

УДК 575.23:62.37.29

## АНАЛИЗ УРОВНЯ СТАБИЛЬНОСТИ РАЗВИТИЯ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА В ПЯТИ ПОКОЛЕНИЯХ

Ю.В. НУРМИНСКАЯ, Л.А. МАКСИМОВА, Т.В. КОПЫТИНА, А.Г. ЕНИКЕЕВ

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук»*

*664033 Иркутск, ул. Лермонтова, 132*

Изучены морфометрические признаки пяти поколений растений табака, трансформированных с использованием обезоруженного штамма *Agrobacterium tumefaciens* A699, несущего плазмиду CNL с селективным геном *nptII*, кодирующим белок неомицинфосфотрансферазу. Согласно оценке флуктуирующей асимметрии площади листовой пластинки, уровень стабильности развития трансформированных растений превышает таковой у нормальных растений, особенно у T<sub>4</sub>, имевших максимальные показатели роста и развития. Прослеживалась тенденция ослабления обнаруженного эффекта у поколения T<sub>5</sub>, у растений этого поколения наблюдали также увеличение числа корреляций между признаками.

*Ключевые слова:* *Nicotiana tabacum* L., трансгенез, стабильность развития, флуктуирующая асимметрия.

Риски неконтролируемого проникновения генетически модифицированных растений в природные экосистемы поднимают серьезную проблему оценки уровня стабильности их развития и способности к размножению в ряду поколений. Потенциальная угроза нарушения экологического равновесия в естественных популяциях уже становится реальной [14]. В связи с этим необходимо прогнозирование не только последствий генетического дрейфа чужеродных рекомбинантных молекул, но и подробное описание популяционных характеристик трансгенных организмов.

Генетическая трансформация способна приводить к разбалансировке коадаптированных генных комплексов, в связи с чем теоретически возможно увеличение популяционной изменчивости у генетически модифицированных организмов (ГМО) [3]. Одним из чувствительных параметров, позволяющих выявить дестабилизацию генома еще до того, как станут заметными внешние признаки неблагополучия в популяции (например, изменения в числе фенотипических отклонений), является оценка стабильности развития с помощью измерения флуктуирующей асимметрии билатеральных структур (ФА) [5]. Возрастание онтогенетического шума, приводящее к увеличению различия между признаком слева и справа, свидетельствует об определенном состоянии нестабильности на уровне генома. По выражению Захарова, стабильность развития дает возможность «оценить состояние популяции с онтогенетических позиций, оценить нормальность, совершенство процессов развития» [5]. В настоящее время в мировой литературе очень мало работ, посвященных изучению стабильности развития трансгенных растений в ряду поколений. Выяс-

нение этого вопроса дало бы важную информацию о процессах, происходящих в популяции трансформантов.

Цель настоящей работы — исследование уровня стабильности развития пяти семенных поколений растений табака *Nicotiana tabacum*, трансформированных с использованием обезоруженного штамма *A. tumefaciens* A699.

### Методика

Трансгенные растения *Nicotiana tabacum* L. (сорт Самсун) получали по стандартным протоколам [1] с использованием штамма *A. tumefaciens* A699 с вектором CNL и селективным геном *nptII*, кодирующим белок неомизинфосфотрансферазу. Отбор трансгенных линий проводили на средах с канамицином (100 мг/л). Интеграцию гена *nptII* у  $T_0$  подтверждали ПЦР-анализом [12].

Семена растений  $T_0$  были фертильными, что дало возможность получить семенные поколения  $T_1$ — $T_5$ . У растений всех поколений наличие экспрессии гена *nptII* подтверждали тестом на канамицинустойчивость, у растений поколений  $T_1$ ,  $T_2$  его интеграцию подтверждали также с помощью ПЦР-анализа. При постановке вегетационного опыта контрольные растения и растения пяти последовательных поколений трансгенных растений ( $T_1$ — $T_5$ ) выращивали одновременно в климатической камере Plant Master «CLF Plant Climatics» (Германия): дневная температура +25 °С, ночная +15 °С, продолжительность фотопериода — 16 ч.

По завершении вегетационного опыта (145 сут от посева) все листья, считая с седьмого, фиксировали в фиксаторе Кларка, затем фотографировали с масштабированием на стеклянной пластине в проходящем свете. С помощью графического редактора Image Pro Plus (version 4.5.0.29 for Windows Media Cybernetics Inc) измеряли площади левой и правой сторон листа. Погрешность измерения составляла 2,76 %. Интегральный показатель асимметричности площади листовой пластинки оценивали по методике [4].

Статистическую обработку результатов выполняли с помощью программ Excel 2007 (Microsoft Office) и Statistica 6.0. (StatSoft, Inc. 2001). Проводили описательную статистику (оценивали медиану, 25—75 % квартили, минимаксные значения). Данные представлены в виде диаграмм размаха («ящик—усы») [13]. Степень рассеивания определяли по величине межквартильного интервала. Достоверность отличий оценивали с помощью теста Уилкоксона ( $p < 0,05$ ). Наличие связи между признаками находили посредством коэффициента ранговой корреляции Спирмена  $r_s$  ( $p < 0,05$ ) [10].

### Результаты и обсуждение

Ранее установлено, что трансгенные растения табака, полученные с использованием обезоруженного штамма A699, по сравнению с контрольными растениями развивались более высокими темпами, формировали большую площадь общей листовой поверхности, зацветали раньше, имели более длинные стебли [12] (рис. 1, а—в). Эффект увеличения длины стебля и общей площади листьев, достигнув максимума у поколения  $T_4$ , снижался у растений поколения  $T_5$ .

Вычислен показатель ФА для листовой пластинки пяти последовательных поколений трансгенного табака (рис. 2). В целом трансгенные

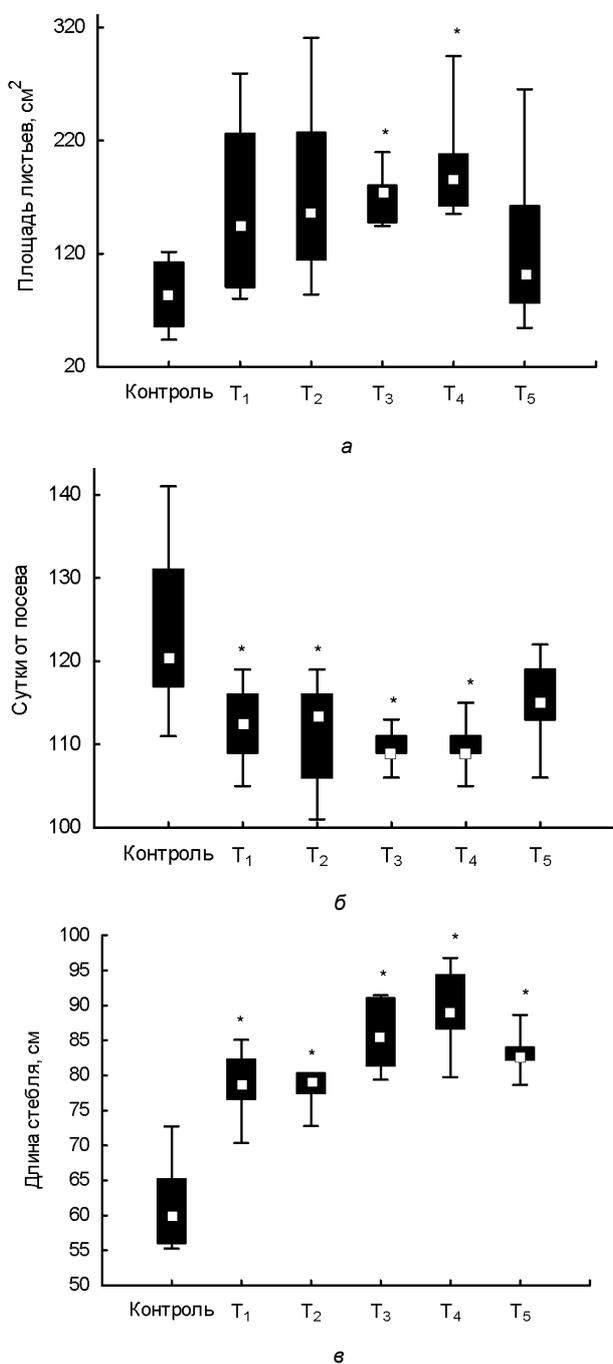


Рис. 1. Общая площадь листовой поверхности на 77-е сутки после посева (а), сроки начала цветения (б) и длина стебля (в) у нормальных и трансгенных растений табака. Звездочками обозначены варианты, достоверно отличающиеся от контроля ( $p < 0,05$ ;  $n = 6$ ). Указаны минимаксные значения, 25-я и 75-я процентиля

растения поколений T<sub>1</sub>—T<sub>4</sub> демонстрировали пониженный показатель флуктуирующей асимметрии. Следует отметить, что увеличение показателей роста у растений (длины стебля, общей площади листьев) коррелировало с уменьшением показателя ФА, что соответствовало снижению

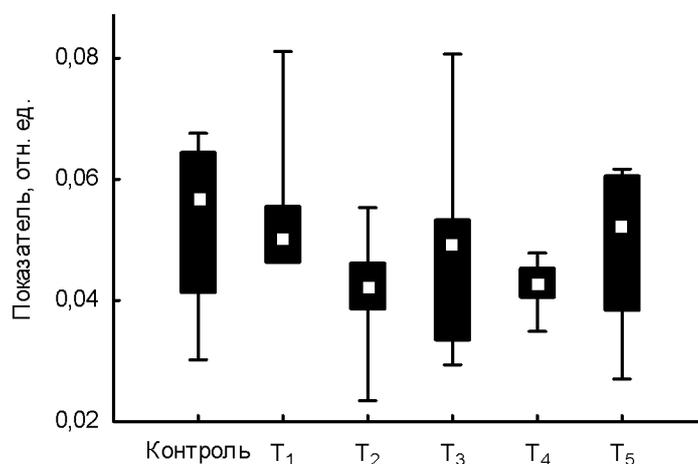


Рис. 2. Интегральный показатель асимметричности листовой пластинки у нормальных и трансгенных растений табака ( $n = 6$ )

уровня онтогенетического шума, и, тем самым, повышению стабильности развития.

Ранее нами была предложена концепция, рассматривающая *Agrobacterium*-опосредованную трансформацию как комплексный стресс-фактор. Физиологические последствия генетической трансформации в значительной степени могут быть обусловлены не только экспрессией целевого гена, но и самим фактом трансформации [2, 15]. Изменчивость генома при *Agrobacterium*-опосредованной трансформации может усугубляться тем, что в растительную клетку будут интегрироваться не только Т-ДНК, но и регуляторные элементы бактериальной ДНК, которые, встраиваясь в геном растения, влияют на его стабильность [7].

Поскольку интегрированная Т-ДНК содержала только селективный ген *nptII*, можно предположить, что зафиксированные изменения интенсивности процессов роста и развития, а также стабильности развития обусловлены непосредственно трансформационным стрессом, а не синтезом белка неомицинфосфотрансферазы.

Известно, что растения, как правило, реализуют не полностью свой потенциал, что связано прежде всего с действием неблагоприятных факторов среды [9]. Можно предположить, что трансформация стимулировала реализацию потенциала продуктивности у четырех поколений трансформантов.

Данные корреляционного анализа, проведенного по 12 признакам (в том числе длина стебля, общая площадь листьев, сроки цветения, длины органов цветка, количество плодов), свидетельствуют, что у растений пятого поколения число корреляций увеличивается:

Вариант	Число корреляций
Контроль	10
T <sub>1</sub>	8
T <sub>2</sub>	14
T <sub>3</sub>	7
T <sub>4</sub>	7
T <sub>5</sub>	18

Согласно результатам исследования Горбаня, рост числа корреляций между признаками организма может свидетельствовать о действии

на него некоего стресс-фактора (внутреннего или внешнего) [11]. Поскольку условия вегетационного опыта были максимально выровненными, с достаточной степенью уверенности можно предполагать наличие именно внутренних причин регистрируемых изменений.

Из приведенных данных следует, что при генетической трансформации растений табака с использованием обезоруженного агробактериального штамма значительно усиливаются процессы роста и развития, что сопровождается повышением стабильности развития, оцениваемой по степени ФА. Наблюдаемые эффекты имеют тенденцию к уменьшению в пятом поколении растений. В этом поколении также повышалась степень ФА одновременно с увеличением числа корреляций между признаками, что свидетельствует о возможном неблагополучии (физиологическом напряжении) у них.

Изменения ФА в ряду поколений наблюдалось нами ранее и у трех поколений растений гороха, трансформированных с помощью агробактериального штамма A281. Т-ДНК в данном случае не содержала ни целевых, ни маркерных генов. Уровень стабильности развития этих растений понижался от поколения к поколению одновременно со снижением всхожести семян [6].

Согласно модели, предложенной Животовским, в случае попадания ГМ-растений в природную популяцию вследствие переопыления разбалансировка коадаптированных генных комплексов и вызванное ею увеличение изменчивости признаков могут усилить действие на аборигенную популяцию стабилизирующего отбора [3].

Явного и значительного увеличения изменчивости трансформантов в наших экспериментах не обнаружено, онтогенетический шум у поколений  $T_1$ — $T_4$  был выражен в меньшей степени. Однако вследствие стимуляции ростовых процессов, вызванной генетической трансформацией, первые несколько поколений трансформированных особей при благоприятных условиях среды могут оказаться серьезными конкурентами за ресурсы для представителей природной популяции. Вследствие этого повышается вероятность распространения в геноме аборигенной популяции чужеродной генетической конструкции с одновременным вытеснением из нее форм с исходным генотипом.

Результаты выполненных исследований свидетельствуют о том, что у последующих поколений трансформантов могут возникать признаки неблагополучия.

Как и любой живой организм, растение можно рассматривать как неравновесную открытую систему. По мнению Пригожина, флуктуации в такой системе усиливаются по мере приближения к точке бифуркации, после прохождения которой система либо переходит в новое устойчивое состояние, либо разрушается [8].

Таким образом, ГМ-растения в цепочке семенных поколений способны пройти через ряд неустойчивых состояний, приобретя в итоге новые свойства и сохранить свое присутствие в экосистеме. Если же преодоление критического состояния для популяции трансгенных растений окажется невозможным и уровень плодовитости не сможет компенсировать действие стабилизирующего отбора, существование этой популяции в экосистеме может оказаться под угрозой. Вопрос о том, как эти события отразятся на состоянии фитоценоза и балансе всей экосистемы, остается открытым.

Следует учитывать, что ответ растения на генетическую трансформацию зависит от его генотипа, более того, этот ответ неодинаков даже

внутри вида. Каждый случай трансформации — уникален. Хотя полученные данные не дают полной картины о стабильности трансгенных растений, выявленные изменения в ряду поколений представляют интерес, поскольку отражают микроэволюционные процессы, происходящие в данной популяции трансгенных растений, и, таким образом, вносят вклад в понимание механизмов поддержания стабильности генома при внедрении чужеродной ДНК и в конечном итоге — поддержания популяционного гомеостаза.

Исследования проведены с использованием приборов Центра коллективного пользования ИНЦ СО РАН.

1. Дрейпер Дж., Скот Р., Армидж Ф., Уолдена Р. Генетическая инженерия растений: Лаб. руководство. — М.: Мир, 1991. — 408 с.
2. Еникеев А.Г., Копытина Т.В., Семенова Л.А. и др. Агробактериальная трансформация как биотический стрессорирующий фактор // Журн. стресс-физиологии и биохимии растений. — 2008. — 4, № 1. — С. 11—15.
3. Животовский Л.А. Стабилизирующий отбор и приспособленность популяций ГМО // ГМО — скрытая угроза России. — М.: ОАГБ, ЦЭПР, 2004. — С. 93—104.
4. Захаров В.М., Баранов А.С., Борисов В.И. и др. Здоровье среды: методика оценки. — М.: Центр экол. политики России, 2000. — 68 с.
5. Захаров В.М. Онтогенез и популяция: оценка стабильности развития в природных популяциях // Онтогенез. — 2001. — 32, № 6. — С. 404—421.
6. Нурминская Ю.В., Семенова Л.А., Окунь О.В. и др. Изучение степени асимметрии как показателя стрессового статуса трансгенных растений гороха в трех поколениях // Устойчивость организмов к неблагоприятным факторам внешней среды. Материалы Всерос. науч. конф., 24—29 авг. 2009. — Иркутск: НЦ РВХ ВСНЦ РАН, 2009. — С. 418—420.
7. Пермякова Н.В., Шумный В.К., Дейнеко Е.В. Агробактериальная трансформация растений: перенос фрагментов векторной ДНК в растительный геном // Генетика. — 2009. — 45, № 3. — С. 305—317.
8. Пригожин И., Стенгерс И. Порядок из хаоса: Новый диалог с природой. — М.: Прогресс, 1986. — 432 с.
9. Boyer J.S. Plant productivity and environment // Science. — 1982. — 218. — P. 443—448.
10. Glantz S.A. Primer of biostatistics. — New York: McGraw-Hill Professional, 1999. — 89 p.
11. Gorban A.N., Smirnova E.V., Tyukina T.A. General laws of adaptation to environmental factors: from ecological stress to financial crisis // Math. Model. Nat. Phenom. — 2009. — 4, N 6. — P. 1—53.
12. Maximova L.A., Nurminskaya J.V., Kopytina T.V., Enikeev A.G. Agrobacterium-mediated transformation of *Nicotiana tabacum* by disarmed strain At 699 resulted in considerable raising of growth and development of transgenic plants // J. Stress Physiol. and Biochem. — 2012. — 8, N 1. — P. 138—148.
13. McGill R., Tukey J.W., Larsen W.A. Variations of box plots // Amer. Statistician. — 1978. — 32, N 1. — P. 12—16.
14. Wegier A., Pineyro-Nelson A., Alarcon J. et al. Recent long-distance transgene flow into wild populations conforms to historical patterns of gene flow in cotton (*Gossypium hirsutum*) at its centre of origin // Mol. Ecol. — 2011. — 20, N 19. — P. 4182—4194.
15. Zhivotovsky L.A. Environmental stress and evolution: A theoretical study // Environmental Stress, Adaptation, and Evolution / R. Bijlsma and V. Loeschcke (eds.). — Basel: Birkhaeuser Verlag, 1997. — P. 241—254.

Получено 24.05.2013

#### АНАЛІЗ РІВНЯ СТАБІЛЬНОСТІ РОЗВИТКУ ТРАНСГЕННИХ РОСЛИН ТЮТЮНУ В П'ЯТИ ПОКОЛІННЯХ

Ю.В. Нурмінська, Л.А. Максимова, Т.В. Копитіна, А.Г. Єнікеев

Федеральна державна бюджетна установа науки «Сибірський інститут фізіології і біохімії рослин Сибірського відділення Російської академії наук», Иркутськ

Вивчено морфометричні ознаки п'яти поколінь рослин тютюну, трансформованих із використанням беззброєного штаму *Agrobacterium tumefaciens* A699, що несе плазмиду CNL із

селективним геном *nptII*, який кодує білок неоміцинофосфотрансферазу. Згідно з оцінкою флуктуаційної асиметрії площі листкової пластинки, рівень стабільності розвитку трансформованих рослин вищий, ніж у нормальних рослин, особливо в  $T_4$ , що мали максимальні показники росту і розвитку. Простежувалась тенденція ослаблення виявленого ефекту в покоління  $T_5$ , у рослин цього покоління спостерігали також збільшення числа кореляцій між ознаками.

#### THE DEVELOPMENTAL STABILITY OF FIVE SUCCESSIVE GENERATIONS OF TRANSGENIC TOBACCO PLANTS

*Y.V. Nurminskaya, L.A. Maximova, T.V. Kopytina, A.G. Enikeev*

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences  
132 Lermontov St., Irkutsk, 664033, Russia

Some morphometric characteristics of the development of successive  $T_1$ – $T_5$  generations of *Nicotiana tabacum* L. transformed by *Agrobacterium tumefaciens* strain A699 with gene *nptII* only were investigated. First T-generations demonstrated increasing of developmental stability but then tended to decrease: this effect was less expressed for generation  $T_5$  plants. The generation  $T_4$  plants had maximal rate of developmental stability, simultaneously they had maximal values of morphometric parameters. We observed the increasing of the correlations number among traits of the generation  $T_5$  plants.

*Key words:* *Nicotiana tabacum* L., transgenesis, developmental stability, fluctuating asymmetry.