

УДК 577.218

СОЗДАНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ МЕТОДОМ ПОГРУЖЕНИЯ ЦВЕТКОВ И ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ПЕРЕДАЧИ ТРАНСГЕНОВ ОТ РАПСА К РОДСТВЕННЫМ РАСТЕНИЯМ

Е.В. Михайлова¹, А.М. Денисов²

¹*Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа, Россия*

²*Башкирский государственный университет, Уфа, Россия, mikhele@list.ru*

Эффективность метода погружения цветков составила 10% для рапса, 2% для эруки и 1.4% для амаранта. Частота гибридизации с близкородственными видами была выше при использовании рапса, растущего как рудеральное растение.

Ключевые слова: погружение цветков, floral dip, *Brassica napus*, *Brassica rapa*, *Brassica juncea*, *Eruca sativa*, *Amaranthus retroflexus*, трансгенные растения.

Генная инженерия является наиболее перспективным способом повышения продуктивности сельскохозяйствен-

ных культур. При этом появляются все новые, более эффективные и простые способы создания генетически мо-

дифицированных растений, одним из которых является метод погружения цветков (floral dip) [Li et al., 2010]. Однако при создании генетически модифицированных растений необходимо учитывать экологические риски [Warwick et al., 2009], из которых наиболее заслуживающим внимания является риск вертикального переноса генов к нетрансгенным растениям в дикой природе и агроэкосистемах. Наиболее перспективными в плане экологической безопасности представляются ГМ-сорты с новыми признаками, не дающими эволюционных преимуществ, например, сорта растений, продуктивность которых повышается благодаря улучшению параметров роста за счет изменения уровня экспрессии генов, участвующих в регуляции клеточного деления и растяжения. Для этого можно использовать гены белков с OSR-доменом. Например, ген *ARGOS-LIKE (ARL)* растения *Arabidopsis thaliana* кодирует трансмембранный белок, участвующий в передаче сигналов от фитогормонов к генам – преимущественно от брассиностероидов на ген *TCH4 (AtXTH22)*, кодирующей одну из ксилоглюканэндотрансгликозилаз *A. thaliana*. В свою очередь, ксилоглюканэндотрансгликозилазы принимают участие в обеспечении растяжения клеточной стенки при росте клеток. Сверхэкспрессия этого гена способствует увеличению размеров надземных органов растений за счет положительного влияния на рост клеток растяжением [Кулуев и др., 2013].

Была создана генно-инженерная конструкция на основе бинарного вектора pCambia 1301 с геном устойчивости к гигромицину, содержащая промотор вируса мозаики георгина, сайт полиаденилирования 35S PHK вируса мозаики цветной капусты и целевой ген *ARGOS-LIKE A. thaliana*. Для трансформации использовали хозяйственно-ценные растения: *Brassica napus* (рапс), *Eruca sativa* (эрука посевная) и *Amaranthus rethroliflexus* (амарант). Трансформацию осуществляли начиная с момента перехода к стадии бутонизации и до наступления периода интенсивного цветения. Соцветия растений погружали в суспензию агробактерий с добавлением 0.075 мкМ ацетосирингона, 0.1–0.2% силвета, 100 нг/л 6-БАП и 30г/л сахарозы. Затем соцветия оборачивались полиэтиленовой пленкой на сутки. После созревания семян осуществлялся их ручной сбор. Семена проращивали в климатикамуре при температуре 23 °С с освещенностью 5 клк и фотопериодом 16/8 часов (свет/темнота), предварительно подвергнув их обработке селективным антибиотиком гигромицином в концентрации 100–500 мг/л в течение суток. У нетрансгенных проростков наблюдалось побеление первых настоящих листьев. Наиболее эффективной оказалась трансформа-

ция и отбор проростков рапса сортов «Рагник» и «Нанпа»: трансгенными оказывались в среднем 10% семян, точность отбора составила 89%. Традиционными методами для этих сортов удалось трансформировать только 1–2% эксплантов. Эффективность трансформации *E. sativa* методом погружения цветков составила 2%. Эффективность трансформации *A. rethroliflexus* составила 1.4%, при этом у данного вида воздействие селективного антибиотика проявлялось слабо, и точность визуального отбора составила лишь 20%.

Таким образом, метод погружения цветков наилучшим образом подходит для трансформации рапса. Однако при создании его трансгенных сортов следует учитывать, что как сорные, так и культурные родственники рапса, размножающиеся перекрестным опылением, встречаются повсеместно. Более того, потери семян при транспортировке могут приводить к образованию свободноживущих популяций трансгенных растений по краям дорог [Warwick et al., 2009]. В многочисленных зарубежных исследованиях была показана возможность образования плодородных жизнеспособных гибридов рапса и родственных видов *Brassica rapa* и *Brassica juncea*, а также сохранения устойчивости к гербицидам у нескольких поколений потомков трансгенных гибридов даже при отсутствии селективного давления. Тем не менее, в России такие исследования никогда не проводились.

Поскольку рапс может произрастать не только в агроэкосистемах, но и в качестве рудерального растения, возможность вертикального переноса трансгенов к родственным растениям была изучена нами на двух экспериментальных участках, которые различались по количественному соотношению трансгенного рапса и нетрансгенных растений, а также расстоянием между группами растений.

Следует отметить, что частота гибридизации созданных нами трансгенных растений рапса и нетрансгенных родственных растений была не выше, чем в аналогичных зарубежных исследованиях. Трансгенные гибриды имели сниженный вес, размер и всхожесть семян. Эти параметры различались у каждого гибрида, однако ни один из них не превосходил родительские растения. Поскольку межвидовая гибридизация чаще наблюдалась в условиях рудеральных экосистем (табл.), при возделывании трансгенного рапса особое внимание необходимо уделять мерам по предотвращению возникновения его свободнорастущих популяций.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ мол_a (16-34-00404).

Таблица. Сравнение общей частоты гибридизации с рапсом нетрансгенных растений в различных условиях произрастания

Доля трансгенных семян в рудеральных экосистемах	Вид растения	Доля трансгенных семян в агроэкосистемах
0.6 %	<i>B. juncea</i>	0.18 %
1 %	<i>B. rapa</i>	0.019 %
0.04 %	<i>B. napus</i>	0.25 %

Библиографический список (References)

- 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. N. 5. С. 587–594.
- Li J., Tan X., Zhu F., Guo J. A rapid and simple method for *Brassica napus* floral-dip transformation and selection of transgenic plantlets // International Journal of Biology, 2010. V. 2. N.1. P. 127.
- Warwick S. I., Beckie H.J., Hall L. M. Gene flow, invasiveness, and ecological impact of genetically modified crops // Annals of the New York Academy of Sciences, 2009. V.1168. N1. P. 72–99.

DEVELOPMENT OF TRANSGENIC PLANTS USING FLORAL DIP METHOD
AND ESTIMATION OF PROBABILITY OF GENE FLOW FROM TRANSGENIC CANOLA

E.V. Mikhaylova¹, A.M. Denisov²

¹*Institute of Biochemistry and Genetics Ufa Scientific Centre RAS*

²*Bashkir State University, mikhele@list.ru*

Floral dip method success rate was 10% when used on canola, 2% when used on eruca and 1.4% when used on amaranthus. Hybridization frequency with related species was higher when canola grew as a ruderal plant.