

УДК 581.1:577.214.625:578.853

## МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕН *WUSCHEL Arabidopsis thaliana* ПОД КОНТРОЛЕМ 35S ПРОМОТОРА

© Э.З. Нургалеева, А.Р. Кулуев, Б.Р. Кулуев

Получены трансгенные растения табака, экспрессирующие ген *WUSCHEL A. thaliana* под контролем 35S промотора. Трансгенные растения характеризовались увеличением длины и площади листьев, а также высоты стебля по сравнению с контрольными растениями. Было показано, что наиболее вероятной причиной возрастания величины листьев являлось увеличение размеров отдельных клеток, входящих в состав этого органа. Трансгенные по гену *WUSCHEL* растения табака характеризовались небольшим уменьшением размеров цветков по сравнению с контролем. Показано, что это уменьшение связано со снижением количества клеток, приходящихся на один цветок.

Ключевые слова: *WUSCHEL*, транскрипционный фактор, 35S промотор, трансгенные растения, *Nicotiana tabacum*, величина органов.

Одной из перспективных направлений генной инженерии растений является получение трансгенных растений с увеличенными размерами органов. Для этого в первую очередь могут быть использованы гены, участвующие в регуляции клеточного деления и клеточного растяжения, так как увеличение размера клеток и их количества в итоге часто приводит к изменению размера органов у растения [1].

Одним из транскрипционных факторов, принимающих участие в регуляции клеточной пролиферации в апикальной меристеме побега (АМП), является *WUSCHEL (WUS)*, впервые обнаруженный у *Arabidopsis thaliana*. Ген *WUS* относится к группе генов *WOX (WUSCHEL-related homeobox)*, кодирующих транскрипционные факторы с атипичным гомеодоменом, состоящим из 66 аминокислотных остатков [2–3]. Ген *WUS* – это маркерный ген меристемы побега, экспрессия которого обнаруживается уже на стадии 16-клеточного зародыша. В дальнейшем клетки с экспрессией гена *WUS* участвуют в регуляции численности ствольных клеток и располагаются в небольшом районе АМП, на-

зываемой организационным центром [4]. В АМП также экспрессируется ген *CLAVATA3 (CLV3)*, хотя его функция несущественна для активности самих ствольных клеток [5]. Продукт гена *CLV3* участвует в подавлении транскрипции гена *WUS* в прилегающих клетках АМП и способствует дифференцировке меристематических клеток [6].

В побегах ствольные клетки располагаются в верхней части центральной зоны верхушечной меристемы [7]. Цветочные меристемы формируются непосредственно из первичной меристемы побега, но при этом особенности экспрессии регуляторов числа ствольных клеток (*WUS* и *CLV3*) в этих меристемах неодинаковы. В меристеме побегов экспрессия гена *WUS* поддерживается неограниченно долгое время, в цветочной меристеме экспрессия этого же гена происходит только в ограниченном периоде времени [8].

В корнях функционирует гомолог гена *WUS* – *WOX5*, находящийся в области покоящегося центра в меристеме корня. Однако роль паралога гена *WUS*, экспрессирующей-

НУРГАЛЕЕВА Элина Зинфировна, Башкирский государственный университет,

e-mail: nurgaleewa.elina@yandex.ru

КУЛУЕВ Азат Разяпович, Башкирский государственный университет, e-mail: azatpiter@mail.ru

КУЛУЕВ Булат Разяпович – к.б.н., Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, e-mail: Kuluev@bk.ru

ся в других типах меристем и механизм их действия практически не изучены. Как показали исследования на модельном объекте *A. thaliana*, продукты генов *WUS* и *WOX5* функционально эквивалентны [9]: оба эти гена экспрессируются в организующих центрах меристем и обеспечивают поддержание пула стволовых клеток, стимулируя их пролиферацию и блокируя дифференцировку.

В литературе имеются сведения об исследовании ортологов гена *WUS* у хозяйственно-ценных растений. Например, найден ортолог гена *WUS* у сои – *GmWUS*, который также экспрессируется в центральной зоне АМП и во флоральной меристеме [10]. Изучен ортолог гена *WUS* риса – *QHB* (quiescent-center-specific homeobox). Предполагается, что он выполняет функцию поддержания стволовых клеток в меристеме корня [11]. Ведутся также исследования гомолога гена *WUS* у томатов, получившего название *SIWUS*. Было показано, что ген *SIWUS* экспрессируется на высоком уровне в зоне опадения цветка, поэтому он, возможно, принимает участие в развитии цветка и его опадении [12].

Исходя из данных литературы, нами было выдвинуто предположение, что размеры органов растений могут зависеть не только от уровня клеточного деления и клеточного растяжения в самих органах, но и от общего количества стволовых клеток в АМП, так как именно из этих клеток в последующем образуются зачатки органов. Теоретически, чем больше АМП содержит клеток, тем более крупными могут оказаться размеры органов. Однако в растениях работают компенсаторные механизмы, способные поддерживать размеры растений в пределах нормы. Например, если в зачатки органов будет попадать большее, чем в норме количество клеток, компенсаторные механизмы будут способствовать уменьшению размеров отдельных клеток. Однако данные о влиянии сверхэкспрессии регуляторов числа стволовых клеток на размеры органов в литературе встречаются редко. В связи с вышесказанным, целью этой работы стало получение трансгенных растений табака с конститутивной экспрессией гена

*WUS* и морфологический анализ полученных растений.

**Методика. Бактериальные клетки, штаммы, плазмиды, генно-инженерные манипуляции, последовательности олигонуклеотидных праймеров.** В данной работе использовали бактерии *E. coli* штамма XL1 – Blue и *Agrobacterium tumefaciens* штамма AGL0. В качестве бинарного вектора использовали плазмиду pCambia 1305.1 с геном устойчивости к гигромицину. Тотальную ДНК *A. thaliana* выделяли методом солевой экстракции. Выделенную ДНК очищали при помощи набора для очистки ДНК (Цитокин, Россия) и использовали в качестве матрицы для проведения ПЦР. Для амплификации гена *WUS* размером 1925 пн использовали праймеры WUSF AAAATCTCTTTACTACCAGCAAG и WUSR TAAAATTTTAACTTATTCATC. Для амплификации 35S промотора использовали праймеры: 35SF AGAGGACCTAACAGAACTCG и 35SR CGTGTCTCTCCAAATGAAA. Электропорацию компетентных клеток *A. tumefaciens* проводили при помощи электропоратора фирмы Bio-Rad (США) модели Micropulser.

**Получение трансгенных растений табака.** Трансгенные растения табака получали методом агробактериальной трансформации листовых дисков. Для получения листовых дисков использовали листья растений *Nicotiana tabacum* L. сорта Petit Havana SR-1. Первичные трансгенные побеги T<sub>0</sub>-побеги отбирали на селективной среде МС (соли среды МС, с добавлением 0,1 мг/л НУК, 1 мг/л 6-БАП, 30 000 мг/мл сахарозы, pH 5,8), содержащей 25 мг/л гигромицина.

Все полученные побеги нормального фенотипа T<sub>0</sub> в каждом варианте укореняли в присутствии 20 мг/л гигромицина. Затем переносили в почвенную смесь, акклиматизировали к условиям почвы, доводили до цветения, самоопыляли и получали семена (T<sub>1</sub> потомство).

Для контроля наследования интродуцированных генов и определения количества вставок трансгена, часть T<sub>1</sub> семян каждой полученной линии проращивали на среде МС

с добавлением гигромицина в климатической камере Binder (Германия). Предварительно данные семена стерилизовали последовательным погружением в 70% спирт на 1 мин, 15% раствор гипохлорита натрия на 10 мин и промывали их 5 раз в стерильной дистиллированной воде. Через 3 недели подсчитывали количество устойчивых и неустойчивых к селективному средству семян и определяли расщепление при наследовании гена селективного маркера. Результаты обрабатывали методом  $\chi$ -квадрат по стандартной методике и выделяли для дальнейшей работы линии с одной интегрированной копией трансгенов (при расщеплении 3:1).

**Морфологическая характеристика трансгенных растений и условия их выращивания.** Измерения величины органов производили во время цветения. Было отобрано по 5 растений, у каждого из которых измеряли длину трех нижних листьев, которые достигли своего конечного размера и прекратили рост. Затем вычисляли среднее значение длины листа для каждого растения. Также измеряли длину цветка, начиная от цветоножки до края желобка венчика. У каждого растения измеряли пять цветков и вычисляли средние значения. Из отобранных растений выделяли ДНК и проводили ПЦР-анализ на наличие целевого гена и 35S промотора.

Растения трансгенных линий и контрольные растения выращивали на открытой светоплощадке при температуре 25–27°C с фотопериодом 16/8 ч (свет/темнота) и освещенностью около 4000 люкс в вегетационных сосудах объемом 450 мл, заполненных универсальным грунтом. Вначале высаживали по 4–5 трансгенных растения в сосуд, потом оставляли по одному растению. Полив проводили водопроводной водой без минеральных удобрений. На 45–60 день выращивания один раз поливали 10% раствором Хогланда-Арнона. Площади клеток эпидермиса листьев и цветков определяли при помощи универсального флуоресцентного микроскопа модели Axio Imager M1 (Carl Zeiss, Германия) с использованием оригинального программного обеспечения.

**Результаты. Получение генно-инженерных конструкций гена *WUS* с 35S промотором в бинарном векторе pCambia 1305.1.** Из вектора pCambia 1305.1 по сайтам рестрикции *Nco*I и *Pml*I был выделен репортерный ген *GUS*, а липкие концы достроены T4 ДНК-полимеразой. В этом видоизмененном векторе можно клонировать различные целевые гены. Участок молекулы ДНК *A. thaliana* размером 1925 пн, включающий ген *WUS*, был амплифицирован и клонирован в T-векторе pKRX (рис. 1).

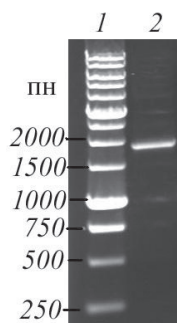


Рис. 1. Амплификация полногеномной копии гена *WUS A. thaliana*. 1 – маркер молекулярного веса 250–10 000 пн (Сибэнзим, Россия); 2 – ампликон гена *WUS A. thaliana* размером 1925 пн

Этот участок ДНК был секвенирован, полученная последовательность была проверена при помощи программ MegAlign и MegaBlast. По результатам выравнивания было показано, что выделенная нами копия гена *WUS* совпадает по нуклеотидной последовательности с исследуемым участком ДНК *A. thaliana* (AJ012310). Затем ген *WUS* был выделен из вектора pKRX по сайту *Bse*PI, а липкие концы достроены T4 ДНК-полимеразой. Потом ген *WUS* был ненаправленно клонирован в векторе pCambia 1305.1 с 35S промотором. Поиск клонов со смысловой ориентацией целевого гена осуществляли при помощи комбинации праймеров 35SF, WUSF и WUSR. Целевые генно-инженерные конструкции давали специфичные ампликоны при ПЦР только в случае сочетания следующей пары праймеров: 35SF/WUSR, а при сочетании пары 35SF/WUSF амплификация проходила только в случае антисмысловой ориентации гена *WUS*. Кроме этого, для проверки полученной генно-инженерной конструкции использовали рестрикционный анализ и секвенирование. После полной проверки полученный бинарный вектор был внедрен

в клетки *A. tumefaciens*. Скрининг целевых клонов в агробактериях осуществляли при помощи ПЦР-анализа с праймерами 35SF/35SR и WUSF/WUSR. Агробактериальный клон, содержащий вектор pCambia 1305.1, с геном *WUS* был использован для экспериментов по трансформации листовых дисков табака и получения трансгенных растений.

**Получение трансгенных растений табака, экспрессирующих ген *WUS*.** В ходе данной работы по агробактериальной трансформации листовых дисков табака генно-инженерной конструкцией вектора pCambia 1305.1 с геном *WUS* удалось отобрать только 11 трансгенных побегов. Из них укоренились на агаризованной среде МС 6 растений, из которых только 3 растения характеризовались высоким уровнем экспрессии репортерного гена. Для дальнейшей работы были отобраны только эти три растения, так как предполагалось, что только в них уровень экспрессии целевого гена *WUS* достаточно высок. Из данных растений табака была выделена тотальная ДНК и проведен ПЦР-анализ на наличие гена *WUS*. В результате выяснили,

что все три отобранных растения содержат в своем геноме ген *WUS A. thaliana*. Экспрессия в трансгенных растениях табака была доказана при помощи ОТ-ПЦР с праймерами WUSF и WUSR. Отобранные растения были акклиматизированы к условиям почвы и находились под наблюдением до периода созревания семян. Семена трансгенных по гену *WUS* растений, а также семена растений табака, содержащих пустой вектор pCambia 1305.1 без вставки целевого гена, были посажены на среду с гигромицином для получения второго поколения. Количественное соотношение трансгенных и нетрансгенных растений на чашках Петри составило 3:1 для всех трех вариантов опытных растений, что чаще всего означает встраивание трансгена в единичной копии. Контрольные растения с пустым вектором pCambia 1305.1 на среде с антибиотиком показали стандартное расщепление 3:1. Этот анализ был проведен для уменьшения риска косупрессии, так как при встраивании трансгена в геном в нескольких копиях часто происходит блокирование экспрессии трансгена.

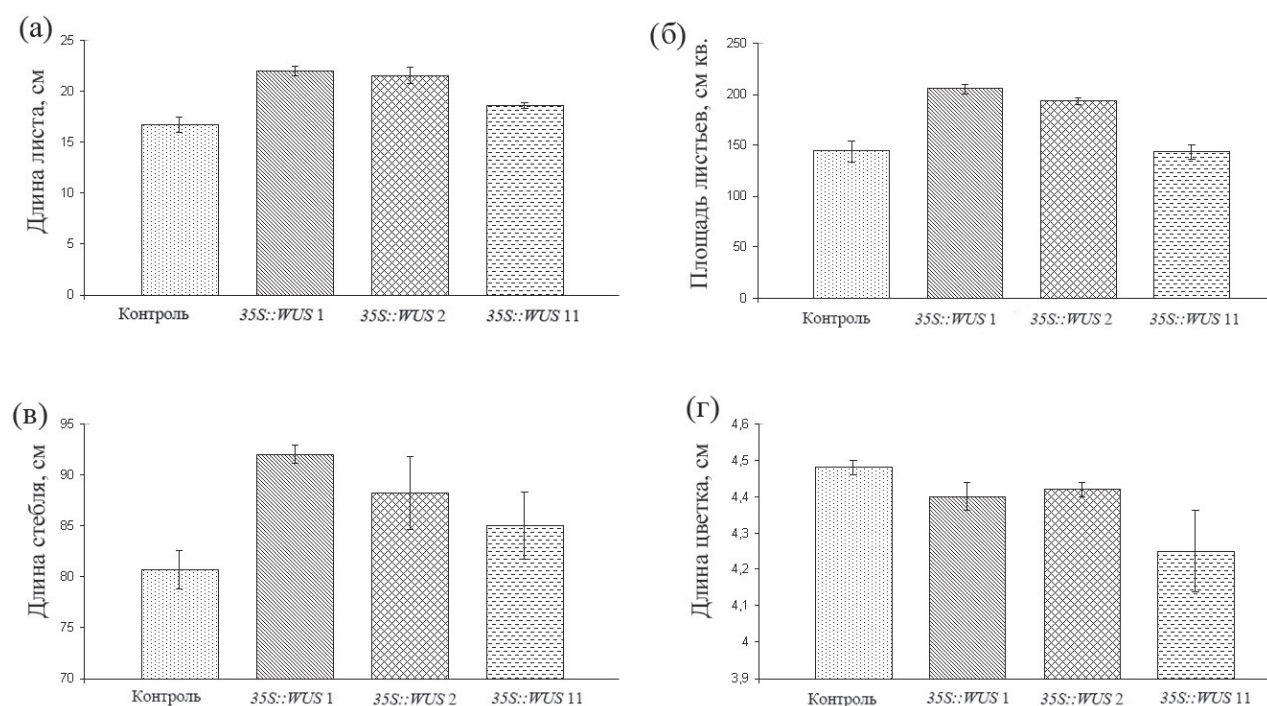


Рис. 2. Морфологические параметры трансгенных и контрольных растений: *a* – длина листьев в период цветения; *б* – площадь листьев в период цветения; *в* – длина стебля; *г* – длина цветка. Контроль – контрольные растения, несущие T-ДНК бинарного вектора pCambia 1305.1 без целевого гена. 35S::WUS-трансгенные растения, экспрессирующие ген *WUS* под контролем 35S промотора

**Сравнительный морфологический анализ растений табака, сверхэкспрессирующих ген *WUS*.** Семена трансгенных растений были посеяны на селективной среде МС и через 15 дней проростки были акклиматизированы к условиям почвы. По каждой линии было отобрано по 5 хорошо растущих и здоровых растений. В качестве контрольных растений были использованы трансгенные растения табака, несущие Т-ДНК бинарного вектора pCambia 1305.1 без целевого гена. По длине листьев трансгенные растения линий №1 и №2 отличались от контрольных растений их увеличением на 31 и 32% соответственно (рис. 2, а). В то же время растения линии №11 характеризовались увеличением длины листьев всего лишь на 11% (см. рис. 2, а). По высоте стебля опытные растения отличались незначительным их увеличением по сравнению с контролем (в пределах 14%) (рис. 2, в), а по длине цветков наблюдалось, наоборот, их уменьшение в среднем на 2–6% у разных линий (рис. 2, з). По сравнению с контрольными, опытные растения превышали их по площади листьев у линии №1 на 42%, у линии №2 на 34%, а у линии №11 разница не обнаруживалась (рис. 2, б).

У трансгенных по гену *WUS* растений табака по площади клеток эпидермиса листа наблюдалось значительное их увеличение по сравнению с контрольными растениями: у линии №1 на 90%, у линии №2 и №11 – на 129 и 126% соответственно (рис. 3, а). Площадь клеток эпидермиса цветков у линий №1 и №2 была больше, чем у контрольной группы на 42%, а у линии №11 – на 35% (рис. 3, б).

**Обсуждение.** Как и предполагалось, трансгенные по гену *WUS* растения табака характеризовались увеличением размеров вегетативных органов. Однако причиной увеличения размеров органов, вопреки ожиданиям, скорее всего, являлось не увеличение количества клеток в зачатках органов, а увеличение размеров отдельных клеток. Увеличение размеров отдельных клеток у опытных растений может быть связано с небольшими различиями в условиях выращивания контрольных и опытных растений, что все же могло иметь место быть при постановке эксперимента. Возможно, на величину органов и клеток контрольных растений негативное влияние оказывает Т-ДНК пустого вектора. Не исключается также вероятность косупрессии гена *WUS*, при котором вместо сверхэкспрессии наблюдается уменьшение уровня экспрессии гомолога этого гена в самом табаке. В последующем, из-за уменьшения количества клеток в организующем центре, в зачатки органов будет попадать меньшее количество клеток. Однако благодаря компенсаторному механизму, у растений происходит стимуляция клеточного роста растяжением, что вполне может привести к увеличению размеров органов до нормального уровня или даже выше, чем у контрольных растений. Причиной уменьшения количества клеток и увеличения их размеров в органах может также быть повышение уровня экспрессии гена *CLAVATA3*. Это предположение опирается на данные литературы о том, что под влиянием конститутивной экспрессии гена *WUS* экспрессия этого гена может возрастать [2]. Дело в том, что при повышении уров-

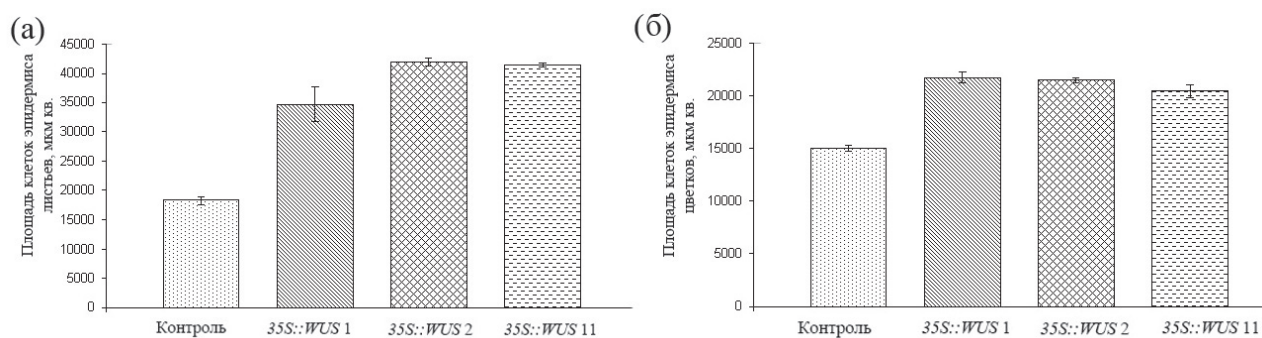


Рис. 3. Сравнительный анализ площадей клеток эпидермиса листьев и цветков у контрольных и опытных растений: а – площадь клеток эпидермиса листьев; б – площадь клеток эпидермиса цветков

ня экспрессии гена *CLAVATA3* клетки начинают дифференцироваться раньше, количество клеток в организующем центре АМП уменьшается и соответственно уменьшается количество клеток, приходящихся на один орган. Этот недостаток компенсируется прежде всего стимуляцией клеточного растяжения еще на ранних стадиях развития органа.

В целом можно сделать вывод, что путем увеличения уровня экспрессии гена *WUS* можно добиться увеличения размеров органов у трансгенных растений табака. Полученная нами генно-инженерная конструкция гена *WUS* в бинарном векторе pCambia 1305.1 может быть использована в дальнейших экспериментальных работах с целью увеличения размеров листьев и стебля у хозяйственно-ценных растений.

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ мол-а №12-04-31292.*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Медведев С.С., Шарова Е.И. Генетическая и эпигенетическая регуляция развития растительных организмов // Journal of Siberian Federal University. Biology 2. 2010. Т. 3. С. 109–129.
2. Mayer K., Schoof H., Haacker A. Role of WUSCHEL in Regulating Stem Cell Fate in the Arabidopsis Shoot Meristem // Cell. 1998. V. 95. P. 805–815.
3. Осипова М. А., Долгих Е. А., Лутова Л. А. Роль транскрипционных факторов WOX и KNOX в

развитии опухолеобразования у растений // Экологическая генетика. 2006. Т. 4, № 4. С. 3–9.

4. Малецкий С.И., Юданова С.С. Зародышевый путь и ствольные клетки у высших растений // Цитология и генетика. 2007. № 5. С. 67–80.

5. Weigel D., Jurgens G. Stem Cells That Make Stems // Nature. 2002. V. 415. P. 751–753.

6. Grob-Hardt R., Laux T. Stem Cell Regulation in Shoot Meristems // J. Cell Sci. 2003. V. 116. P. 1659–1666.

7. Bdurle I., Laux T. Apical Meristem: the Plant's Fountain of Youth // Bioessays. 2003. V. 25. P. 961–970.

8. Батыгина Т.Б., Рудский И.В. Роль ствольных клеток в морфогенезе растений // Докл. Академии наук. Общая биология. 2006. Т. 410, № 5. С. 702–704.

9. Sarkar A.K., Luijten M., Miyashima S. Conserved Factors Regulate Signalling in *Arabidopsis thaliana* Shoot and Root Stem Cell Organizers // Nature. 2007. V. 446. P. 811–814.

10. Chui E.W., Soo Y.K., Prem L.B. Singh Novel Spatial Expression of Soybean the Incipient Floral Primordial. 2011. V. 233. P. 553–560.

11. Kamiya N., Nagasaki H., Morikami A. Isolation and Characterization of a Rice *WUSCHEL*-type Homeobox Gene that is Specifically Expressed in the Central Cells of a Quiescent Center in the Root Apical Meristem // Plant J. 2003. V. 35. P. 429–441.

12. Wang X., Wang X., Ren J., Ma Y., Yin J. Characterization of Tomato Transcription Factor *WUSCHEL* and Functional study in *Arabidopsis* // Journal of Integrative Agriculture. 2012. V. 11. P. 1257–1265.

## MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF TRANSGENIC TOBACCO PLANTS EXPRESSING THE *WUSCHEL* GENE OF *Arabidopsis thaliana* UNDER THE CONTROL OF THE 35S PROMOTER

© E.Z. Nurgaleeva<sup>1</sup>, A.R. Kuluev<sup>1</sup>, B.R. Kuluev<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bashkir State University, <sup>2</sup>Institute of biochemistry and genetics of RAS, Ufa, Russian Federation

We have obtained transgenic tobacco plants expressing the *WUSCHEL* gene of *A. thaliana* under the control of the 35S promoter. Transgenic plants were characterized by an increase in leaf length and area and stem height as compared to the control. It has been shown that the most probable cause for the increase in leaf length is related to increased sizes of individual cells that form this organ. Transgenic tobacco plants were characterized by a slight decrease in flower size as compared to the control. This decrease is shown to be associated with the reduction in the number of cells per one flower.

Key words: *WUSCHEL*, transcription factor, 35S promoter, transgenic plants, *Nicotiana tabacum*, organ size.