Серия «Биология. Экология»
2013. Т. 6, № 3. С. 3–8
Онлайн-доступ к журналу:
http://isu.ru/izvestia

ИЗВЕСТИЯ
Иркутского государственного университета

УДК 575.23:62.37.29

Процедура трансформации вызывает изменения стабильности развития и интенсивности фотосинтеза в ряду поколений у растений табака

Ю. В. Нурминская, Л. А. Максимова, Т. В. Копытина, А. Г. Еникеев

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск
E-mail: nurminskaya@sifibr.irk.ru

Аннотация. Изучали стабильность развития и интенсивность фотосинтеза у растений табака, трансформированного разоружённым штаммом *Agrobacterium tumefaciens* A699 (без целевых генов) в нормальных условиях и в условиях повышенного освещения. При воздействии экстремального освещения, несмотря на некоторое уменьшение стабильности развития у трансформантов по сравнению с контрольными растениями, трансгенные растения демонстрировали повышенный уровень интенсивности фотосинтеза. Наблюдаемый эффект отнесли к последствиям изменений в функционировании растительного генома из-за стрессового напряжения, вызванного процедурой трансформации. Затухание наблюдаемых эффектов у поколения T_6 может быть связано с действием механизмов поддержки популяционного гомеостаза, обеспечивающих стабильность работы генома также и при появлении инсерционных мутаций, коей является встройка чужеродной генетической конструкции – Т-ДНК агробактерии.

Ключевые слова: *Nicotiana tabacum* L., трансгенез, интенсивность фотосинтеза, стабильность развития.

Введение

Стремление к поддержанию гомеостаза – естественное, неотделимое свойство живого. Поддержку популяционного гомеостаза, являющегося важным критерием сохранения генотипа и выживания вида [8], обеспечивают механизмы мутационного контроля.

Популяционные процессы у трансгенных растений изучены слабо, а механизмы поддержания гомеостаза популяции трансформантов не рассматривались вообще. Трансформацию агробактерией, являющуюся наиболее распространённым способом трансформации двудольных, можно рассматривать как комплексный стрессирующий фактор, включающий не только факт инсерционной мутации, но и стресс вследствие поранения, инфицирования патогеном и т. д. [1; 13]. Трансформация приводит к разбалансировке коадаптированных генных комплексов, росту частоты отклонений в раннем онтогенезе («онтогенетического шума»), вследствие чего может увеличиться изменчивость признаков [3]. Понимание того, как могут действовать механизмы поддержки популяционного гомеостаза у трансгенных растений, в значительной мере облегчило бы задачи интерпретации результатов трансформации целевыми генами и прогнозирования устойчивости наследования признаков.

Уровень гомеостаза популяции складывается из того, какой уровень гомеостаза имеют особи, формирующие популяцию. Ранее установлено, что трансформация растений генетической конструкцией, не содержащей целевых генов, вызывала усиление процессов роста и развития у этих растений – трансформанты (T_1–T_4) зацветали раньше, формировали более длинные стебли, имели увеличенную общую площадь листьев. Показатель флуктуирующей асимметрии, основанный на сравнении площадей левой и правой половин листа, у трансформантов был понижен. Это свидетельствовало о низком уровне онтогенетического шума, что, в свою очередь, является показателем высокой стабильности развития первых четырёх поколений трансгенных растений [7; 9].

Высокая стабильность развития может свидетельствовать о повышенном уровне гомеостаза. Однако стабильность развития – лишь один из показателей уровня гомеостаза. Интенсивность фотосинтеза также даёт косвенную информацию о гомеостазе развития [4]. В норме стабильность развития и эффективность фотосинтетических процессов прямо пропорциональны [6]. Изучение фотосинтетической активности у трансформантов представляет значительный интерес, поскольку ускоренные темпы роста и развития должны обеспечивать-

ся мощными фотосинтетическими процессами: за счёт увеличения площади фотосинтетической поверхности, за счёт увеличения интенсивности фотосинтеза или благодаря обоим составляющим. Такое активно фотосинтезирующее растение, помещённое в условия с освещённостью, превышающей нормальные значения, может демонстрировать иные, чем контрольное растение, параметры интенсивности фотосинтеза и стабильности развития.

В связи с вышеизложенным целью работы было изучение интенсивности фотосинтеза и стабильности развития у растений табака, трансформированных разоружённым штаммом *Agrobacterium tumefaciens* A699 [10], в нормальных условиях и в условиях повышенной освещённости. Т-ДНК штамма A699 не несёт целевых генов.

Материалы и методы

Трансгенные растения *Nicotiana tabacum* L. (сорт Самсун) получены по стандартным протоколам [2] с использованием разоружённого штамма бактерии *A. tumefaciens* A699, содержащего вектор CNL 65 с геном *nptII*. Отбор трансгенных линий проводили на средах с канамицином (50 мг/л), наличие вставки подтверждено ПЦР-анализом (ПЦР-амплификатор Mastercycler gradient «Eppendorf», Германия; фиксатор гелей Bio-Rad, Италия) [9]. Использованы праймеры к гену *nptII* (Сибэнзим, Новосибирск): 5′…TGACTGGGCACAACAGACCATCGGCT3';
3′…ACTGACCCGTGTTGTCTGGTAGCCGA 5'.

Растения выращивали в условиях фитотрона при дневной температуре +22 ^{o}C, ночной +15 ^{o}C, продолжительность светового дня составляла 16 часов (использовалась камера Plant Master «CLF Plant Climatics», Германия).

Интенсивность фотосинтеза измеряли с помощью анализатора LC*i* Leaf Chamber/Soil Respiration Analysis System (Великобритания) у первого, второго и третьего, считая сверху, листов нормальных и трансформированных растений, в условиях нормального (140 μмоль/м^{2}с) и усиленного (700 μмоль/м^{2}с) освещения. Растения в возрасте 72-х дней после посева помещали в камеру на две недели.

Стабильность развития определяли по значениям интегрального показателя флуктуирующей асимметрии между правой и левой половинами листа. Для этого по завершении вегетационного опыта листья фиксировали в фиксаторе Кларка, а затем фотографировали с масштабированием на стеклянной пластине в проходящем свете. С помощью графического редактора Image Pro Plus for Windows v. 4.5.0.29, измеряли площади половин листовой пластинки. Ошибка измерения составляла 2,76 %. Интегральный показатель асимметричности оценивали согласно [5].

Статистическую обработку результатов выполняли при помощи программ Excel (MS Office 2007) и Statistica v. 6.0 по набору описательной статистики (оценивались медиана, 25–75%-ные квартили, минимаксные значения). Данные представлены в виде диаграмм размаха («ящик-усы») [12]. Достоверность отличий оценивали с помощью теста Манна – Уитни ($p < 0,05$) [11].

Результаты и обсуждение

В нормальных условиях (140 μмоль/м^{2}с) показатель флуктуирующей асимметрии трансгенных растений был низким, повышаясь у T_5 (рис. 1). При этом трансформанты в целом имели более низкую интенсивность фотосинтеза по сравнению с нетрансформированными растениями, за исключением растений поколений T_4 (рис. 2). Низкая интенсивность фотосинтеза, по-видимому, компенсировала увеличенную площадь листьев у трансформантов [9].

В условиях экстремальной (760 μмоль/м^{2}с) освещённости стабильность развития трансформантов понижалась, несколько увеличиваясь у T_5 (рис. 3). То есть, несмотря на стимулирующий эффект процедуры трансформации на процессы роста в нормальных условиях, при действии стрессирующего фактора стабильность развития у трансформантов снижается, свидетельствуя о понижении уровня гомеостаза. Однако наблюдаемые изменения стабильности развития не сказались на фотосинтетической активности. В условиях повышенного освещения и трансформанты, и контрольные растения увеличили интенсивность фотосинтеза (несмотря на наблюдавшееся обесцвечивание листьев вследствие разрушения хлорофилла), при этом трансформанты демонстрировали более высокую фотосинтетическую активность по сравнению с контролем. Этот эффект снижался у растений поколений T_5,T_6 (рис. 4).

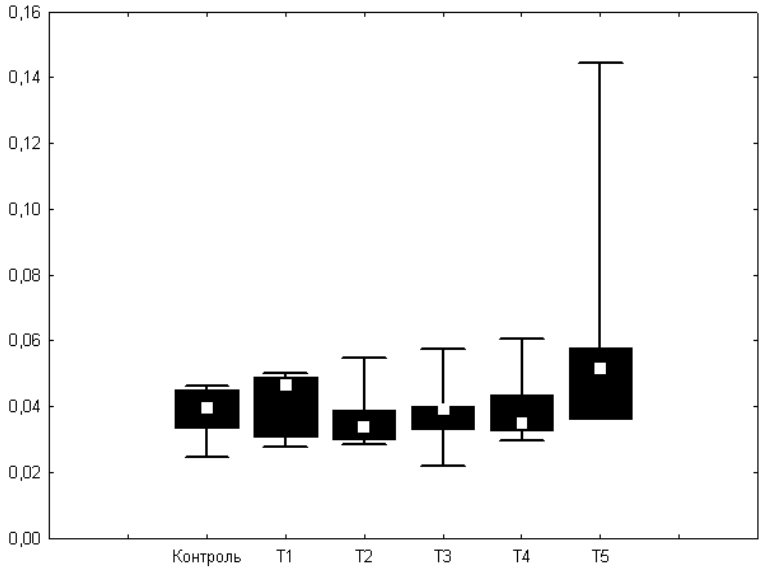


Рис. 1. Интегральный показатель асимметричности листовой пластинки у нормальных и трансформированных растений табака при освещённости 140 μмоль/м^{2}с . Обозначены минимаксные значения, 25-я и 75-я процентили; $n = 6$

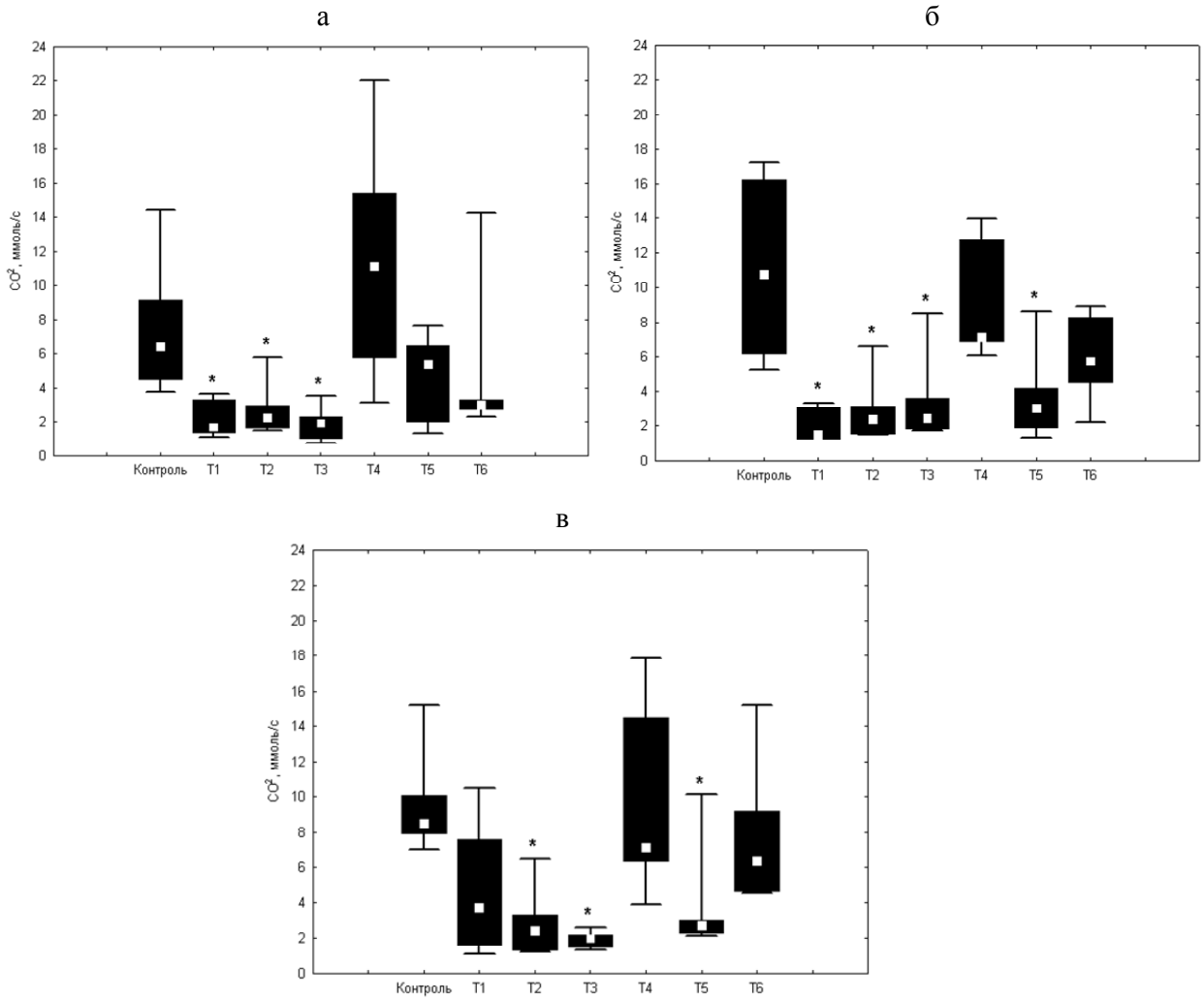


Рис. 2. Интенсивность фотосинтеза первого (а), второго (б) и третьего (в), считая сверху, листов у нормальных и трансформированных растений табака при освещённости 140 μмоль/м^{2}с. Астериксами (*) отмечены варианты, достоверно отличающиеся от контроля ($p < 0,05$); $n = 7$

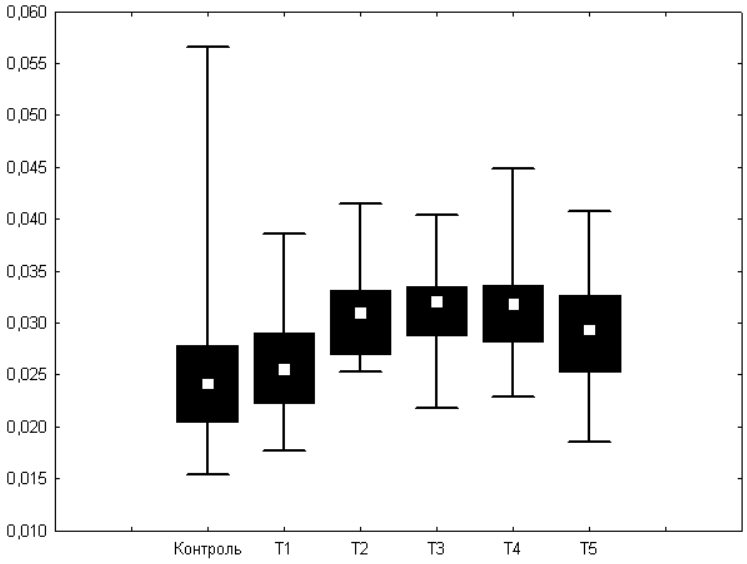


Рис. 3. Интегральный показатель асимметричности листовой пластинки у нормальных и трансформированных растений табака при освещённости 760 μмоль/м^{2}с. Астериксами (*) отмечены варианты, достоверно отличающиеся от контроля ($p < 0,05$); $n = 7$

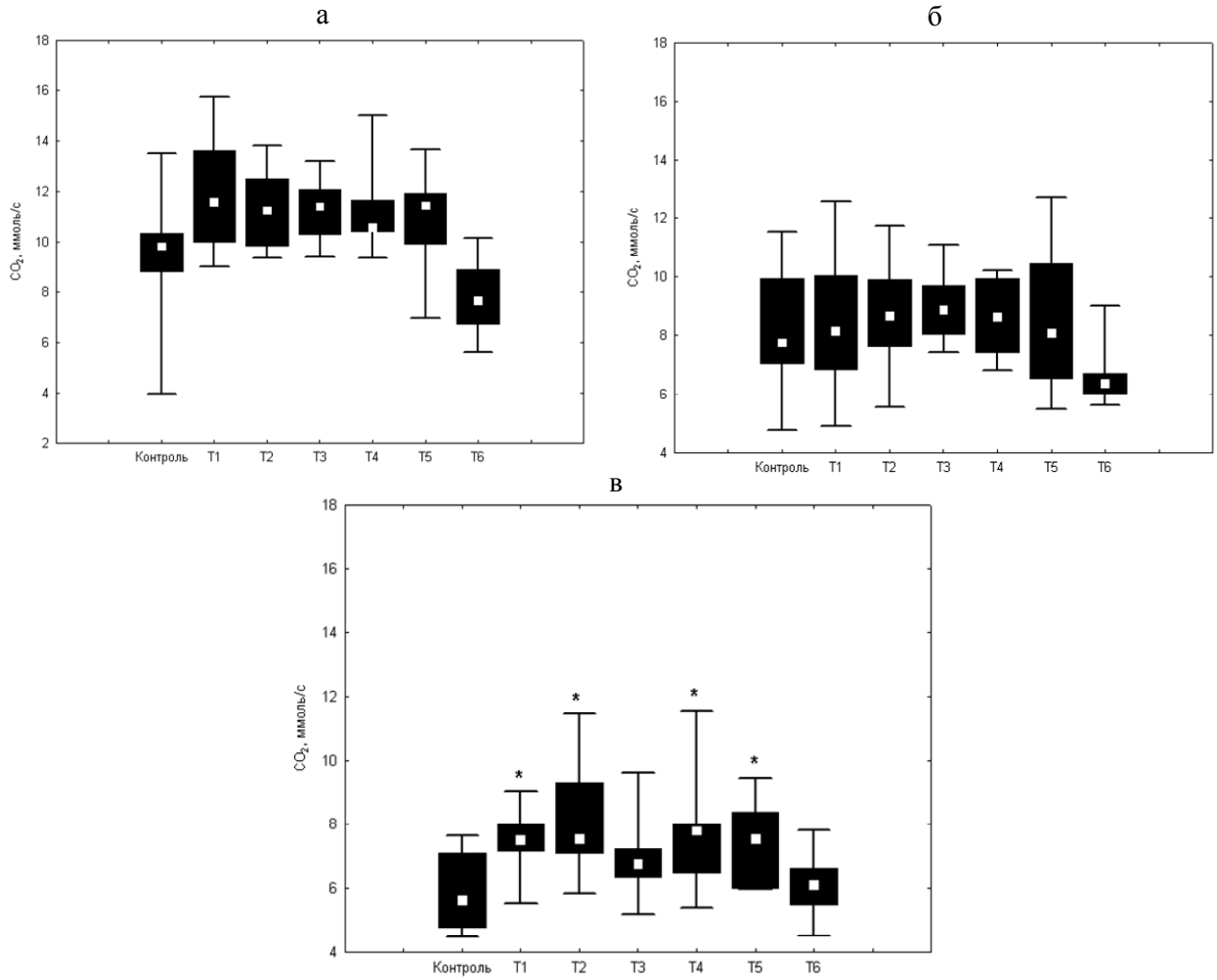


Рис. 4. Интенсивность фотосинтеза первого (а), второго (б) и третьего (в), считая сверху, листов у нормальных и трансформированных растений табака при освещённости 760 μмоль/м^{2}с. Астериксами (*) отмечены варианты, достоверно отличающиеся от контроля ($p < 0,05$); $n = 7$

Таким образом, как при нормальном, так и при экстремальном освещении трансформанты не демонстрировали прямой зависимости фотосинтетической активности от стабильности развития. Возможно, изучение трансгенных растений методом измерения интенсивности фотосинтеза не подходит для определения уровня гомеостаза развития. В связи с этим, в качестве критерия, позволяющего судить об уровне гомеостаза развития у исследуемых растений, мы можем использовать такую характеристику, как стабильность развития. И в нормальных условиях, и при избыточном освещении уровень гомеостаза трансформантов меняется в ряду поколений, приближаясь к контрольным значениям у T_5, T_6.

В данном случае мы имеем дело с организмами, изменёнными вследствие инсерционной мутации. На уровне популяции наблюдаемые изменения в поколениях, возможно, отражают работу механизмов стабилизации, поддержания популяционного гомеостаза, которые снижают, в том числе, последствия от появления мутаций, какими бы они ни были – благоприятными или нет.

Выводы

1. При нормальном освещении стабильность развития у растений табака, трансформированных агробактериальным штаммом А699 без целевых генов была несколько выше, чем у контрольных растений, однако интенсивность фотосинтеза, напротив, ниже.

2. При росте в условиях избыточного освещения стабильность развития растений со встроенной конструкцией была пониженной по сравнению с контролем, что не помешало трансформантам демонстрировать повышенную фотосинтетическую активность.

3. Затухание наблюдаемых изменений у поколений T_5, T_6 может быть следствием работы механизмов поддержки гомеостаза популяции трансгенных растений.

Работа выполнена с использованием приборной базы Центра коллективного пользования ИНЦ СО РАН.

Литература

1. Агробактериальная трансформация как биотический стрессирующий фактор / А. Г. Еникеев [и др.] // Журн. стресс-физиологии и биохимии растений. – 2008. – Т. 4, № 1. – С. 11–15.

2. Генетическая инженерия растений. Лабораторное руководство / Дж. Дрейпер [и др.]. – М. : Мир, 1991. – 408 с.

3. Животовский Л. А. Стабилизирующий отбор и приспособленность популяций ГМО / Л. А. Животовский // ГМО – скрытая угроза России. – М. : ОАГБ, ЦЭПР, 2004. – С. 93–104.

4. Захаров В. М. Онтогенез и популяция: оценка стабильности развития в природных популяциях / В. М. Захаров // Онтогенез. – 2001. – Т. 32, № 6. – С. 404–421.

5. Здоровье среды: методика оценки / В. М. Захаров [и др.]. – М. : Центр экол. политики России, 2000. – 68 с.

6. Здоровье среды: практика оценки / В. М. Захаров [и др.]. – М. : Центр экол. политики России, 1996. – 170 с.

7. Нурминская Ю. В. Выявление внутренней нестабильности генома трансгенных растений в ряду поколений / Ю. В. Нурминская // Экологические и медицинские проблемы Сибири : материалы межрегион. науч.-практ. конф. мол. учёных, 1–2 марта 2012 г. – Ангарск, 2012. – С. 123–132.

8. Щербаков В. П. Эволюция как сопротивление энтропии. I. Механизмы видового гомеостаза / В. П. Щербаков // Журн. общ. биологии. – 2005. – Т. 66, № 3. – С. 195–211.

9. Agrobacterium-mediated transformation of *Nicotiana tabacum* by disarmed strain At 699 resulted in considerable raising of growth and development of transgenic plants / L. A. Maximova [et al.] // J. Stress Physiol. and Biochem. – 2012. – Vol. 8, N 1. – P. 138–148.

10. Gelvin S. B. Genetic manipulation of *Agrobacterium tumefaciens* strains to improve transformation of recalcitrant species / S. B. Gelvin, C-N Liu // Plant Molecular Biology Manual. – Dordrecht : Kluwier Academic Publishers, 1994. – B 4. – P. 1–13.

11. Glantz S. A. Primer of biostatistics / S. A. Glantz. – N. Y. : McGraw-Hill Professional, 1999. – 89 p.

12. McGill R. Variations of Box Plots / R. McGill, J. W. Tukey, W. A. Larsen // The American Statistician. – 1978. – Vol. 32, N 1. – P. 12–16

13. Zhivotovsky L. A. Environmental stress and evolution: A theoretical study / L. A. Zhivotovsky // Environmental Stress, Adaptation, and Evolution / R. Bijlsma, V. Loeschcke (eds.). – Basel : Birkhaeuser Verlag, 1997. – P. 241–254.

The transformation can to change the rate of photosynthesis and the developmental stability of tobacco plants

Ju. V. Nurminskaya, L. A. Maximova, T. V. Kopytina, A. G. Enikeev

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk

Abstract. Tobacco plans were transformed by the *Agrobacterium tumefaciens* strain A 699, with no target genes. Processes related to rate of photosynthesis in leaves of transgenic tobacco plants and stability of the transformed plant development are discussed. The effects of increase of photosynthetic rate and of decrease of developmental stability observed under the conditions of increased illumination may be bound up with reconstructions in the transformants' genome functions due to the stress caused by the transformation process. The attenuation of effects observed at T_5, T_6 generations of transgenic plants can be a result of work of population homeostasis mechanism.

Key words. *Nicotiana tabacum* L., transgenesis, photosynthetic rate, developmental stability.

Нурминская Юлия Викторовна
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132
ведущий инженер
тел. (3952)42–66–76
E-mail: nurminskaya@sifibr.irk.ru

Максимова Людмила Алексеевна
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132
кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник
тел. (3952)42–66–76
E-mail: lasema@sifibr.irk.ru

Копытина Татьяна Васильевна
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132
кандидат биологических наук, ученый секретарь
тел. (3952)42–53–10
E-mail: kopytina@sifibr.irk.ru

Еникеев Андрей Густавович
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132
кандидат биологических наук,
заведующий лабораторией
тел. (3952)42–66–76
E-mail: enikeev@sifibr.irk.ru

Nurminskaya Yuliya Viktorovna
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132 Lermontov St., Irkutsk, 664033
leading engineer
phone: (3952)42–66–76
E-mail: nurminskaya@sifibr.irk.ru

Maximova Ljudmila Alekseevna
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132 Lermontov St., Irkutsk, 664033
Ph. D. in Biology, senior research scientist

phone: (3952)42–66–76
E-mail: lasema@sifibr.irk.ru

Kopytina Tatiana Vasiliyevna
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132 Lermontov St., Irkutsk, 664033
Ph.D. in Biology, scientific secretary
phone: (3952)42–53–10
E-mail: kopytina@sifibr.irk.ru

Enikeev Andrey Gustavovich
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132 Lermontov St., Irkutsk, 664033
Ph.D. in Biology, Head of Laboratory

phone: (3952)42–66–76
E-mail: enikeev@sifibr.irk.ru