

balance of flowering plants shifts towards "male" individuals. Relatively dry conditions of the previous before the flowering year led to the fact that in the following year the populations featured a relative balance of flowering for "male" and "female" individuals. Under the adverse conditions of drought "female" items get eliminated from the population first. **Conclusions.** *A. dioica* populations at the northern and southern boundaries of the range behave as amfimictic, while in the central part of the area – as facultatively apomictic. The ratio of flowering of "female" and "male" individuals in the populations of this species is essentially dependent on the latitude and weather conditions.

*Key words:* *Antennaria dioica*, gametophytic apomixis, dioecious, sex structure of populations.

УДК 575.23:62.37.29

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

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,

Россия, 664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132, e-mail: nurminskaya@sifibr.irk.ru

### УСТОЙЧИВОСТЬ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА К НЕБЛАГОПРИЯТНОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ В РЯДУ ПОКОЛЕНИЙ

С развитием сельскохозяйственного применения ГМР активно ведутся исследования об экологических рисках, связанных с возделыванием этих культур. Выяснилось, что существует угроза рисков снижения биологического разнообразия в связи с переопылением ГМР с дикорастущими близкородственными видами [1]. Возможность необратимого изменения диких популяций, несомненно, требует всестороннего изучения, так как последствия таких изменений необратимы.

Для разработки подходов к безопасному применению трансгенных растений необходимы знания об особенностях физиологии и биохимии ГМР как новой искусственно созданной биологической системы.

Механизмы встраивания, копияность и наследование вставки молекулярными биологами изучены достаточно детально, однако эти исследования, к сожалению, не позволяют увидеть реакцию растения на внедрение в свой геном чужеродной ДНК в целом, как единого организма.

На данный момент предпринято несколько попыток гипотетически обрисовать особенности физиологии трансгенного растения.

Так, Еникеев А.Г. с соавторами предложили концепцию агробактериальной трансформации как комплексного стресс-сигнализирующего фактора [2].

Известно, что воздействие стрессовых факторов приводит к увеличению рекомбинаций и количества мутаций, к усилению онтогенетического шума [3, 4]. Это приводит к

увеличению различий между величиной признака у билатеральных структур с правой и с левой стороны (флуктуирующая асимметрия, ФА) [4].

Жученко А.А. предполагал, что вставка ДНК может приводить к нарушению работы коадаптированных генных комплексов. Эти комплексы, сформированные в процессе эволюции, выполняют важную роль в процессах адаптации у растений [5]. Косвенным признаком разбалансировки коадаптированных комплексов генов у трансгенных растений может служить снижение устойчивости к неблагоприятным факторам.

Таким образом, изучение уровня флуктуирующей асимметрии у трансформантов, а также их устойчивости к неблагоприятным факторам могло бы дать первичные экспериментальные данные об особенностях таких растений на уровне физиологии.

Целью настоящей работы было исследовать изменчивость морфометрических параметров и величину ФА у растений *Nicotiana tabacum* L., трансформированных агробактериальным штаммом А699 (без целевых генов) в ряду семенных поколений в нормальных условиях и в условиях пониженной и повышенной температуры.

#### Материалы и методы

Трансгенные растения табака (сорт Самсун) получали по стандартным протоколам [6] с использованием штамма *Agrobacterium tumefaciens* А699, содержащего вектор CNL 65 с селективным геном *nptII*, кодирующим белок неомицинофосфотрансферазы. Отбор трансген-

ных линий проводили на средах с канамицином (100 мг/л). Интеграцию гена *nptII* у  $T_0$  подтверждали ПЦР-анализом [7].

Семена растений  $T_0$  были фертильными, что дало возможность получить семенные поколения  $T_1$ - $T_6$ . У растений всех поколений экспрессию гена *nptII* подтверждали тестом на канамицинустойчивость, у растений поколений  $T_1$ ,  $T_2$  интеграцию гена подтверждали также с помощью ПЦР-анализа.

При постановке вегетационного опыта контрольные и трансгенные растения выращивали одновременно в климатической камере фитотрона. По завершении вегетационного опыта все листья, фиксировали в фиксаторе Кларка, а 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. Ошибка измерения составляла 2,76 %. Интегральный показатель асимметричности площади листовой пластинки оценивали по методике, предложенной Захаровым [8].

Статистическую обработку результатов выполняли при помощи программ Excel 2007 (Microsoft Office) и Statistica 6.0. (StatSoft, Inc. 2001). Проводилась описательная статистика (оценивались медиана, 25–75 % квартили, минимаксные значения). Данные представляли в виде диаграмм размаха («ящик-усы») [9]. Степень рассеивания определяли по величине межквартильного интервала. Достоверность отличий оценивали с помощью теста Манна-Уитни ( $p < 0,05$ ).

### **Результаты и обсуждение**

У трансгенных растений в нормальных условиях параметры общей площади листовой поверхности и сухой массы надземной части менялись в поколениях, сначала несколько увеличиваясь к  $T_4$ , а затем уменьшаясь в  $T_5$ . Длина стебля постепенно уменьшалась в ряду поколений. В  $T_6$  снова наблюдали некоторое увеличение вегетативных параметров (рис. 1–3).

Росшие в условиях повышенной температуры растения табака выглядели более мощными. При этом они не формировали цветонос тогда, когда растения, росшие при температуре +25 °С, уже начали подготовку к вступлению в генеративную фазу развития. В целом как контрольные растения, так и

трансформанты при температуре +35 °С имели большую чем при нормальной температуре высоту стебля и площадь листьев. Значения таких параметров, как площадь всех листьев и сухая масса были наименьшими у  $T_4$ .

В условиях низкой температуры растения формировали характерную биоморфу – короткий стебель с розеткой мелких листьев. Параметры трансформантов были понижены по сравнению с контролем и имели тенденцию к снижению в поколениях. Самыми низкими значениями вегетативных параметров при +15 °С имели растения  $T_5$  и  $T_6$ .

Результаты вычисления величины ФА для растений представлены на рис. 4. Следует отметить, что ни в одном случае не было выявлено статистически достоверного отличия от контроля. В связи с этим можно лишь отметить, что в результате стрессового воздействия наблюдали некоторое увеличение онтогенетического шума и, как следствие, снижение уровня стабильности развития у всех растений при +15 °С. Из них наименьшим уровнем обладали растения  $T_5$  и  $T_6$ . Интересно, что растения этих поколений имели повышенные значения ФА и в условиях роста при +25 °С.

Отсутствие увеличения флуктуирующей асимметрии у растений, росших при температуре +35 °С, и увеличение у них ростовых параметров говорит о том, что растения табака достаточно устойчивы к такому повышению температуры: она не сказывается на росте растений.

Однако такая повышенная температура всё же не являлась оптимальной для роста и развития табака. Об этом свидетельствует не только то, что при такой температуре растения длительное время не вступали в генеративную фазу. У контрольных и трансформированных растений табака наблюдали увеличение изменчивости средних значений ФА при +35 °С (рис. 4). Такое же увеличение изменчивости наблюдали и при стрессе, вызванном гипотермией. Увеличение изменчивости этих значений, по нашему мнению, может быть признаком нестабильной работы генома, вызванной неоптимальными условиями среды.

Таким образом, изучение параметров у нормальных и шести поколений трансгенных растений табака, находившихся в различных температурных условиях, показало, следующее.

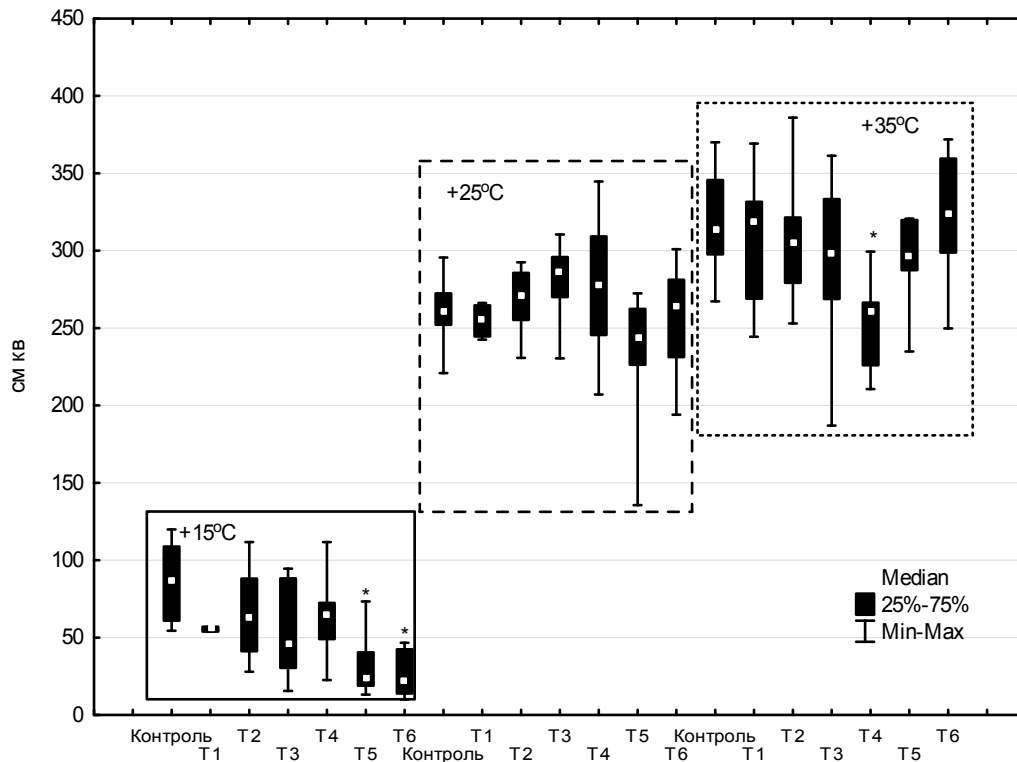


Рис. 1. Общая площадь листовой поверхности у нормальных и трансформированных растений табака, выращенных при разных температурных условиях. N = 6. Здесь и далее астерисками (\*) отмечены достоверно отличающиеся от контроля варианты ( $p < 0,05$ )

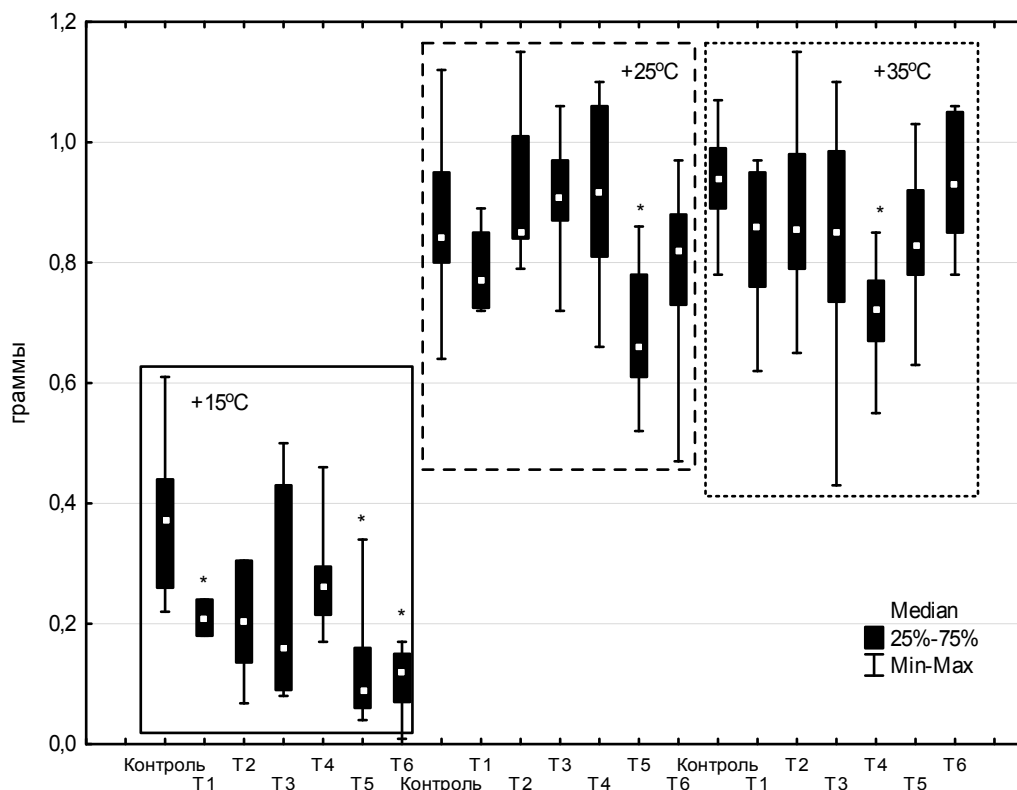


Рис. 2. Сухая масса наземной части у нормальных и трансформированных растений табака, выращенных при разных температурных условиях

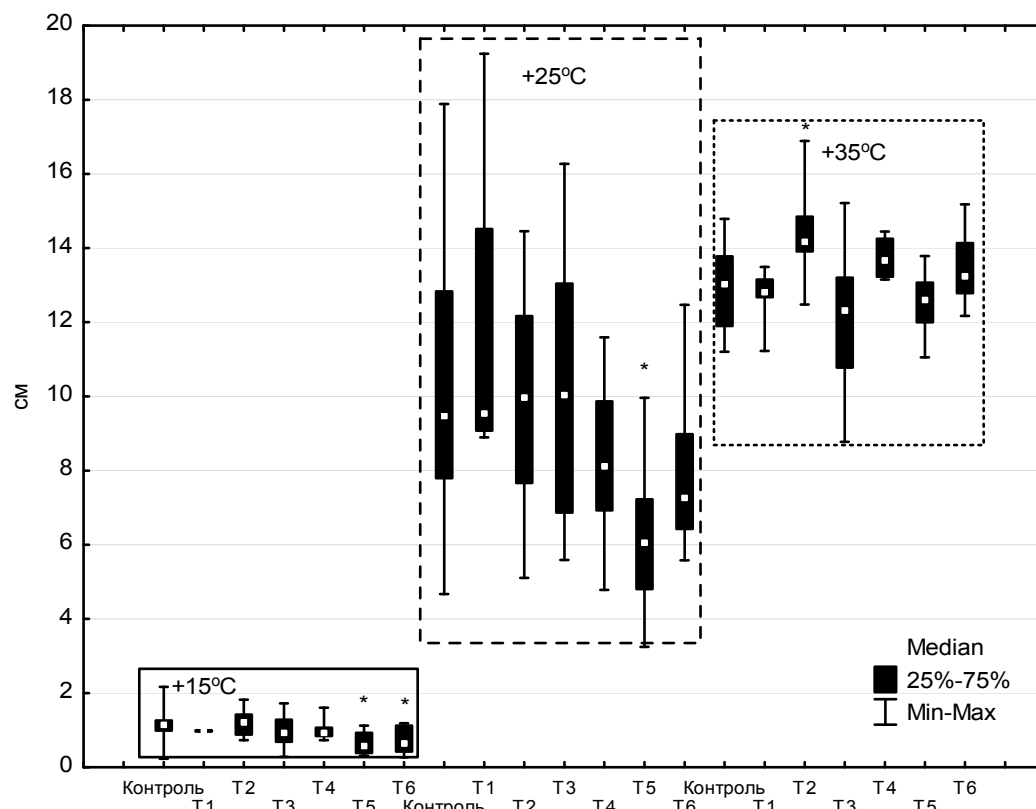


Рис. 3. Длина стебля у нормальных и трансформированных растений табака, выращенных при разных температурных условиях

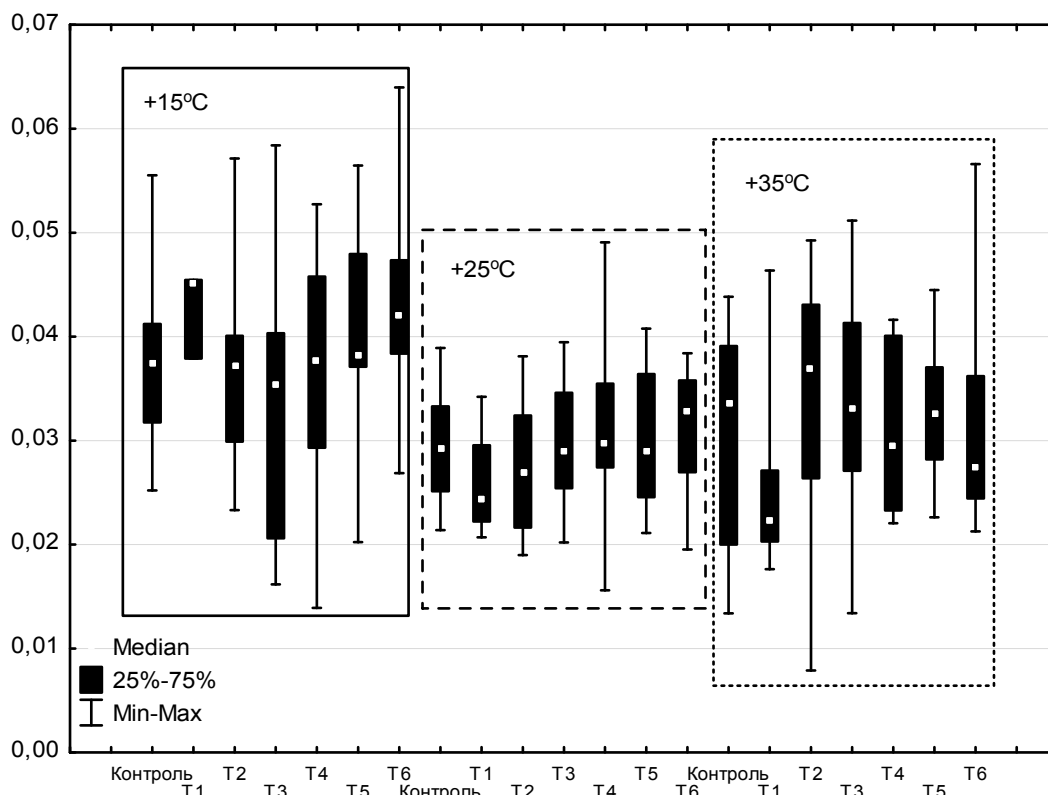


Рис. 4. Интегральный показатель флуктуирующей асимметрии у нормальных и трансформированных растений табака, выращенных при разных температурных условиях

Растения табака, трансформированные генетической конструкцией, не имевшей целевого гена, в целом (за исключением T<sub>4</sub>) были устойчивы к повышенной температуре, но демонстрировали пониженную устойчивость к низкой положительной температуре по сравнению с контрольными растениями. При этом достоверных отличий уровня стабильности развития не было обнаружено.

Исходя из вышеприведённых данных, можно сделать вывод, что факт трансформации негативно отразился на адаптивном потенциале растений. Это может косвенно свидетельствовать о нарушении работы коадаптированных комплексов генов. Нужно заметить, что у изученных трансгенных растений даже у T<sub>6</sub> не наблюдается восстановления нормальной работы генома.

Очевидно, что стабильность популяции трансгенных растений может быть достигнута только с восстановлением стабильности работы комплексов генов. То, что это возможно, доказывает существование в природе видов растений (виды *Nicotiana* и *Linaria*), геном которых в результате горизонтального переноса генов содержит последовательности Т-ДНК *Agrobacterium rhizogenes* [10]. Однако скорость

восстановления стабильности работы генома после трансформационных событий остаётся неизвестной.

#### Выводы

1. Выявили, что при пониженной (+15 °С) температуре трансгенные растения табака имели сниженные показатели вегетативных параметров по сравнению с контрольными растениями, причём в ряду поколений эти параметры понижались и были минимальными у T<sub>6</sub>. Достоверных отличий величин параметров у растений, росших при +35 °С, не выявили.

2. При вычислении величины ФА не обнаружили статистически значимых отличий между трансформантами и контролем ни в одной исследуемой группе. Однако отметили несколько повышенные значения ФА у растений T<sub>5</sub>, T<sub>6</sub>, росших при (+15 °С и имевших наиболее низкие величины фенотипических признаков.

3. Предположили, что снижение устойчивости к пониженной температуре может косвенно свидетельствовать о нарушении работы коадаптированных генных комплексов у трансгенных растений.

*В работе использовалось оборудование ЦКП Фитотрон СИФИБР СО РАН.*

#### Литература

1. Wegier A., Piceyro-Nelson A., Alarcyn J., Galvez-Meriscal A., Alvarez-Buylla E.R., Picero D. Recent long-distance transgene flow into wild populations conforms to historical patterns of gene flow in cotton (*Gossypium hirsutum*) at its centre of origin. // *Molecular Ecology*. – 2011. – 20, № 19 – P. 4182–4194.
2. Еникеев А.Г., Копытина Т.В., Семёнова Л.А., Натяганова А.В., Гаманец Л.В., Волкова О.Д. Агробактериальная трансформация как биотический стрессирующий фактор [Электронный ресурс] // *Журнал стресс-физиологии и биохимии растений*. – 2008. – 4, № 1. – С. 11–15. – Режим доступа: [http://www.jspb.ru/issues/2008/N1/JSPB\\_2008\\_1\\_11-19](http://www.jspb.ru/issues/2008/N1/JSPB_2008_1_11-19).
3. Жученко А.А. Экологическая генетика культурных растений и проблемы агросферы (теория и практика). – М.: ООО «Издательство «Агрорус», 2004. – I. – 690 с.
4. Захаров В.М. Онтогенез и популяция: оценка стабильности развития в природных популяциях // *Онтогенез*. – 2001. – 32, № 6. – С. 404–421.
5. Жученко А.А. Роль генетической инженерии в адаптивной системе селекции растений (мифы и реалии) // *Сельскохозяйственная биология*. – 2003. – № 1. – С. 3–33.
6. Дрейпер Дж., Скот Р., Армидж Ф., Уолдена Р. Генетическая инженерия растений. Лабораторное руководство. – М.: Мир, 1991. – 408 с.
7. 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 [Электронный ресурс] // *Journal of Stress Physiol. and Biochem.* – 2012. – 8, № 1. – P. 138–148. – Режим доступа: [http://www.jspb.ru/issues/2012/N1/JSPB\\_2012\\_1\\_138-148.html](http://www.jspb.ru/issues/2012/N1/JSPB_2012_1_138-148.html)
8. Захаров В.М., Баранов А.С., Борисов В.И., Валецкий А.В., Кряжева Н.Г., Чистякова Е.К., Чубинишвили А.Т. Здоровье среды: методика оценки. – М.: Центр эколог. Политики России, 2000. – 68 с.
9. McGill R., Tukey J.W., Larsen W.A. Variations of Box Plots // *The American Statistician*. – 1978. – 32, № 1. – P. 12–16.
10. Matveeva T.V., Bogomaz D.I., Pavlova O.A., Nester E.W., Lutova L.A. Horizontal gene transfer from genus *Agrobacterium* to plant *Linaria* in nature // *МРМИ*. – 2012. – 25, № 12. – P. 1542–1551.

**NURMINSKAYA Y.V., MAXIMOVA L.A., KOPYTINA T.V. ENIKEEV A.G.**

*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,*

*Russia, 664030, Irkutsk, Lermontov str., 132, e-mail: nurminskaya@sifibr.irk.ru*

#### **THE ADAPTATION ABILITY LEVEL OF SIX GENERATIONS OF TRANSFORMED TOBACCO PLANTS TO ADVERSE TEMPERATURE**

**Aims.** Were assessed the fluctuating asymmetry level and morphometric parameters of tobacco plants, transformed by gene *ntpII*. Plants were grown under normal (+25 °C) and extremal (+15 °C, +35 °C) conditions. **Methods.** The level of fluctuating was estimated how a difference between left and right halves of the leaf. **Results.** Transgenic plants were more low temperature-sensitive than control ones, these plants demonstrated decreased morphometric parameters and raised fluctuating asymmetry level, T<sub>5</sub> and T<sub>6</sub> generations particularly. **Conclusions.** Coadapted gene complexes are the base of organism adaptation. Low rate of stress adaptation ability of transgenic plants can be the result of transformation procedure, which had perturbed gene complexes work.

**Key words:** transgenesis, tobacco, adaptation ability.

**УДК 575.174.015.3:582.475.2**

**ОРЕШКОВА Н.В., СЕДЕЛЬНИКОВА Т.С., ПИМЕНОВ А.В., ЕФРЕМОВ С.П.**

*ФГБУН Институт леса им. В.Н. Сукачева Сибирского отделения РАН,*

*Россия, 660036, г. Красноярск, Академгородок, 50/28, e-mail: tss@ksc.krasn.ru*

#### **ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ БОЛОТНЫХ И СУХОДОЛЬНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ *PINUS SIBIRICA* ПО ДАННЫМ SSR-МАРКЕРОВ**

Сосна кедровая сибирская (*Pinus sibirica* Du Tour) является одним из основных лесообразующих видов во многих районах Западной Сибири, где кедровые леса занимают 7667 тыс. га, или около 24 % всей площади хвойных лесов [1]. В Западной Сибири *P. sibirica* произрастает на суходолах, включая припоселковые насаждения, а также является типичным представителем болотных и заболоченных экотопов, занимая разнообразные по трофности местообитания. Вопросам дифференциации популяций *P. sibirica* в болотных и суходольных условиях произрастания посвящены лишь несколько работ [2–4]. Полученные к настоящему времени данные оставляют ряд вопросов относительно экотопической дивергенции болотных и суходольных популяций сосны кедровой сибирской и их возможной генетической дифференциации. В настоящей работе приводятся данные по оценке генетической изменчивости, структуре и дифференциации популяций *P. sibirica*, произрастающих в болотных и суходольных экотопах южно-таежной подзоны Западной Сибири, основанные на исследовании полиморфизма ДНК с использованием SSR-маркеров ядерного генома.

#### **Материалы и методы**

Объектами исследования послужили выборки из 4 популяций сосны кедровой сибирской, произрастающих в южно-таежной подзоне Западной Сибири (Томская область): междуречье Иксы и Яри, суглинистый суходол, кедровник елово-пихтовый низкотравно-зеленомошный (56°54г.ш., 83°04г.д.); пос. Мельниково, супесчаный суходол, припоселковый кедровник осочково-разнотравный (56°33г.ш., 84°04г.д.); долина р. Жуковка, евтрофное болото, кедровник елово-лиственнично-пихтовый разнотравно-гипновый (56°20г.ш., 84°34г.д.); Междуречье Иксы и Бакчара, олиготрофное болото, сосняк сфагново-кустарничково-пушицевый в сочетании с куртинами и одиночными деревьями кедра (56°53г.ш., 82°40г.д.).

Индивидуальные препараты тотальной ДНК выделены из 100–200 мг высушенной хвои, собранной с 30 деревьев в каждой из 4 популяций (всего 120 образцов). Выделения проводили по протоколу для растительных тканей с применением цетилтриметиламмонийбромидом (СТАВ-метод) [5]. В качестве генетических маркеров в работе использовали ядерные микросателлитные локусы. Выделенную ДНК использовали для