

УДК 573.6.086.83:577.21:630

Испытания трансгенных растений осины с геном *bar* на устойчивость к гербицидам в полунатуральных условиях

В. Г. Лебедев^{1*}, В. Н. Фасхиев¹, Н. П. Коваленко¹, К. А. Шестибратов¹, А. И. Мирошников^{1,2}¹Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 142290, Московская обл., Пущино, просп. Науки, 6²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биотехнологический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 51

*E-mail: vglebedev@mail.ru

Поступила в редакцию 21.10.2015

Принята к печати 25.01.2016

РЕФЕРАТ Создание растений, устойчивых к гербицидам, является важным направлением в генной инженерии лесных древесных пород. С целью придания устойчивости к гербицидам на основе фосфинотрицина в растения осины обыкновенной (*Populus tremula* L.) методом агробактериальной трансформации перенесли ген *bar*, кодирующий фосфинотрицин-ацетилтрансферазу. Трансгенный статус 13 линий, полученных на основе двух элитных генотипов осины, подтвердили с помощью ПЦР. В 2014–2015 гг. оценили устойчивость шести линий к обработке гербицидом Basta в полунатуральных условиях. Трансгенные растения обладали устойчивостью к двукратной полевой дозе гербицида (10 л/га), тогда как контрольные погибли при воздействии 2.5 л/га. Содержание аммонийного азота в растениях с геном *bar* не изменилось после обработки гербицидом. Аномально низкая температура в третьей декаде октября 2014 г. выявила различия в зимостойкости линий, полученных на основе генотипов Pt или f2. Стабильность экспрессии гена *bar* после перезимовки в естественных условиях подтверждена методом ОТ-ПЦР. Отобраны четыре трансгенные линии осины, перспективные для проведения полевых испытаний. Ген *bar* может быть использован для переноса в трансгенные растения лесных пород, проявившие ценные признаки, например повышенную продуктивность.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА ген *bar*, осина, трансгенные растения, устойчивость к гербицидам, фосфинотрицин.

ВВЕДЕНИЕ

Многие лиственные породы (например, ива и тополь) на ранних стадиях роста не выдерживают конкуренции с сорными растениями, что делает борьбу с сорняками очень важной [1]. Эта проблема особенно актуальна в питомниках, где низкая конкурентоспособность молодых растений приводит к снижению их выживаемости и ослаблению роста. В связи с этим на борьбу с сорными растениями в питомниках тратится 50–70% средств, выделяемых на выращивание стандартного посадочного материала [2]. Механические способы борьбы отличаются трудоемкостью и низкой эффективностью. Более перспективно использование гербицидов, простых в применении, эффективных и экономичных.

В зоне умеренного климата в лесных питомниках выращивают различные виды *Populus*, однако использованию гербицидов мешает высокая чувстви-

тельность видов этих растений к большинству таких соединений [3]. Оптимальным представляется выращивание растений, устойчивых к высокоэффективным неселективным гербицидам, относительно безопасным для окружающей среды.

С этой целью в древесные растения встраивали различные гены, определяющие устойчивость к гербицидам. Первым таким геном был ген *aroA*, придающий устойчивость к глифосату [4]. Сообщалось также о переносе гена *crsl-1* для приобретения устойчивости к сульфонилмочевине [5], генов *CP4* и *GOX* для устойчивости к глифосату [6]. Наибольшее распространение, однако, получил ген *bar* почвенной бактерии *Streptomyces hygrosopicus*, придающий устойчивость к гербицидам широкого спектра действия (Liberty, Basta, Finale и др.) на основе фосфинотрицина (ФФТ, глюфосинат аммония). ФФТ является аналогом L-глутаминовой

кислоты и мощным ингибитором глутаминсинтетазы (ГС), играющей центральную роль в ассимиляции аммония и регуляции азотного метаболизма в растениях [7]. Ингибирование ГС приводит к быстрому накоплению аммония в растительной клетке и ее последующей гибели [8]. Ген *bar* кодирует фермент ФФТ-ацетилтрансферазу, который ацетирует свободную аминогруппу ФФТ и тем самым инактивирует его [9]. Ген *bar* встраивали в различные виды и гибриды *Populus* [3, 10] и *Eucalyptus* [11, 12], а также дуб [13] и различные виды хвойных [14, 15], но растения осины ранее не трансформировали. Цель нашей работы заключалась в создании устойчивых к гербицидам растений осины путем трансформации отечественных высокопродуктивных генотипов геном *bar* и отборе на основе испытаний в полунатуральных условиях линий, перспективных для плантационного лесоводства.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали растения осины (*P. tremula* L.) двух генотипов – Pt и f2. Растения с генотипом Pt, обнаруженные в Ленинградской области, характеризуются быстрым ростом и устойчивостью к ядровой гнили (СПбНИИЛХ, А.В. Жигунов, персональное сообщение), тогда как растения с генотипом f2 представляют собой культуру микропобегов клона 34, найденного С.Н. Багаевым в Костромской области [16]. Растения культивировали *in vitro* на среде WPM [17] с 0.5 мг/л гиббереллина при 22–24°C и фотопериоде 16 ч.

Трансформацию проводили штаммом *Agrobacterium tumefaciens* СВЕ21 с бинарным вектором pVlBar [18], содержащим гены *nos-nptII* и *35S-bar* согласно [19]. Канамицин-устойчивые трансформанты анализировали методом ПЦР. Растительную ДНК выделяли согласно [20]. Возможное загрязнение препаратов агробактериальной ДНК проверяли путем амплификации последовательности гена *virB*. Использовали следующие пары праймеров:

Vir-B1 – 5'-GGCTACATCGAAGATCGTATGAAATG-3';

Vir-B2 – 5'-GACTATAGCGATGGTTACGATGTTGAC-3';

Nos – 5'-CGCGGGTTTCTGGAGTTTAATGAGCTAAG-3';

NptII – 5'-GCATGCGCGCCTTGAGCCTGG-3';

Bar-1 – 5'-TGCACCATCGTCAACCACTA-3';

Bar-2 – 5'-ACAGCGACCACGCTCTTGAA-3'.

Реакционная смесь содержала 16 мМ (NH₄)₂SO₄, 0.01% бычьего сывороточного альбумина, 200 мкМ каждого dNTP, 0.4 мкМ каждого олигонуклеотида, 0.05 ед. акт./мкл Taq-полимеразы, 1–5 нг/мкл геном-

ной ДНК. Условия ПЦР: денатурация – 96°C (3 мин); 30 циклов – 94°C (1 мин), 60°C (*nptII*, *bar*) или 58°C (*virB*) по 1 мин, 72°C (1 мин); элонгация – 72°C (5 мин). Реакцию проводили на амплификаторе MJ Mini™ Gradient Thermal Cycler (Bio-Rad, США).

Устойчивость трансгенных линий *in vitro* оценивали путем укоренения растений на среде WPM с 0, 0.5 или 5 мг/л ФФТ. Через 2 недели после посадки определяли частоту укоренения, количество корней и их длину. Для оценки устойчивости к обработке гербицидом трансгенные и контрольные растения были микроразмножены, адаптированы к условиям теплицы и после пересадки в пластиковые сосуды объемом 1 л с субстратом торф : перлит (3 : 1) в начале июня 2014 г. перенесены на открытую площадку на территории ФИБХ РАН в Пущино. В середине июля растения обрабатывали водой (контроль) или 0.5, 1 и 2% водным раствором гербицида Basta (Bayer CropScience, 150 г/л ФФТ) в дозах, эквивалентных 2.5, 5 и 10 л/га (по четыре растения каждой линии в варианте). Визуальную оценку повреждений проводили через 3, 7, 14 и 28 сут после обработки по следующей шкале: 0 баллов – без повреждений, 1 – некроз 0–25% поверхности листьев, 2 – 25–50%, 3 – 50–75%, 4 – 75–100%, 5 – полный некроз. В день обработки и через 3 сут отбирали образцы листьев для оценки содержания аммонийного азота и воды. Растительный материал экстрагировали согласно [21]. Аммонийный азот определяли согласно [22]. Содержание воды определяли высушиванием при 105°C в течение 24 ч. В течение вегетационного сезона 2014 г. каждые 4 недели измеряли высоту растений и подсчитывали количество листьев, каждые 8 недель – диаметр основания ствола.

После перезимовки в естественных условиях в мае 2015 г. растения пересаживали в сосуды объемом 3 л. Степень подмерзания растений определяли по соотношению живой части к общей длине ствола. Метеоданные получены с автоматической метеостанции UGT в Пущино (около 600 м от места испытаний). Экспрессию гена *bar* оценивали в июне 2015 г. методом ОТ-ПЦР (внутренний контроль – ген актина). РНК выделяли по модифицированной методике [23]. кДНК синтезировали в два этапа. На первом этапе реакцию смесь (0.1–5 мкг РНК, 0.5 мкг олиго-dT-праймера, 10 ед. акт. ингибитора РНКаз) прогревали в течение 5 мин при 70°C и переносили на лед. На втором этапе добавляли 0.4 мМ dNTP, буфер для обратной транскриптазы и 4 ед. акт./мкл обратной транскриптазы M-MuLV, инкубировали в течение 1.5 ч при 37°C, после чего прогревали (15 мин при 70°C). ПЦР проводили с праймерами на гены *bar* и актина: Actin 1 up – 5'-TATGCCCTCCCACATGCCAT-3'; Actin 1 low – 5'-CATCTGCTGGAAGGTGCTGA-3'.

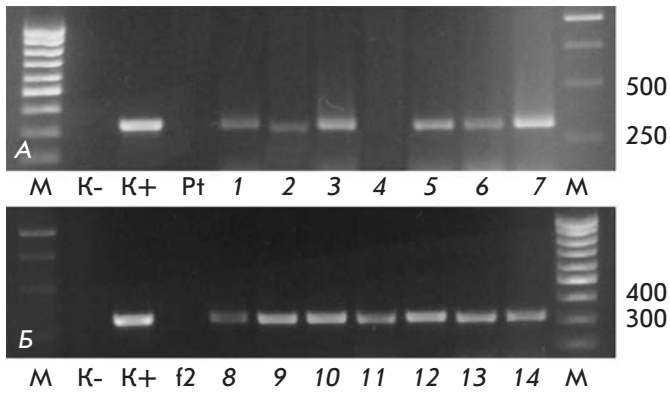


Рис. 1. ПЦР-анализ на наличие фрагмента гена *bar* растений осины генотипов Pt (А) и f2 (Б). М – молекулярный маркер; К- – вода; К+ – pBlBar; Pt, f2 – нетрансгенный контроль; 1 – PtXlBar4a; 2 – PtXlBar9a; 3 – PtXlBar14a; 4 – PtXlBar23a; 5 – PtXlBar29a; 6 – PtXlBar30a; 7 – PtXlBar31a; 8 – f2XlBar1a; 9 – f2XlBar2a; 10 – f2XlBar3a; 11 – f2XlBar4a; 12 – f2XlBar5a; 13 – f2XlBar6a; 14 – f2XlBar8a

Реакционная смесь содержала ScreenMix-HS («Евроген»), 0.8 мМ праймеров 0.1–5 мкг РНК или кДНК. Условия ПЦР: денатурация – 95°C (5 мин); 31 цикл – 95°C (45 с), 59°C (30 с), 72°C (1 мин); элонгация – 72°C (10 мин). В июле 2015 г. растения обрабатывали гербицидом по описанной выше методике.

Статистическую обработку проводили с использованием программы Statistica 6.1 (StatSoft, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате генетической трансформации вектором pBlBar получено 18 линий осины, устойчивых к канамицину: 10 – на основе генотипа Pt и восемь – на основе f2. Из 14 наиболее хорошо растущих *in vitro* линий (по семь с каждым генотипом) выделили ДНК для проведения ПЦР-анализа. ПЦР-анализ гена *virB* не выявил загрязнения образцов агробактериальной ДНК. Подтверждено присутствие последовательности селективного гена *nptII* во всех линиях (данные не приведены). Вставка целевого гена *bar* в геном осины обнаружена в шести из семи линий Pt (кроме PtXlBar23a), во всех линиях f2 выявлена амплификация фрагмента ДНК ожидаемого размера – 310 п.н. (рис. 1).

Устойчивость растений осины *in vitro* (13 линий и два исходных генотипа) определяли путем укоренения на среде, содержащей 0 (контроль), 0.5 мг/л (сублетальная концентрация) или 5 мг/л (летальная концентрация) ФФТ. Через 2 недели после посадки у нетрансгенных растений на среде с 0.5 мг/л ФФТ резко снизилась частота укоренения, количество и длина корней, а на среде с 5 мг/л ФФТ все расте-

Таблица 1. Устойчивость растений осины генотипа Pt к обработке гербицидом Basta

Линия	Доза гербицида, л/га	Степень некроза, баллы	
		через 3 сут	через 7 и 14 сут
Pt	2.5	5	5
	5	5	5
	10	5	5
PtXlBar9a	2.5	0	0
	5	< 1*	< 1
	10	< 1	1**
PtXlBar14a	2.5	0	0
	5	< 1	< 1
	10	1	1
PtXlBar29a	2.5	0	0
	5	< 1	< 1
	10	< 1	1

*Поражено до 1/3 всех листьев (некроз до 5–10% площади).

**Поражено 1/2–2/3 всех листьев (некроз до 25% площади).

Таблица 2. Устойчивость растений осины генотипа f2 к обработке гербицидом Basta

Линия	Доза гербицида, л/га	Степень некроза, баллы	
		через 3 сут	через 7 и 14 сут
f2	2.5	5	5
	5	5	5
	10	5	5
f2XlBar2a	2.5	0	0
	5	0	0
	10	< 1	1
f2XlBar3a	2.5	0	0
	5	0	< 1
	10	< 1	1
f2XlBar5a	2.5	0	0
	5	< 1	< 1
	10	< 1	< 1

ния погибли. Добавление ФФТ не повлияло на частоту укоренения трансгенных растений, хотя у некоторых линий отмечено снижение количества и длины корней. По итогам эксперимента *in vitro* отобрано по три трансгенные линии каждого генотипа, не показавшие снижения показателей укоренения на среде с ФФТ – PtXlBar9a, PtXlBar14a, PtXlBar29a, f2XlBar2a, f2XlBar3a и f2XlBar5a, которые оценивали на устойчивость к гербициду Basta в условиях открытой площадки. Выявлена низкая устойчивость



Рис. 2. Однолетние растения осины генотипа Pt через 7 дней после обработки гербицидом Basta: слева – нетрансгенный контроль, справа – линия PtXIBar14a (в каждой группе слева направо – вода, 2.5, 5, 10 л/га)

однолетней нетрансгенной осины: уже через 3 сут все листья на растениях обоих генотипов были полностью некротизированы вне зависимости от использованной дозы гербицида (табл. 1 и 2). Все трансгенные линии были устойчивыми к обработке 2.5 л/га гербицида, а две линии генотипа f2 – и к 5 л/га. В остальных вариантах на отдельных листьях наблюдались мелкие пятна некроза, занимающие до 5–10% площади листа. Через 7 сут после обработки Basta в максимальной дозе у некоторых трансгенных линий возросла степень поражения – увеличилось количество пораженных листьев и площадь некроза (до 25% площади листа). Через 14 и 28 дней после обработки симптомы поражения у трансгенных растений не усилились, а контрольные растения сбросили листья и полностью погибли. Внешний вид растений через 7 сут после обработки показан на рис. 2.

Показано, что уровень аммонийного азота в листовой ткани однолетних растений осины трансгенных линий был сходным, но в контрольных растениях содержание аммония было существенно выше: 17.5–19.6 и 24.2 мкг NH₄⁺/г сырого веса у генотипа Pt ($p < 0.001$) и 18.9–20.6 и 24.1 мкг NH₄⁺/г сырого веса у генотипа f2 ($p < 0.05$) соответственно. Через 3 сут после обработки гербицидом уровень аммония в контрольных растениях увеличился в зависимости от дозы в 2.7–4.6 раза у Pt (рис. 3) и 2.2–3.7 раза у f2 (рис. 4). В большинстве трансгенных линий уровень аммония снизился (до –36% от исходного уровня), тогда как в линии PtXIBar9a во всех вариантах его содержание возросло на 14–60% (в абсолютных значениях не отличаясь существенно от варианта обработки водой).

Таблица 3. Содержание воды в листьях осины до и после обработки гербицидом Basta

Генотип	Линия	Обработка	Содержание воды, %	
			до обработки	после обработки
Pt	Pt	вода	64.0	61.6
		гербицид	61.3–64.1	20.3–24.0
	PtXIBar9a	вода	59.5	55.7
		гербицид	56.0–60.4	53.9–57.2
	PtXIBar14a	вода	59.8	56.7
		гербицид	60.5–62.1	59.5–60.8
PtXIBar29a	вода	59.7	59.2	
	гербицид	57.4–61.7	56.9–61.0	
f2	f2	вода	55.9	52.6
		гербицид	59.1–61.5	22.7–25.3
	f2XIBar2a	вода	60.6	59.5
		гербицид	60.9–61.6	58.7–61.3
	f2XIBar3a	вода	60.8	61.1
		гербицид	60.6–62.9	60.7–63.3
	f2XIBar5a	вода	59.9	59.0
		гербицид	62.4–63.2	60.4–61.6

До обработки листья осины содержали, в зависимости от линии, 55.9–64.1% воды (табл. 3). Обработка гербицидом вызвала резкое обезвоживание контрольных растений: содержание воды снизилось до 20.3–24.0% у растений с генотипом Pt и до 22.7–25.3% – с f2. У трансгенных растений этот показатель практически не изменился и составил 53.9–63.3% (95–102% от исходного уровня). Существенные различия между вариантами обработки гербицидом отсутствовали.

Измерения биометрических показателей растений осины в сезоне 2014 г. не выявили негативного влияния обработки гербицидом на рост трансгенных линий. Не обнаружено статистически значимых различий в измеренной в конце года высоте растений после разных вариантов обработки (рис. 5). Трансгенные линии также не отличались по высоте между собой и от контрольных растений. Не выявлено существенных различий и в облиственности растений (данные не приведены), но диаметр ствола у растений линии f2XIBar5a, обработанных 2.5 или 5 л/га, был значительно выше, чем в варианте обработки водой – 6.9, 7.0 и 6.3 мм соответственно ($p < 0.05$).

Для оценки влияния абиотических факторов на стабильность экспрессии перенесенного гена растения оставляли на зимовку в естественных условиях. В третьей декаде октября 2014 г. на всей Европейской части России наблюдались аномально низкие температуры. В Пущино в эти дни температу-

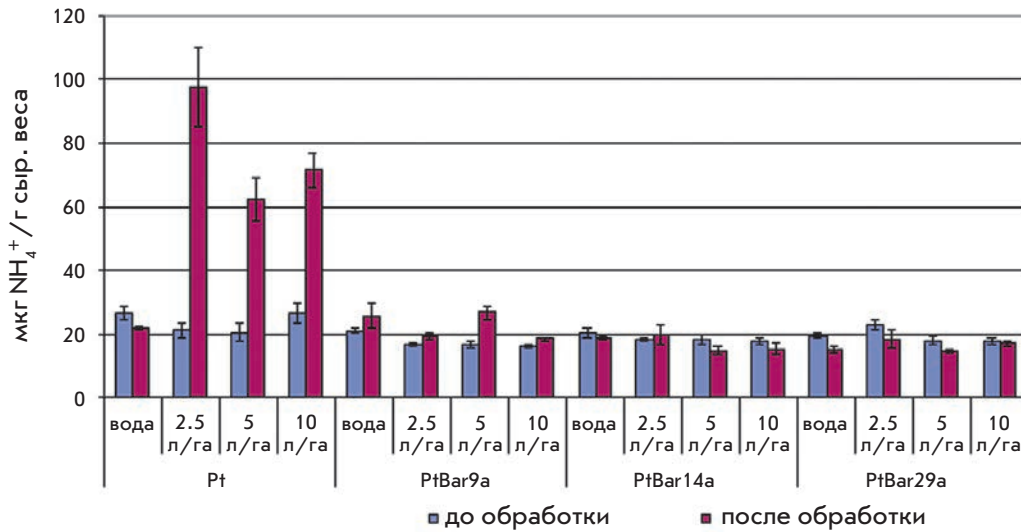


Рис. 3. Содержание аммонийного азота в листьях растений осины генотипа Pt до и после обработки гербицидом Basta

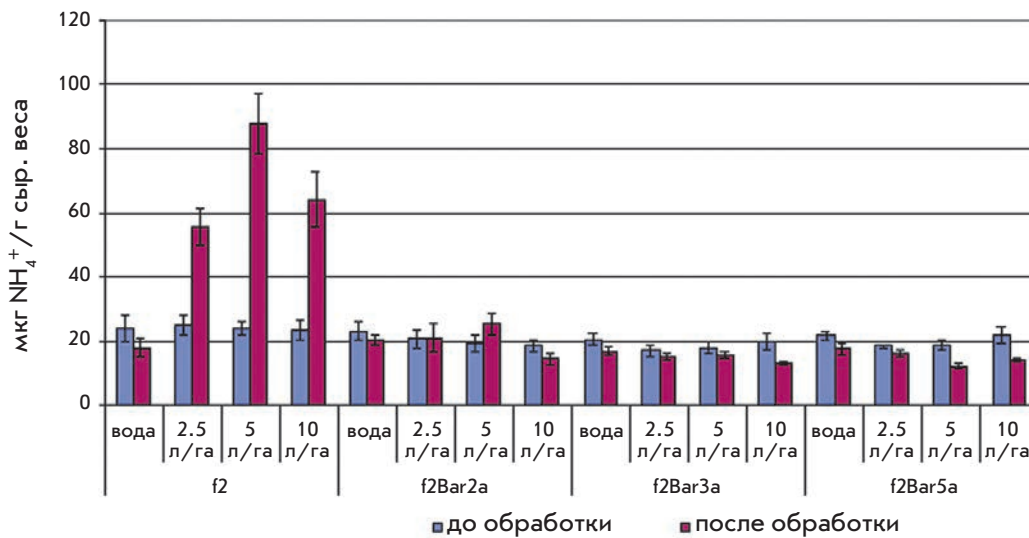


Рис. 4. Содержание аммонийного азота в листьях растений осины генотипа f2 до и после обработки гербицидом Basta

ра опускалась до -12.6°C , что примерно на 10°C ниже среднегодовых значений (рис. 6).

Как выяснилось весной после распускания почек, такое похолодание вызвало частичное подмерзание однолетних побегов или даже полную гибель растений (рис. 7). Генотип f2 показал значительно более низкую зимостойкость, чем генотип Pt. Растения линии f2ХIВар5а вымерзли полностью, у всех растений линии f2ХIВар3а отмечено подмерзание побегов (в среднем 22.9% длины), и только у линии f2ХIВар2а и в контроле около половины растений не получили никаких повреждений. Не погибли растения с генотипом Pt, а доля подмерзших составила 41.2–70.6% с более низкой степенью подмерзания побегов.

ОТ-ПЦР-анализ тотальной РНК пяти выживших после перезимовки трансгенных линий осины выявил

положительный сигнал ожидаемого размера у всех линий, что подтверждает транскрипцию гена *bar* (рис. 8). В нетрансгенных растениях обоих генотипов транскрипция гена *bar* не обнаружена.

Перезимовавшие растения пяти трансгенных линий осины и исходных генотипов в 2015 г. были повторно обработаны гербицидом Basta (погибшие контрольные растения заменили резервными). Развитие симптомов поражения у двулетних нетрансгенных растений было несколько замедлено по сравнению с однолетними в 2014 г. – через 3 дня после обработки гербицидом в дозе, эквивалентной 2.5 и 5 л/га, на части листьев еще оставались живые участки ткани (поражение четыре балла). Однако через 7 дней после обработки все листья нетрансгенных растений были полностью некроти-

Рис. 5. Высота растений осины в конце вегетационного сезона 2014 г.

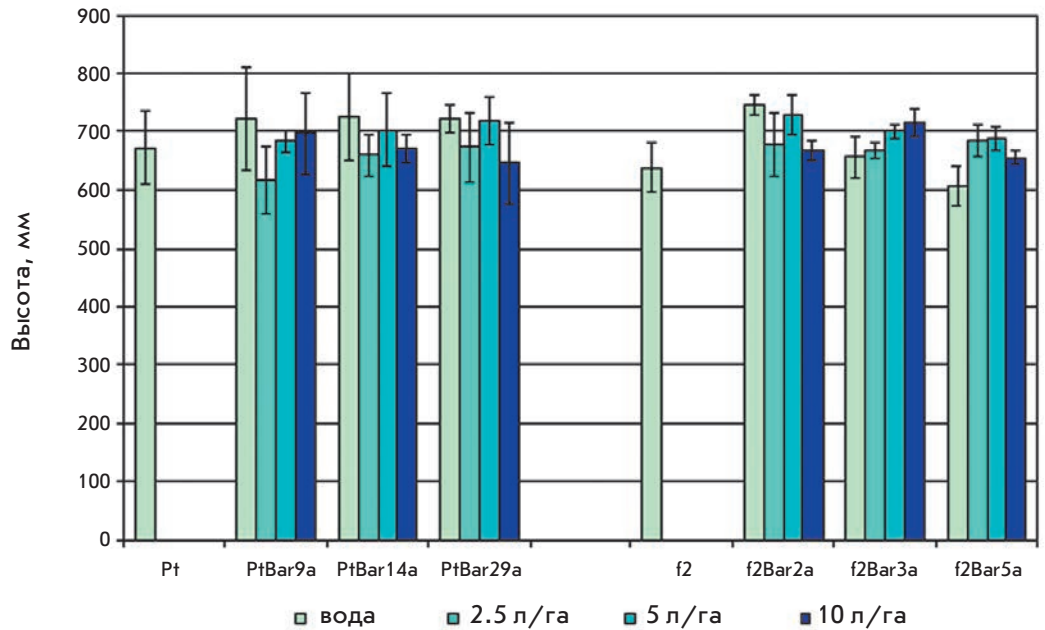
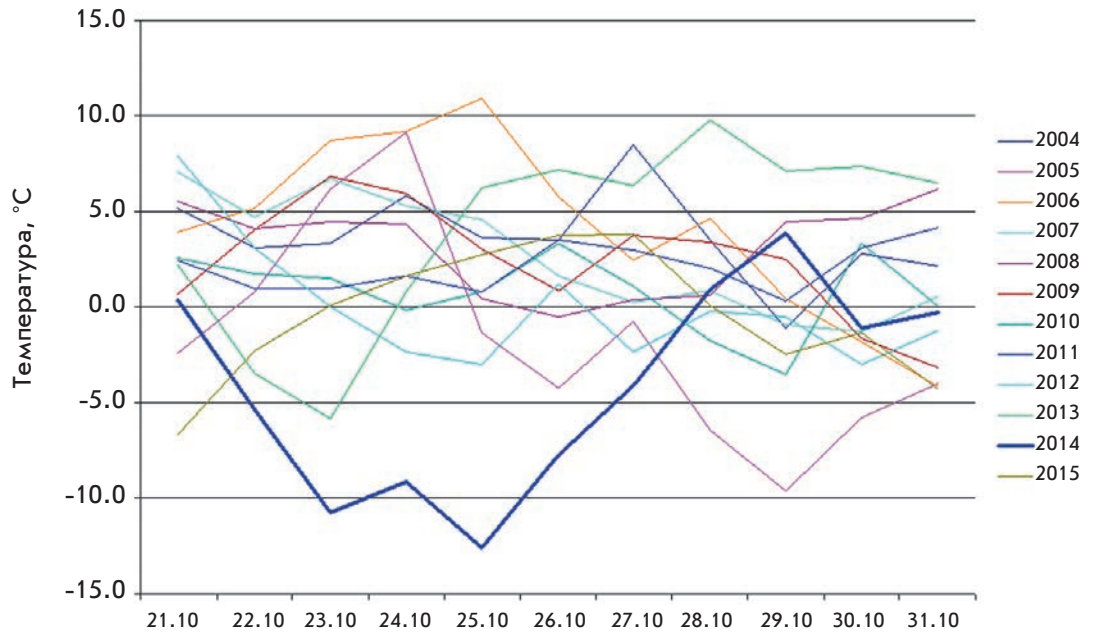


Рис. 6. Значения минимальных температур 3-й декады октября 2004–2015 гг. в Пущино



зированы (рис. 9). Не наблюдалось заметных различий в устойчивости трансгенных линий. Все растения были полностью устойчивыми к дозе 2.5 л/га. Обработка 5 л/га не вызвала симптомов поражения через 3 сут, через 7 сут на единичных листьях появились мелкие пятна некроза размером до 1 мм, через 14 сут симптомы поражения в виде пятен или полосок некроза вдоль краев листа не более

1 мм в ширину отмечены примерно у 25% всех листьев. Эффект от обработки двойной полевой дозой (10 л/га) был выражен сильнее: мелкие пятна некроза на отдельных листьях обнаружены уже на 3-й день после обработки, через 7 дней было поражено до трети всех листьев, а через 14 дней – около половины. В этом варианте мелкие пятна некроза (до 1–2 мм в диаметре) наблюдали в основном у краев

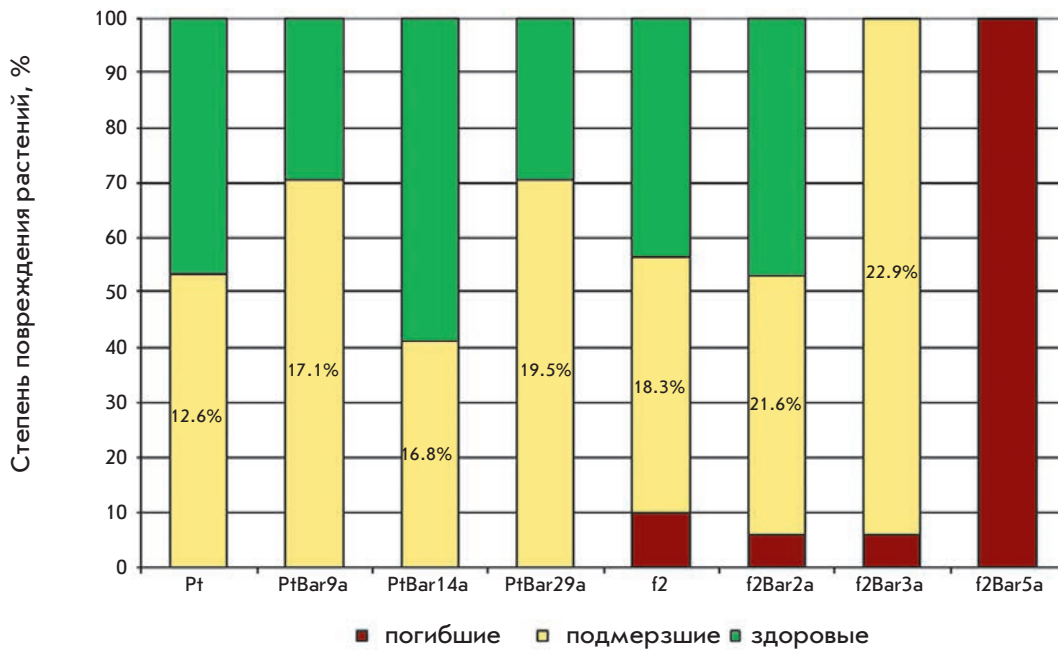


Рис. 7. Зимостойкость растений осины (степень повреждения побегов, %)

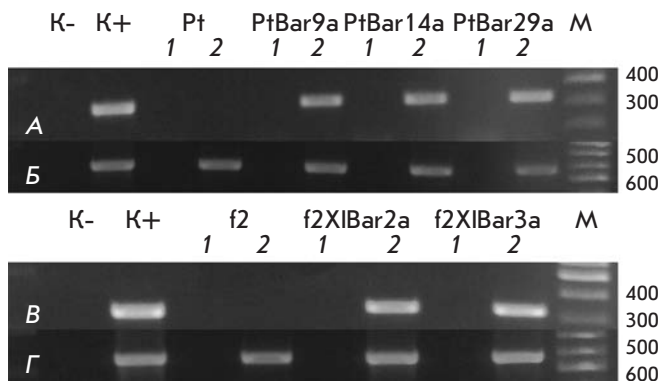


Рис. 8. ОТ-ПЦР-анализ экспрессии генов *bar* (А, В) и актина (Б, Г) в растениях осины генотипов Pt (А, Б) и f2 (В, Г). К- – вода; К+ – ДНК нетрансгенной осины (актин) или pVlBar (*bar*); 1 – РНК трансгенных линий; 2 – кДНК трансгенных линий; М – молекулярный маркер



Рис. 9. Двулетние растения осины генотипа f2 через 7 дней после обработки гербицидом Basta: слева – нетрансгенный контроль, справа – линия f2XlBar2a (в каждой группе слева направо – вода, 2.5, 5, 10 л/га)

листа, только у некоторых листьев в верхней части побегов (2–3 листа на растение) некроз занимал до 10–15% площади. После 14 дней дальнейшего развития симптомов поражения не наблюдалось.

На основе проведенных исследований отобрали четыре трансгенные линии, PtXlBar9a, PtXlBar14a, PtXlBar29a и f2XlBar2a, обладающие высокой устойчивостью к гербициду с ФФТ и максимальным уровнем зимостойкости.

ОБСУЖДЕНИЕ

Современные лесные плантации представляют собой искусственные насаждения интенсивного типа, предназначенные для получения специализированного сырья с продуктивностью, значительно превышающей продуктивность природных лесов. Такой эффект достигается несколькими способами, например, использованием элитных генотипов, в том числе и трансгенных, например, в апреле 2015 г. в Бразилии

одобрено коммерческое использование трансгенного эвкалипта с ускоренным ростом [24]. Немаловажное значение имеет и качественный уход, а также закладка плантаций высококачественным посадочным материалом, выращивание которого в питомниках невозможно без борьбы с сорняками. Химический способ борьбы позволяет увеличить выход посадочного материала и повысить его качество, существенно снизив при этом трудовые и денежные затраты. Придание устойчивости к гербицидам методами генной инженерии позволяет упростить борьбу с сорняками химическим способом, не повреждая при этом культурные растения. С этой целью в растения осины был встроены ген *bar* из почвенной бактерии *S. hygrosopicus* [9]. Этот ген не только придает устойчивость к гербицидам на основе ФФТ, но и является одним из наиболее широко используемых в генной инженерии селективных генов [25]. Кроме того, в отличие от большинства других генов устойчивости к гербицидам, ген *bar* обеспечивает инактивацию действующего вещества гербицида.

Для трансформации мы использовали элитные генотипы осины российского происхождения, отличающиеся ускоренным ростом и устойчивостью к сердцевинной гнили. Например, насаждения клона 34 (исходный материал для культуры *in vitro* генотипа f2) в возрасте 47 лет превосходили насаждения обычной осины по сумме площадей сечений на 51%, по запасу – на 43%, а доля деревьев со ствольными гнилями у этого клона была ниже в 4.7 раза [26]. Методом ПЦР встраивание гена *bar* подтверждено у 13 трансформантов. Эксперимент *in vitro* показал устойчивость всех трансгенных линий к летальной для нетрансгенных растений концентрации ФФТ в среде, что подтверждает экспрессию встроенного гена. Дальнейшие испытания устойчивости растений осины к гербицидам проводили в полунатуральных условиях: рост корневой системы ограничен объемом посадочного контейнера, но растения находятся в открытом грунте и подвержены всем воздействиям окружающей среды. В настоящее время это наиболее приближенный к естественным условиям уровень работы с трансгенными растениями, доступный в России, так как полевые испытания не проводятся уже около 10 лет. Растения обрабатывали или водой, или гербицидом Basta в дозах, эквивалентных 2.5, 5 и 10 л/га. Этот гербицид в дозе 1.5–2.5 л/га используется в качестве десиканта, а 4–5 л/га – в качестве гербицида. Таким образом, максимальная концентрация соответствовала двойной полевой дозе. Для оценки стабильности перенесенного признака обработку проводили в течение 2014 и 2015 гг. после перезимовки в естественных условиях.

Обработка однолетних растений показала, что осина очень чувствительна к ФФТ – уже через 3 сут все листья нетрансформированного контроля были полностью некротизированы. О высокой чувствительности к ФФТ растений рода *Populus* сообщалось ранее: полный некроз листьев *P. alba* наблюдали уже через 2 дня после обработки стандартной полевой дозой гербицида [3]. В отличие от контроля, трансгенные растения осины, несущие ген *bar*, показали высокую степень устойчивости – обработка 5 и 10 л/га приводила к образованию незначительных пятен некроза. Гербицид не вызвал ослабления роста ни одной из шести линий осины, тогда как в работе Meilan и соавт. [6] снижение роста наблюдали у 25% линий гибридов *Populus*, обработанных однократной дозой и у 17–61% – двукратной. Другие деревья с геном *bar* также проявляли высокую степень устойчивости: к двукратной дозе гербицидов с ФФТ были устойчивы растения эвкалипта [11] и *P. alba* [3]. Мы наблюдали различия между генотипами в реакции на обработку гербицидом: признаки поражения у трансгенных линий на основе генотипа Pt были выражены в большей степени, чем генотипа f2. Наши растения *P. tremula*, погибшие после обработки 375 г/га ФФТ, оказались более чувствительными к ФФТ, чем гибрид *P. alba* × *P. tremula*, который выжил после обработки 400 г/га ФФТ [10].

В клетках растений аммоний, выделяемый при восстановлении нитрата, деградации аминокислот и фотодыхании, эффективно детоксифицируется только глутаминсинтетазой [7], поэтому растения очень чувствительны к ингибиторам этого фермента, одним из которых является ФФТ. Накопление аммония в растениях, обработанных ФФТ, широко используется в качестве биохимического маркера ингибирования глутаминсинтетазы [27]. В однолетних нетрансгенных растениях осины через 3 сут после обработки содержание аммония увеличилось в 2.2–4.6 раза в зависимости от дозы и генотипа. По-видимому, генотип Pt более чувствителен к действию гербицида (рост в 2.7–4.6 раза), чем f2 (рост в 2.2–3.7 раза). Наблюдаемое нами повышение содержания аммония у осины было значительно менее выражено, чем у гибрида *P. alba* × *P. tremula*, когда через 24 ч содержание выросло почти в 100 раз – с 9 до 800–900 мкг/г сырого веса [10]. Это можно объяснить различиями в генотипах, времени после обработки – 72 и 24 ч, дозе ФФТ – 0.375–1.5 и 4 кг/га и скорости метаболизма, связанной с возрастом растений и нахождением в теплице или на открытой площадке. Во всех шести трансгенных линиях осины обработка гербицидом не привела к существенному повышению уровня аммония, довольно сходному во всех вариантах (12.4–27.0 мкг/г сырого веса). Этим наши ре-

зультаты отличаются от данных работы Asano и соавт. [28], которые наблюдали примерно 10-кратный разброс в содержании аммония в шести трансгенных линиях *Agrostis*, несущих ген *bar*, через 3 дня после обработки гербицидом, почти достигавший уровня нетрансгенных растений. У нас же, наоборот, в большинстве вариантов содержание аммония снизилось, и в трех вариантах, где снижение составило 34–36% (f2X1Bar3a после 10 л/га и f2X1Bar5a после 5 и 10 л/га), оно было значимым. Возможно, это связано с какими-то процессами, протекавшими в этот 3-дневный период, например с включением аммония в азотный метаболизм. Высокие дозы гербицида, вызвавшие некроз на листьях трансгенных растений, не отразились на содержании аммония.

Считается, что токсичность накапливаемого аммония является основным фактором гербицидной активности ФФТ [8, 29]. С другой стороны, показано, что действие гербицида обусловлено, главным образом, не накоплением аммония, а отсутствием глутаминна, что делает невозможным синтез важнейших азотсодержащих соединений, образующихся из амидного и аминного азота глутаминна [30]. Учитывая полный некроз листьев нетрансгенных растений осины при повышении уровня аммония всего в 2.2 раза, отсутствие взаимосвязи между поражением листьев и уровнем аммония у трансгенных растений, а также способность растений выживать при многократном повышении уровня аммония [31], можно предположить, что фитотоксичность аммония не является основной причиной гибели осины после обработки ФФТ.

Для оценки чувствительности к ФФТ использовали такой показатель, как снижение сырой [8] или сухой [32] массы. Так как гербицид Basta применяется и в качестве десиканта, мы решили использовать показатель обезвоживания листовой ткани. Обработка гербицидом вызвала резкое обезвоживание нетрансгенных растений – содержание воды упало почти в 3 раза независимо от дозы. По-видимому, уже в дозе 2.5 л/га (стандартной для десикации) был достигнут некий физиологический предел обезвоживания. Появление пятен некроза на листьях трансгенных растений, обработанных гербицидом в дозе 5 и 10 л/га, не отразилось на содержании в них воды, которое колебалось в диапазоне 95–102% по сравнению со значениями до обработки всех растений, в том числе и обработанных водой. Стоит отметить, что у контрольных растений f2 влажность снизилась в меньшей степени (в 2.4–2.7 раза), чем у растений Pt (в 2.6–3 раза).

В середине–конце октября 2014 г. в Европейской России произошло резкое похолодание, которое наблюдалось впервые с 1982 г. [33]. Отрицательные

аномалии в этот период достигали 8–11°C, и температура соответствовала середине декабря. Незапланированные испытания осины на зимостойкость привели к гибели всех растений линии f2X1Bar5a и к подмерзанию всех растений линии f2X1Bar3a. Это позволяет предположить некие изменения в этих линиях, значительно снизившие их устойчивость к низким температурам в осенний период. Интересно, что из трех трансгенных линий генотипа f2 именно у двух наиболее пострадавших отмечено существенное снижение уровня аммония после обработки гербицидом. Уровень зимостойкости остальных четырех трансгенных линий осины был значительно выше и находился на уровне нетрансгенных растений обоих генотипов. Этот случай лишь раз подтверждает необходимость проведения полевых испытаний многолетних растений в течение длительного периода времени и в различных климатических зонах.

Помимо уровня экспрессии встроенных генов, для древесных растений особенно важна ее стабильность, так как они растут много лет, ежегодно подвергаясь сменам периодов покоя и роста, а также воздействию различных абиотических и биотических стрессов. Нестабильная экспрессия перенесенных генов и, как следствие, проявление новых признаков ставит под вопрос коммерческую ценность таких растений. Стабильную экспрессию гена *bar* в гибридах *Populus* в полевых условиях без затухания наблюдали на протяжении трех [34] или восьми лет [35]. Высокий уровень устойчивости к гербициду Basta сохранялся также у подвоя груши с геном *bar* на 5-й год выращивания в поле [36]. Однако в двулетних полевых испытаниях тополя с генами устойчивости к глифосату на второй год отмечено сильное усиление повреждений двух линий из 80 от обработки гербицидами, а в некоторых линиях выявлены морфологические изменения [6]. В нашей работе сильный абиотический стресс не вызвал снижения экспрессии гена *bar* в выживших растениях осины, что подтверждено анализом экспрессии методом ОТ-ПЦР. Двулетние трансгенные растения сохранили высокий уровень устойчивости и на второй год испытаний, но развитие симптомов поражения у них было замедлено, причем и у нетрансгенных контрольных растений тоже. Это может быть связано со значительно увеличившейся листовой поверхностью или меньшей восприимчивостью к гербициду по причине более развитой кутикулы. Именно малоразвитой кутикулой объясняют сниженную устойчивость гибридов *Populus* с геном *bar*, обработанных вскоре после высадки в поле [35], но через 8 лет эти растения показали высокую устойчивость. В пользу этой версии говорит и то, что в отличие от первого года, когда пятна некроза

были относительно равномерно распределены по поверхности листа, на растениях второго года симптомы поражения концентрировались по краям листа, где кутикула могла быть тоньше. Возможно также, что нанесенный гербицид стекал к краям листа.

Так как устойчивость к гербицидам у древесных растений важна в первые годы выращивания, то такие гены целесообразно встраивать в уже трансгенные растения. Например, впервые повторная трансформация древесных растений была проведена именно геном *bar* на уже трансгенных растениях груши, несущих ген *gus* [37]. Перспективность подобного направления в лесной биотехнологии подтверждается исследованиями компании ArborGen (США), в которых гены устойчивости к гербицидам перенесли в трансгенную линию эвкалипта АГЕН427 [38], содержащую гены холодоустойчивости и стерильности [39].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе элитных генотипов нами получен ряд трансгенных линий осины с геном *bar*, придающим

устойчивость к гербицидам, содержащим фосфиотрицин. Двухлетние испытания в полунатуральных условиях показали устойчивость полученных линий к двукратной полевой дозе гербицида Basta. По результатам этих испытаний отобраны четыре линии (PtXIVar9a, PtXIVar14a, PtXIVar29a, f2XIVar2a), обладающие не только высокой устойчивостью к гербицидам, но и к экстремально низким температурам. Эти растения перспективны для проведения дальнейших исследований, в частности полевых испытаний. Кроме того, ген *bar* может использоваться для встраивания в другие трансгенные древесные растения, полученные ранее в нашей лаборатории и уже проявившие ценные признаки, такие, как повышенная продуктивность и модификация состава древесины [40]. ●

*Работа выполнена при финансовой поддержке
Минобрнауки РФ (ГК № 14.М04.12.0009
от 27.06.2014).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Baum S., Weih M., Busch G., Krohier F., Bolte A. // *Landbauforschung*. 2009. V. 59. P. 163–170.
- Бубнов А.А. // *Труды СПбНИИЛХ*. 2014. № 3. С. 36–42.
- Confalonieri M., Belenghi B., Balestrazzi A., Negri S., Facciotto G., Schenone G., Delledonne M. // *Plant Cell Rep.* 2000. V. 19. P. 978–982.
- Fillatti J.J., Sellmer J., McCown B., Haissig B., Comai L. // *Mol. Gen. Genet.* 1987. V. 206. P. 192–199.
- Brasileiro A.C.M., Tournear C., Leple J.C., Combes V., Jouanin L. // *Transgenic Res.* 1992. V. 1. P. 133–141.
- Meilan R., Han K.-H., Ma C., DiFazio S.P., Eaton J.A., Hoiem E.A., Stanton B.J., Crockett R.P., Taylor M.L., James R.R., et al. // *Can. J. For. Res.* 2002. V. 32. P. 967–976.
- Mifflin B.J., Lea P.J. // *Annu. Rev. Plant Physiol.* 1977. V. 28. P. 299–329.
- Tachibana K., Watanabe T., Sekizawa Y., Takematsu T. // *J. Pestic. Sci.* 1986. V. 11. P. 33–37.
- De Block M., Botterman J., Vandewiele M., Dockx J., Thoen C., Gossel V., Movva N.R., Thompson C., van Montagu M., Lee-mans J. // *EMBO J.* 1987. V. 6. P. 2513–2518.
- De Block M. // *Plant Physiol.* 1990. V. 93. P. 1110–1116.
- Harcourt R.L., Kyo-zuka J., Floyd R.B., Bateman K.S., Tanaka H., Decroocq V., Llewellyn D.J., Zhu X., Peacock W.J., Dennis E.S. // *Mol. Breed.* 2000. V. 6. P. 307–315.
- González E., Gugliermoni C., Galvão M., Fagundes M., Ferreira M., Almeida G., Alves H., Gonsalves J., Silva F., Bentive-nha S., et al. // *BMC Proc.* 2011. V. 5 (Suppl. 7). P. 135.
- Alvarez R., Alvarez J.M., Humara J.M., Revilla A., Ordas R.J. // *Biotechnol. Lett.* 2009. V. 31. P. 1477–1483.
- Bishop-Hurley S.L., Zabkiewicz R.J., Grace L., Gardner R.C., Wagner A., Walter C. // *Plant Cell Rep.* 2001. V. 20. P. 235–243.
- Parasharami V.A., Naik V.B., von Arnold S., Nadgauda R.S., Clapham D.H. // *Plant Cell Rep.* 2006. V. 24. P. 708–714.
- Жигунов А.В., Шабунин Д.А., Бутенко О.Ю. // *Вестник ПГТУ. Серия: Лес. Экология. Природопользование*. 2014. № 4. С. 21–30.
- Lloyd G., McCown B. // *Proc. Int. Plant Prop. Soc.* 1981. V. 30. P. 421–427.
- Падегимас Л.С., Шульга О.А., Скрыбин К.Г. // *Молекулярная биология*. 1994. Т. 28. С. 437–443.
- Лебедев В.Г., Шестибратов К.А., Шадрин Т.Е., Булатова И.В., Абрамочкин Д.Г., Мирошников А.И. // *Генетика*. 2010. Т. 46. С. 1458–1466.
- Rogers S.O., Bendich A.J. *Plant Mol. Biol. Manual*. Kluwer Acad. Publ., 1994. P. 1–8.
- De Block M., De Brouwer D., Tenning P. // *Plant Physiol.* 1989. V. 91. P. 694–701.
- Weatherburn M. // *Anal. Chem.* 1967. V. 39. P. 971–974.
- Chang S., Puryear J., Cairney J.A. // *Plant Mol. Biol. Rep.* 1993. V. 11. P. 113–116.
- Nat. Biotechnol.* 2015. V. 33. P. 577. doi: 10.1038/nbt0615-577c.
- Green J.M., Micheal D.K. // *J. Agric. Food Chem.* 2011. V. 59. P. 5819–5829.
- Багаев С.Н., Багаев Е.С. // *Лесное хозяйство*. 1990. № 4. С. 45–48.
- Avila-Garcia W.V., Carol Mallory-Smith C. // *Weed Sci.* 2011. V. 59. P. 305–309.
- Asano Y., Ito Y., Fukami M., Sugiura K., Fujie A. // *Plant Cell Rep.* 1998. V. 17. P. 963–967.
- Pornprom T., Chompoo J., Grace B. // *Weed Biol. Management*. 2003. V. 3. P. 41–45.
- Евстигнеева З.Г., Соловьева Н.А., Сидельникова Л.И. // *Прикл. биохим. и микробиол.* 2003. Т. 39. С. 613–618.
- Petrović A., Yoshida Y., Ohmori T. // *J. Hort. Sci. Biotech.* 2009. V. 84. P. 181–186.
- Nolte S.A., Young B.G., Mungur R., Lightfoot D.A. // *Weed Res.* 2004. V. 44. P. 335–339.

33. Гидрометцентр, 03.11.2014, <http://meteoinfo.ru/news/1-2009-10-01-09-03-06/10052-03112014-2014->
34. Li J., Brunner A.M., Meilan R., Strauss S.H. // *Tree Physiol.* 2009. V. 29. P. 299–312.
35. Li J., Meilan R., Ma C., Barish M., Strauss S.H. // *West J. Appl. For.* 2008. V. 23. P. 89–93.
36. Lebedev V.G., Dolgov S.V. // *Acta Hort.* 2008. V. 800. P. 373–382.
37. Lebedev V.G., Skryabin K.G., Dolgov S.V. // *Acta Hort.* 2002. V. 596. P. 193–197.
38. Gulledge E., Judy C., Cunningham M. // AAIC 25th Anniversary Meeting, October 12–16, 2013, Washington, USA. <http://www.se-ibss.org/publications-and-patents/presentations/building-herbicide-resistance-for-short-rotation-hardwood-crops>
39. Zhang C., Norris-Caneda K.H., Rottmann W.H., Gulledge J.E., Chang S., Kwan B.Y., Thomas A.M., Mandel L.C., Kothera R.T., Victor A.D., et al. // *Plant Physiol.* 2012. V. 159. P. 1319–1334.
40. Shestibratov K., Lebedev V., Podrezov A., Salmova M. // *BMC Proc.* 2011. V. 5 (Suppl. 7). P. 124.