой деградацией уже сформировавшейся пыльцы. Созданные растения представляют интерес для дальнейшего анализа флорального морфогенеза, микроспоро- и микрогаметогенеза.

Установлено, что при агробактериальной трансформации одновременно с Т-ДНК как вектором в геном растения могут быть перенесены фрагменты бактериальной ДНК. Полученные результаты представляют интерес при разработке и уточнении правил по биобезопасности использования генетически-модифицированных организмов.

Результаты, полученные в ходе исследования, необходимо учитывать при проведении работ по созданию генетически-модифицированных растений, а также оценке биобезопасности полученных трансгенных организмов. В настоящее время полученные данные используются при чтении лекций в курсе «Генетическая инженерия растений» в Томском государственном университете.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на Международной конференции «Биотехнология растений и молекулярная биология» (Москва, 1991); Международной конференции «Биотехнология растений и генетическая инженерия» (Киев, 1994); на III Международной конференции по геному растений (Сан-Диего, США, 1995); на Международной конференции, посвященной памяти акад. А.А. Баева (Москва, 1996); на Рабочем российско-германском совещании по биотехнологии (Санкт-Петербург, 1996); на Международной конференции «Биология клеток растений *in vitro*, биотехнология и сохранение генофонда» (Москва, 1997); на Международной конференции «Новые направления биотехнологии» (Москва, 1998); на Международном конгрессе «Биотехнология растений и *in vitro* биология в 21-м веке» (Ерусалим, Израиль, 1998); на Всероссийском симпозиуме «Изучение генома и генетическая трансформация растений» (1999, Иркутск); на IV съезде Общества физиологов растений (1999, Москва); на II съезде Всесоюзного общества генетиков и селекционеров (Санкт-Петербург, 2000); на Международной конференции «Биотехнология растений – взгляд в 21-й век» (2000, Костинброд, Болгария); на Международном симпозиуме «Молекулярные механизмы генетических процессов и биотехнология» (Москва–Минск, 2001); на 1-м Международном конгрессе «Биотехнология – состояние и перспективы развития» (Москва, 2002); на 2-й конференции Московского общества генетиков и селекционеров им. Н.И. Вавилова (Москва, 2003); на 8-й Международной конференции «Биология клеток

растений *in vitro* и биотехнология» (Саратов, 2003); на 2-м Международном конгрессе «Биотехнология – состояние и перспективы развития» (Москва, 2003), на научных семинарах в лаборатории биологии растительной клетки университета г. Вагенингена (Нидерланды, 2002), на межлабораторном семинаре по генетике растений Института цитологии и генетики СО РАН (2003).

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 198 страницах, включает стандартные разделы и приложение, иллюстрирована 36 таблицами и 54 рисунками. Список цитируемой литературы включает 249 наименований. Фактический материал получен автором лично, а также в ходе работ с сотрудниками Института цитологии и генетики СО РАН и с сотрудником Института физико-химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН М.Л. Филипенко, сотрудниками лаборатории биологии растительной клетки университета г. Вагенингена (Нидерланды), которым автор приносит глубокую и искреннюю благодарность.

По теме диссертации опубликовано 24 работы в российских и международных рецензируемых журналах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве моделей для изучения стабильности экспрессии перенесенных генов использовали трансгенные растения табака *Nicotiana tabacum* L., полученные на основе сорта «Gatersleben» и линии SR1 (семена были любезно предоставлены доктором Р. Менделем; Институт генетики растений и растительных ресурсов (IPK), Гатерслебен, Германия).

Трансгенные растения получали методом агробактериальной трансформации листовых дисков согласно общепринятому протоколу (Horsh *et al.*, 1985). Для трансформации растений табака использовали штамм *A. tumefaciens* C58C1Rif^R (PGV2260) (Deblaere *et al.*, 1987).

Стабильность экспрессии гена *nptII* определяли по соотношению канамицин-устойчивых (K_m^+) и канамицин-неустойчивых (K_m^-) потомков, полученных от самоопыления исходных трансгенных растений на селективной среде (Murashige, Skoog, 1962) с добавлением канамицина (100 мг/л). Растения, у которых *nptII*-ген наследовался как доминантный согласно законам Менделя, относили к группе трансформантов со стабильной экспрессией анализируемого гена. У растений с нестабильной экспрессией *nptII*-гена в поколениях наблюдали отклонения от менделевского расщепления, мозаичность в проявлении K_m -устойчивого фенотипа на уровне соматических тканей (членование белых и зеленых секторов на листьях) и полную потерю устойчивости к антибиотику (рис. 1).

Геномную ДНК растений выделяли по стандартной методике (Манниатис и др., 1994). Гибридизацию фрагментов ДНК на нейлоновых

фильтрах фирмы «Amersham» проводили по методу Саузерна с модификациями (Дрейпер и др., 1991). Активность фермента неомицинфотрансферазы II определяли стандартным методом Рейса (Reiss *et al.*, 1984). Для клонирования векторной ДНК использовали метод ПЦР с тремя парами праймеров: на геномную ДНК растений GP1/2, на *nptII*-ген, на векторную ДНК (Bd1/2, Bd3/4). ПЦР анализ для двух пар праймеров на векторную ДНК проводили независимо. Анализ нуклеотидных последовательностей фрагментов ДНК, содержащих прилежащие к трансгену области геномной ДНК, определяли секвенированием по методу Сенгера (Манниатис и др., 1994). Для компьютерного анализа нуклеотидных последовательностей выделенных фрагментов ДНК применяли программу «BLAST» с использованием базы данных «Gene Bank».

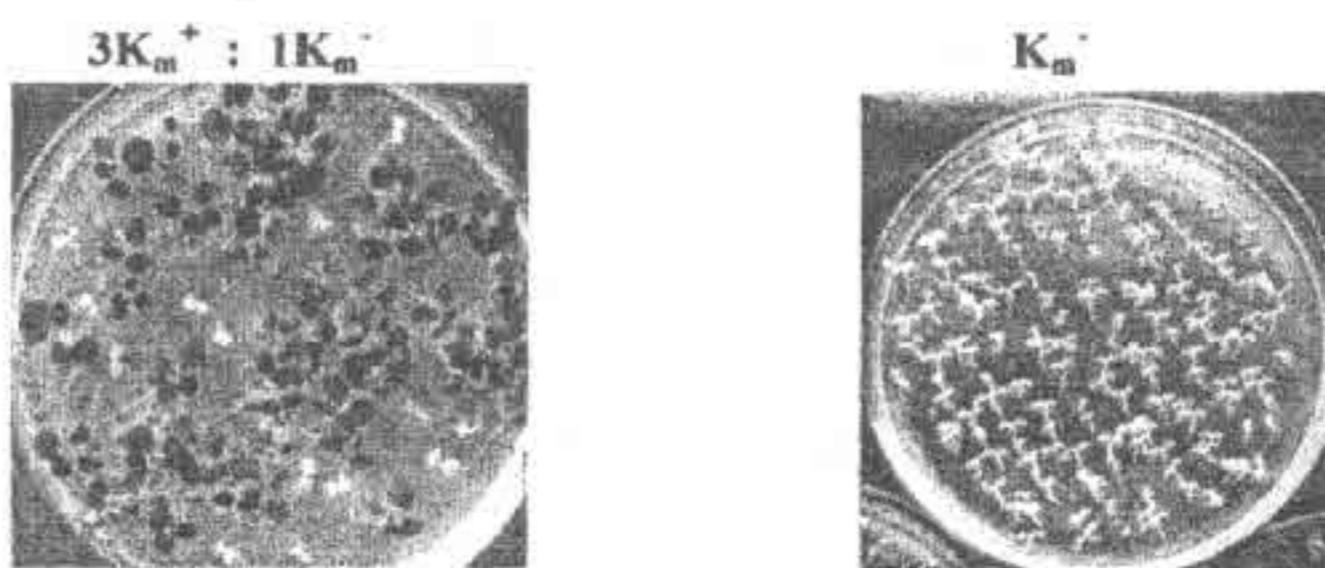


Рис. 1. Схема отбора потомков с K_m^+ -фенотипом у трансгенных растений табака. Слева соотношение $K_m^+ : K_m^-$ соответствует 3 : 1, справа K_m^+ -фенотип.

Нестабильность экспрессии *nptII*-гена оценивали введением в состав генетических конструкций дуплицированных фрагментов (*uidA* – ген в прямой и обратной ориентации). Для проведения детального анализа изменения экспрессии маркерного гена *nptII* в течение нескольких поколений от самоопыления использовали два растения (T_0 -5 и T_0 -6), случайно отобранные из восьми растений с моногенным наследованием *nptII*-гена.

Для выявления нарушений, приводящих к стерильности пыльцевых зерен у трансгенных растений с мутантным фенотипом, анализировали мейоз, микроспоро- и микрогаметогенез по общепринятым методикам (Паушева, 1980). Различные типы цитологических нарушений при делении мейоцитов выявляли на ультратонких срезах пыльников, предварительно фиксированных в жидком пропане. Для анализа микротрубочкового цитоскелета в клетках развивающихся пыльников использовали иммунохимическое окрашивание с антителами к альфа-тубулину. Окрашивание микротрубочек проводили совместно с окрашиванием ДНК пропидиум иодидом. Срезы анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа (Nikon Labophot) или конфокального лазерного сканирующего микроскопа (Biorad MRC600). Для выявления ДНК и каллозы использовали окрашивание срезов с 1 мг/мл DAPI (4'-6'-diamidino-2-phenylindole; Sigma), каллозные оболочки окрашивали 2 % анилиновым голубым в 20 % водном растворе K_3PO_4 . Для изучения отдельных стадий

мейоза дополнительно использовали микроскопирование (DIC, Nomarski) на свежеизолированных препаратах пыльников; стадии развития пыльцы исследовали на сканирующем электронном микроскопе (JSM-6300F) с предварительным криозамораживанием пыльников. Для электронно-микроскопического анализа цитомиксиса использовали трансмиссионный электронный микроскоп (JEOL 1200EX).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Изучение экспрессии гетерологичных генов у трансгенных растений табака

1. Стабильность экспрессии и наследование *prtII*-гена в случайной выборке независимо полученных трансгенных растений табака

Суммарные данные, отражающие долевое соотношение групп трансформантов с различным числом Т-ДНК инсерций и различным уровнем экспрессии *prtII*-гена в случайной выборке независимо полученных трансгенных растений табака линии SR1, представлены на рисунке 2. В анализируемой нами популяции у большей части трансгенных растений (73,5 %) *prtII*-ген стабильно экспрессировался и наследовался в соответствии с законами Менделя для моно- и дигибридного типов расщепления, что для отдельных трансформантов было подтверждено blot-гибридизацией по Саузерну (рис. 3) и соответствующим соотношением $K_m^+ : K_m^-$ -потомков в условиях селективной среды (табл. 1). Меньшая часть растений (26,5 %) включала трансформанты с отклонениями от менделевского расщепления, множественными Т-ДНК инсерциями и потерей K_m -устойчивости. Эта часть трансформантов потенциально может быть отнесена к растениям с нестабильной экспрессией перенесенных генов.

Таблица 1

Сопоставление данных о числе инсерций с данными по расщеплению гибридов от скрещивания моноинсерционных трансформантов в условиях селективного отбора

Номер гибридного растения	Число инсерций у F_1 по Саузерну	Число растений F_2		Расщепление		χ^2
		K_m^+	K_m^-	фактич.	теоретич.	
Nu45 × Nu411(2)	2	341	20	17,1:1	15:1	0,310*
Nu49 × Nu44(1)	2	334	9	37,1:1	15:1	7,697
Nu49 × Nu44(2)	2	248	11	22,5:1	15:1	1,773*

* Фактическое расщепление соответствует теоретическому при $\chi^2_{st0,05} = 3,841$, (d.f. = 1). В скобках указаны номера гибридных растений.



Рис. 2. Структура популяции трансгенных растений табака (линия SR1) по числу Т-ДНК инсерций и характеру экспрессии *prtII*-гена у потомков T_1 от самоопыления.

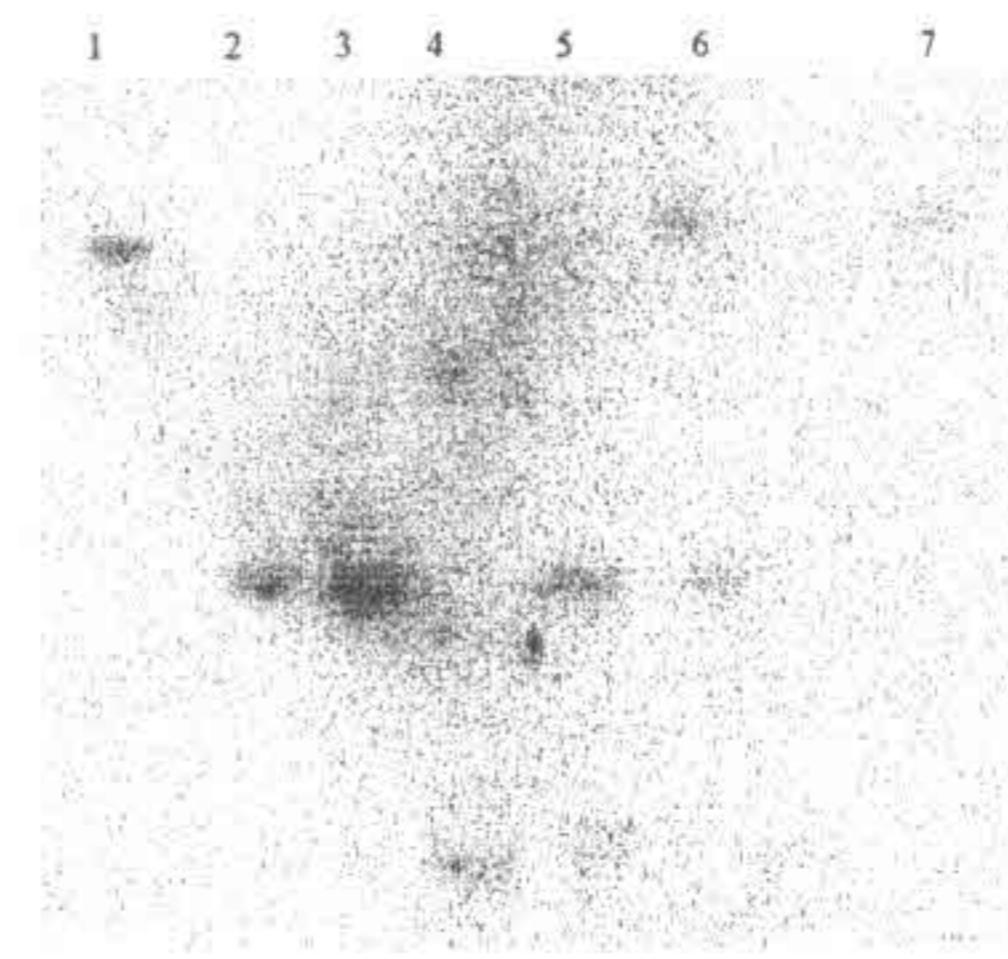


Рис. 3. Гибридизация по Саузерну геномных ДНК трансгенных растений и их гибридов. 1–4 – EcoRI-гидролизаты ДНК растений 49, 44, 45 и 41; 5–7 – EcoRI-гидролизаты ДНК F_1 -растений от скрещивания 45 × 41 и 44 × 49 (прямого и обратного) соответственно.

Нестабильность экспрессии перенесенных генов часто связывают с интеграцией нескольких копий трансгена как в один, так и в разные районы генома, тогда как моноинсерционные встройки более стабильны и являются предпочтительными при создании трансгенных растений (Cherdshewasart *et al.*, 1993; Flavell, 1994; Matzke M.A., Matzke A.J.M., 1995). На основании полученных нами результатов по анализу соотношений $K_m^+ : K_m^-$ -потомков у растений как с одной, так и с несколькими встроенными в разные группы хромосом Т-ДНК инсерциями можно заключить, что «далнейшая судьба» перенесенных генов определяется в

первую очередь особенностями отдельных событий интеграции фрагментов экзогенной ДНК. Так, при самоопылении трансформантов, несущих в геноме три и более встроек в разные группы хромосом, соотношение $K_m^+ : K_m^-$ -потомков соответствовало теоретически ожидаемым (табл. 2). Более того, у гибридов от скрещивания таких растений между собой, у которых число инсерций возрастает, нами не было выявлено ни одного случая полного инактивирования *nptII*-гена. Тогда как среди 50 прямых и обратных гибридных комбинаций, полученных от скрещивания моноинсерционных трансформантов, в 18 % случаев нами были зарегистрированы отклонения от mendelевского расщепления для дигибридных схем. Таким образом, инсерции трансгена могут происходить в такие области генома, где гетерологичные гены будут стабильно экспрессироваться и наследоваться даже при изменении в геноме числа гомологичных встроек. Если же встройки произойдут в район, в котором возможность инактивирования перенесенного гена (генов) будет повышена, то в дальнейшем с большей вероятностью будет происходить нарушение экспрессии перенесенных генов.

Таблица 2

Расщепления по гену *nptII* в первом и втором поколениях от самоопыления трансгенных растений табака

Номер растения	T ₁		T ₂	
	Расщепление		Расщепление	
	число растений $K_m^+ : K_m^-$	фактическое (теоретическое)*	число растений $K_m^+ : K_m^-$	фактическое (теоретическое)*
43	387 : 9	43,0 : 1 (63 : 1)	411 : 6	68,5 : 1 (63 : 1)
44	343 : 6	57,2 : 1 (63 : 1)	352 : 16	22,0 : 1 (≥ 15 : 1)
45	206 : 2	102,0 : 1 (≥ 63 : 1)	206 : 0	206,0 : 0 (≥ 63 : 1)
410	309 : 3	103,0 : 1 (≥ 63 : 1)	254 : 0	254,0 : 0 (> 63 : 1)
412	300 : 0	300,0 : 0 (> 63 : 1)	247 : 5	55,0 : 1 (63 : 1)
78	417 : 11	37,9 : 1 (63 : 1)	452 : 21	21,5 : 1 (15 : 1)
714	223 : 4	55,8 : 1 (63 : 1)	428 : 0	428,0 : 0 (> 63 : 1)

* Соответствие фактического расщепления теоретическому оценивалось критерием χ^2 , $\chi^2_{0,05} = 3,841$ (d.f. = 1).

2. Экспрессия *nptII*-гена у трансгенных растений табака с отклонениями от mendelевского наследования

Среди группы трансгенных растений с отклонениями от mendelевского наследования, выделенных при анализе случайной выборки независимо полученных трансформантов, особый интерес представляло растение Nu21, потомки которого на селективной среде с антибио-

тиком канамицином стабильно проявляли мозаичный фенотип. Однако среди потомков этого растения были выделены отдельные трансформанты, у которых доля растений с мозаичным фенотипом либо уменьшалась (Nu21/5), либо увеличивалась (Nu21/6) (табл. 3). Присутствие на форограмме двух близко расположенных полос у всех проанализированных потомков растения Nu21 во втором и третьем поколениях от их самоопыления (рис. 4) свидетельствовало о близком расположении двух инсерций в пределах одной хромосомы и их сцепленном наследовании. Таким образом, случайная интеграция гетерологичных генов в виде двух тесно сцепленных фрагментов Т-ДНК влияет на особенности проявления *nptII*-гена у растения Nu21.

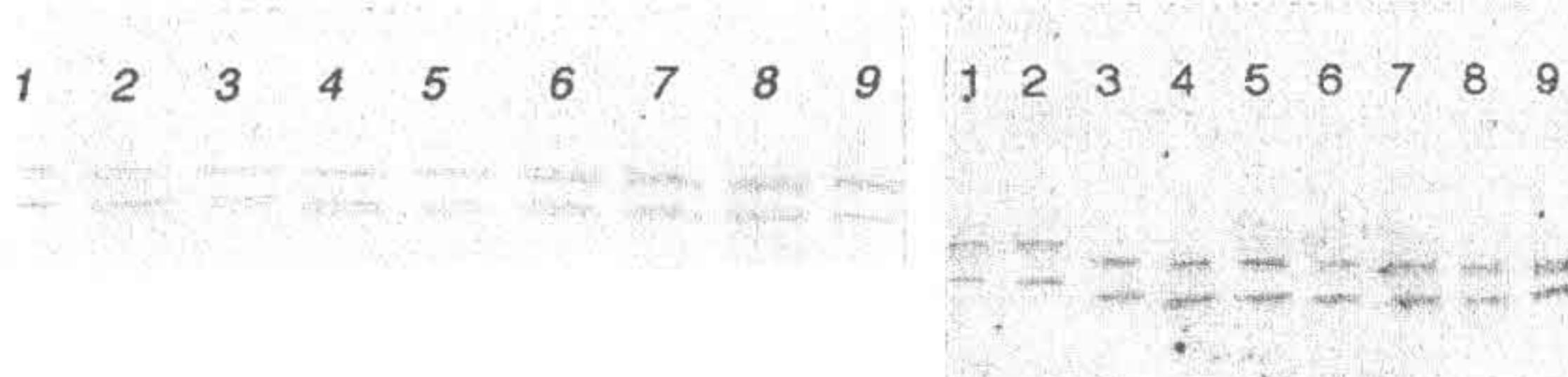


Рис. 4. Блот-гибридизация геномных ДНК трансгенных растений табака Nu21 с ^{32}P -меченым фрагментом гена *nptII*: потомки T₂ (слева) и потомки T₃ (справа).

3. Моделирование нестабильной экспрессии *nptII*-гена у трансгенных растений табака

Влияние дуплицированных фрагментов ДНК в районе встройки на стабильность экспрессии маркерного гена *nptII* оценивали у потомков от самоопыления независимо полученных трансформантов, у которых *nptII*-ген находился в «соседстве» с двумя генами *uidA*, представленными в виде тандемно сцепленных фрагментов в прямой и обратной ориентации в пределах Т-ДНК-инсерции.

Наличие дуплицированных фрагментов в составе Т-ДНК-инсерций приводило к снижению стабильного уровня экспрессии *nptII*-гена у созданных нами трансгенных растений табака уже в первом поколении от самоопыления исходных трансформантов (табл. 4). Доля потомков с нестабильным характером проявления анализируемого гена у растений с дупликацией по гену *uidA* (в обратной ориентации) составила 80,0 %. Среди растений с нестабильным уровнем экспрессии *nptII*-гена значительно возросла доля потомков с мозаичным фенотипом (61,3 % против 26,3 % в контроле). Необходимо подчеркнуть, что снижение стабильности экспрессии маркерного гена наблюдалось не у всех трансформантов с дуплицированным *uidA*-геном (в обратной ориентации): 20 % растений этой группы проявляли стабильный характер наследования *nptII*-гена (табл. 4). Вероятно, механизм,

Таблица 3

Анализ стабильности экспрессии *nptII*-гена у Т₂ и Т₃ потомков трансгенного растения табака Nu21

№ растения	число растений $K_m^+ : K_m^-$	T ₂			T ₃		
		Расщепление фактическое (теоретическое)*	% мозаиков	χ^2	№ растения	число растений $K_m^+ : K_m^-$	фактическое (теоретическое)*
Nu21/5	113 : 32	3,5 : 1 (3 : 1)	0	0,664*	Nu21/5-3	97 : 37	2,6 : 1 (3 : 1)
	140 : 64	2,2 : 1 (3 : 1)	0,7	4,418	Nu21/5-4	101 : 29	3,8 : 1 (3 : 1)
	156 : 51	3,1 : 1 (3 : 1)	0,6	0,014*		63 : 15	4,2 : 1 (3 : 1)
	298 : 135	2,2 : 1 (3 : 1)	0	8,814	Nu21/5-5	132 : 74	1,8 : 1 (3 : 1)
	113 : 40	2,8 : 1 (3 : 1)	1,8	0,107*		96 : 45	2,1 : 1 (3 : 1)
	187 : 56	3,3 : 1 (3 : 1)	0	0,495*	Nu21/5-6	89 : 37	2,4 : 1 (3 : 1)
Nu21/6	22 : 121	0,2 : 1 (3 : 1)	100	271,051	Nu21/6-1	150 : 54	2,4 : 1 (3 : 1)
	87 : 92	0,9 : 1 (3 : 1)	98,9	66,52		132 : 57	2,8 : 1 (3 : 1)
	156 : 23	6,8 : 1 (3 : 1)	97,4	14,095	Nu21/6-2	144 : 53	2,7 : 1 (3 : 1)
	142 : 141	1,0 : 1 (3 : 1)	99,3	93,005		116 : 49	2,4 : 1 (3 : 1)
	34 : 137	0,2 : 1 (3 : 1)	100	277,055	Nu21/6-3	96 : 36	2,7 : 1 (3 : 1)
	16 : 69	0,2 : 1 (3 : 1)	100	143,063	Nu21/6-4	103 : 34	3,0 : 1 (3 : 1)

* Фактическое расщепление соответствует теоретическому при $\chi^2_{\text{sl}0,05} = 3,841$ (d.f. = 1).

основанный на опознавании дуплицированных фрагментов в обратной ориентации, не универсален и, возможно, какие-либо дополнительные звенья его запускания и отсутствуют у выявленных трансгенных растений со стабильным уровнем экспрессии *nptII*-гена.

Таблица 4

Стабильность экспрессии маркерного гена *nptII* в потомстве от самоопыления исходных трансгенных растений табака

Уровень экспрессии гена <i>nptII</i>	Исходные трансгенные растения		
	№ 121 (контроль)	№ 16 (дупликация гена <i>uidA</i> в прямой ориентации)	№ 10 (дупликация гена <i>uidA</i> в обратной ориентации)
Стабильный	65,0	62,6	20,0
Нестабильный из них доля растений: – с мозаичным фенотипом; – с отклонениями от менделевского расщепления; – с полной потерей экспрессии трансгена	35,0 26,8 7,2 1,0	37,4 26,3 8,1 3,0	80,0 61,3* 16,0 2,7
Всего проанализировано растений	97	99	75

* Имеется достоверное различие с контролем.

Интересным дополнением к проявлению механизма инактивирования гетерологичных генов могут служить полученные нами данные по изучению экспрессии *nptII*-гена у гибридов от скрещивания трансформантов с дуплицированным *uidA*-геном (в прямой ориентации). Для получения гибридов использовали только те трансформанты, у которых соотношение $K_m^+ : K_m^-$ -потомков соответствовало 3 : 1. Присутствие в структуре Т-ДНК двух копий гена *uidA* в прямой ориентации у взятых для скрещиваний исходных родительских растений подтверждалось наличием в их геномной ДНК фрагмента длиной 1247 пар нуклеотидов (рис. 5). На основании сравнительного анализа двух групп F₁ растений установлено драматическое снижение стабильности экспрессии *nptII*-гена у гибридов с дуплицированным *uidA*-геном. Если в 126 прямых и обратных комбинациях скрещиваний у растений контрольной группы (табл. 5) отклонения от менделевского расщепления наблюдались только