

УДК 575.162

## ПЕРЕНОС ТРАНСГЕНОВ *ARGOS-LIKE* И *AtEXPA10* В НЕТРАНСГЕННЫЕ ФОРМЫ ТАБАКА И ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ ИХ КОНСТИТУТИВНОЙ ЭКСПРЕССИИ

© 2013 г. **Б.Р. Кулуев, Е.В. Михайлова, А.В. Чемерис**

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук,  
Уфа, Россия, e-mail: kuluev@bk.ru

Поступила в редакцию 19 июня 2012 г. Принята к публикации 14 февраля 2013 г.

Путем переопыления трансгенных по генам *ARGOS-LIKE* и *AtEXPA10* растений *Nicotiana tabacum* сорта Petit Havana SR1 с *Nicotiana tabacum* сорта Черный кубинский и вида *Nicotiana rustica* были получены гибридные растения. Методом ОТ-ПЦР было показано, что гибридные растения характеризуются высоким уровнем экспрессии трансгенов *ARGOS-LIKE* и *AtEXPA10*, что фенотипически выражалось увеличением размеров их листьев и стебля. Органы как трансгенных, так и гибридных растений увеличивались за счет возрастания размеров отдельных клеток. Наследование трансгенов было стабильным, а их фенотипические проявления варьировали от незначительных до превышающих таковые в родительских трансгенных растениях.

**Ключевые слова:** *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana rustica*, *AtEXPA10*, *ARGOS-LIKE*, трансгенные растения, переопыление, клеточное растяжение, величина органов.

### ВВЕДЕНИЕ

Разработка методов создания трансгенных растений с увеличенными размерами органов является одним из новых направлений в растительной биотехнологии (Mizukami, Fischer, 2000; Hu *et al.*, 2003, 2006; Feng *et al.*, 2011). Для получения таких растений, например, могут быть использованы гены-регуляторы клеточного растяжения, так как увеличение размеров отдельных клеток приводит в конечном счете к увеличению размера органов (Cho, Cosgrove, 2000). Также для этих целей применяются гены, контролирующие число клеточных делений в зачатках органов (Mizukami, Fischer, 2000). Различные виды пасленовых широко используются в пищевых и декоративных целях. В связи с этим получение трансгенных растений этого семейства с увеличенными размерами органов является актуальной и коммерчески перспективной задачей. При этом, если методы получения трансгенных форм *Nicotiana*

*tabacum* определенных сортов, таких, как Petit Havana SR1 и других, относительно легко воспроизводимы, то же самое нельзя сказать про трансформацию других видов семейства пасленовых. Наиболее легким и быстрым способом получения трансгенных растений, относящихся к другим видам рода *Nicotiana*, может стать их переопыление с уже модифицированными табаками лабораторных сортов, которые были созданы в рамках фундаментальных исследований. Подобные эксперименты имеют значение как для проведения исследований процессов переопыления и фенотипических проявлений различных генов в гетерологичных условиях, так и в прикладных целях для получения гибридов хозяйственно важных трансгенных растений, которые могут оказаться носителями полезных генетических признаков.

Для получения трансгенных растений с измененными размерами органов в данной работе нами были использованы гены-регуляторы клеточного растяжения *ARGOS-LIKE* (*ARL*) и

*AtEXPA10*, выделенные из *Arabidopsis thaliana*. Белковый продукт гена *ARL* регулирует процессы клеточного роста (Hu *et al.*, 2006) и располагается на эндоплазматическом ретикулуме, и, видимо, относится к системе трансдукции фитогормональных сигналов от ауксинов и цитокининов к транскрипционным факторам (Feng *et al.*, 2011). Ген *AtEXPA10 A. thaliana* кодирует белок из семейства экспансинов и активно экспрессируется в черешках и трихомах растущих листьев, а также в базальной области черешка (Cho, Cosgrove, 2000). Благодаря своим способностям разрыхлять клеточную стенку, экспансины стимулируют клеточное растяжение и таким образом участвуют в контроле роста клеток и органов растений (Шарова, 2007). Нами ранее было показано ощутимое влияние сверхэкспрессии гена *AtEXPA10* на величину вегетативных органов трансгенных растений табака за счет увеличения размеров клеток (Кулуев и др., 2012). Сверхэкспрессия гена *ARL* также приводит к увеличению конечных размеров органов у трансгенных растений (Hu *et al.*, 2006). Однако для применения генов *AtEXPA10* и *ARL* на практике необходимы также знания об эффективности их передачи и сохранения их фенотипических проявлений в гетерологичных условиях в ряду поколений. В связи с этим целью данного исследования стало изучение передачи и фенотипических проявлений трансгенов *AtEXPA10* и *ARL* в растениях в условиях контролируемого эксперимента. Объектом морфологических исследований были трансгенные растения табака и гибриды, полученные в ходе скрещивания трансгенных растений *Nicotiana tabacum* L. Petit Havana SR1 с нетрансгенными табаками сорта Черный кубинский вида *Nicotiana tabacum* L. и табаками вида *Nicotiana rustica* L. (махорка).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были задействованы нетрансгенные растения сорта Черный кубинский вида *N. tabacum* L. производства ООО «Агрофирма АЭЛИТА-ФЛОРА» и махорки *N. rustica* L. производства ОАО «ФЛОРА», которые в ходе эксперимента опылялись пыльцой трансгенных растений табака *N. tabacum* L. сорта Petit Havana SR1, содержащих гены

*AtEXPA10* или *ARL A. thaliana*. Ген *AtEXPA10* (NM\_102440.3) амплифицировали из геномной ДНК *A. thaliana* при помощи праймеров AtEXPF AGACGTAACATGGGTCATC и AtEXPR TGCCCTTTTAAACGGAAGCTG. Ген *ARL* (NM\_180078.3) был амплифицирован из геномной ДНК *A. thaliana* при помощи праймеров ARLF CTTCTTTAAATGATTCGTGAG и ARLR TTATTACATAAAAAGTGGAAG. Целевые гены клонировали в бинарных векторах серии pCambia, содержащих селективный ген устойчивости к гиромоцину и 35S промотор вируса мозаики цветной капусты, контролирующей в векторе транскрипцию целевого гена. Вектор pCambia1301 с геном *AtEXPA10* содержал также репортерный ген *GUS*, кодирующий β-глюкуронидазу. Трансгенные формы табака получали методом агробактериальной трансформации листовых дисков (Gallois, Marinho, 1994). Первичные трансгенные T<sub>0</sub>-побеги отбирали на селективной среде МС (Murashige, Skoog, 1962) с добавлением 1 мг/л 6-БАП, 0,1 мг/л НУК, содержащей 25 мг/л гиромоцина (Hug). Перепыление нетрансгенных растений *N. tabacum* и *N. rustica* с трансгенными осуществляли искусственно путем нанесения пыльцы трансгенного табака на рыльце нетрансгенного растения одноразовой пластмассовой петлей. Перед этим проводилось изъятие тычинок цветков до образования на них пыльцы, чтобы предотвратить самоопыление. Для контроля наследования трансгенов семена, стерилизованные путем последовательного погружения в 70 %-й спирт и 15 %-ую белизну, проращивали на среде МС с добавлением гиромоцина. Сеянцы, в течение месяца погибавшие в чашках Петри, считались неимеющими гена устойчивости к гиромоцину. Сеянцы, активно растущие в чашках Петри, считались унаследовавшими ген устойчивости к антибиотику и пересаживались в почву. Все растения культивировали при температуре 25 °С с фотопериодом 16/8 ч (свет/темнота) и освещенностью около 10 клк в вегетационных сосудах объемом 450 мл, заполненных универсальным грунтом («Гера», Россия). Качественную оценку активности репортерного гена *GUS* в листьях растений определяли гистохимически при помощи субстрата x-gluc (Jefferson *et al.*, 1987). Из листьев исследуемых растений выделяли тотальную РНК, которую использовали в

качестве матрицы при построении первой цепи кДНК. Для ОТ-ПЦР гена *AtEXPA10* применили праймеры ATGGGTCATCTTGGGTTCTT и TTAACGGAACTGTCCACCGG. Для ОТ-ПЦР гена *ARL* использовали праймеры GGAGATCATAACCGGAAAAACACGAGT и AGAAGAA GGCATGAAAGCAAGAACCA. Для ОТ-ПЦР мРНК гена, кодирующего  $\alpha$ -тубулин табака, использовали праймеры tubAF CAAGGTGCAAAGGGCTGTATGTATGA и tubAR GCACCAACTTCCTCGTAATCCTTTTC. ОТ-ПЦР проводили в следующих условиях: начальная денатурация (94 °С, 2 мин); 30 циклов амплификации со следующими параметрами: денатурация – 94 °С, 40 с; 2) отжиг – 56 °С, 40 с; синтез – 72 °С, 30 с.

Затем проводили инкубацию при 72 °С в течение 2 мин. Для изучения влияния экспрессии целевого гена на размеры органов растения в период цветения производились измерения длины стебля, средней длины трех нижних листьев и размера коробочек. Размер выборки по каждому варианту контрольных и опытных растений составлял от 3 до 18. Нетрансгенные растения сорта Черный кубинский вида *N. tabacum* L. и махорки *N. rustica* L. были обозначены как контроль-1. Трансгенные растения *N. tabacum* L. сорта **Petit Havana SR1** обозначены как контроль-2. Гибриды растений сорта **Petit Havana SR1** с сортом Черный кубинский или с махоркой были обозначены как контроль-3 (табл. 1, 2).

Таблица 1

Данные сравнительного морфологического анализа трансгенных по гену *ARL* растений табака и гибридных растений табака сорта Черный кубинский (ЧК), полученных при переопылении

Группа растений	Размер выборки	Параметр		
		высота стебля, см	длина листьев, см	площадь клеток эпидермиса листьев, мкм <sup>2</sup>
Контроль-1	3	94,0 ± 2,4	19,5 ± 0,3	25049 ± 1208
Контроль-2	3	79,0 ± 3,0	17,9 ± 0,2	15514 ± 770
<i>N. tabacum</i> SR1/ARL	10	100,3 ± 6,2	22,0 ± 0,3	23528 ± 915
Контроль-3	3	98,0 ± 3,8	19,0 ± 0,8	13961 ± 281
Гибриды ЧК × SR1/ARL:				
поколение F <sub>1</sub>	16	106,7 ± 7,4	21,7 ± 1,0	27778 ± 2066
поколение F <sub>2</sub>	8	111,0 ± 5,6	23,3 ± 0,5	39812 ± 1505

Таблица 2

Данные сравнительного морфологического анализа трансгенных по гену *AtEXPA10* растений табака с гибридными растениями *N. rustica*, полученных при переопылении

Группа растений	Размер выборки	Параметр		
		высота стебля, см	длина листа, см	площадь клеток эпидермиса листьев, мкм <sup>2</sup>
Контроль-1	3	45 ± 4	11,1 ± 0,8	16265 ± 804
Контроль-2	3	79 ± 3	17,9 ± 0,6	15514 ± 770
<i>N. tabacum</i> SR1/AtEXPA10	8	102 ± 3	21,0 ± 0,6	19330 ± 592
Контроль-3	3	44 ± 2	11,5 ± 0,5	16344 ± 702
Гибрид <i>N. rustica</i> /AtEXPA10 № 1	4	66 ± 3	15,3 ± 0,5	66690 ± 5985
Гибрид <i>N. rustica</i> /AtEXPA10 № 2	4	48 ± 2	11,0 ± 0,4	29870 ± 696
Гибрид <i>N. rustica</i> /AtEXPA10 № 3	4	56 ± 4	13,0 ± 0,3	48830 ± 3574
Гибрид <i>N. rustica</i> /AtEXPA10 № 4	4	37 ± 3	10,0 ± 0,9	32939 ± 1233
Гибрид <i>N. rustica</i> /AtEXPA10 № 5	4	42 ± 5	9,0 ± 0,8	33861 ± 2313

Согласно литературным данным в случае конститутивной экспрессии генов *ARL* и *AtEXPA10* *A. thaliana* увеличиваются размеры клеток как эпидермиса, так и мезофилла листьев (Cho, Cosgrove, 2000; Hu *et al.*, 2006). Поэтому было решено анализировать лишь размеры клеток нижнего эпидермиса листьев табака, так как измерение размеров клеток мезофилла более трудоемко и занимает много времени. Определение размеров и количества клеток нижнего эпидермиса листьев проводили при помощи универсального флюоресцентного микроскопа модели Axio Imager M1 (Carl Zeiss, Германия) с использованием оригинального программного обеспечения.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

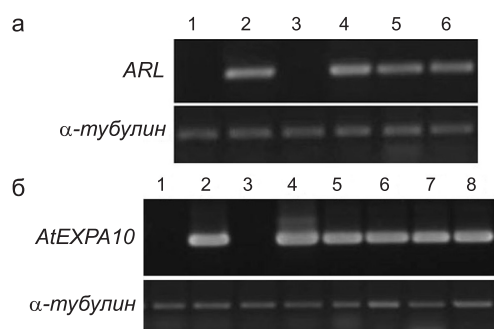
### Получение и анализ трансгенных растений *N. tabacum* сорта Petit Havana SR1, экспрессирующих гены *ARL* и *AtEXPA10* *A. thaliana*

Ген *ARL* был клонирован в бинарном векторе pCambia 1305.1, и на основе данной конструкции было получено 7 линий трансгенных растений табака, сеянцы которых на селективной среде демонстрировали соотношение выживших и погибших 3 : 1. В период цветения опытные растения по длине листьев и высоте стебля превосходили контрольные растения (контроль-2) в среднем на 23 и 27 % соответственно (табл. 1). Размеры клеток эпидермиса листьев у линий опытных растений были увеличены в среднем на 52 % по сравнению с контролем (контроль-2). На основе бинарного вектора pCambia 1301 нами ранее было получено 6 линий трансгенных по гену *AtEXPA10* растений табака (Кулуев и

др., 2012). В период цветения эти трансгенные растения второго поколения отличались увеличением длины листьев на 17 % и высоты стебля на 29 %, по сравнению с контролем-2 (табл. 2). Размеры клеток эпидермиса листьев у опытных растений увеличивались в среднем на 25 %. Методом ОТ-ПЦР было показано, что анализируемые трансгенные растения характеризуются высоким уровнем экспрессии целевых генов *ARL* и *AtEXPA10* (рис. 1).

### Морфологический анализ гибридных растений табака *N. tabacum* сорта Черный кубинский, экспрессирующих ген *ARL*

Для скрещивания с табаком сорта Черный кубинский использовали трансгенные по гену *ARL* растения табака сорта Petit Havana SR1, при этом переопыление происходило эффективно и без каких-либо препятствий. Образовавшиеся коробочки по размеру и количеству семян не отличались от таковых у родительских растений. Из 600 высеянных семян на среде с селективным антибиотиком возшло 85 %, причем 2/3 проростков были устойчивы к гигромицину. К условиям почвы было успешно акклиматизировано 16 гибридов табака Черный кубинский. В результате их самоопыления были также получены 8 растений второго поколения, которые проявили устойчивость к гигромицину. Для исключения влияния гетерозиса на размеры органов при морфологическом анализе в качестве контроля были использованы гибриды растений табака Черный кубинский с нетрансгенными растениями сорта Petit Havana SR1 (контроль-3). Некоторые линии опытных гибридных растений отличались значительным увеличением размеров органов, но в среднем



**Рис. 1.** Электрофореграммы результатов ОТ-ПЦР генов *ARL* и *AtEXPA10*.

а – экспрессия генов *ARL* и  $\alpha$ -тубулина в контрольных и опытных растениях. 1 – *N. tabacum* Petit Havana SR1; 2 – трансгенный по гену *ARL* *N. tabacum* Petit Havana SR1; 3 – *N. tabacum* сорта Черный кубинский; 4–6 – растения *N. tabacum* сорта Черный кубинский, переопыленные с трансгенными по гену *ARL* растениями *N. tabacum* Petit Havana SR1; б – экспрессия генов *AtEXPA10* и  $\alpha$ -тубулина в контрольных и опытных растениях. 1 – *N. tabacum* Petit Havana SR1; 2 – трансгенный по гену *AtEXPA10* *N. tabacum* Petit Havana SR1; 3 – *N. rustica*; 4–8 – растения *N. rustica*, переопыленные с трансгенными по гену *AtEXPA10* *N. tabacum* Petit Havana SR1.

гибриды первого поколения характеризовались увеличением высоты стебля на 9 %, а длины листьев – на 14 % (табл. 1). В то же время площади клеток эпидермиса листьев у всех гибридных растений были намного больше, чем у контрольных (контроль-3), и разница в среднем составила около 100 % (табл. 1). У гибридов второго поколения стебли были длиннее на 13 %, листья на 23 %, а клетки эпидермиса листьев на 185 % больше, чем у контрольных растений. Гибридные растения, имеющие относительно небольшие размеры листьев (12–14 см), характеризовались меньшей величиной клеток (в среднем 27993 мкм<sup>2</sup>). В целом размеры отдельных клеток эпидермиса у всех гибридных растений увеличивались в гораздо большей степени, чем размеры органов (табл. 1).

Для подтверждения эффективности передачи трансгенов был проведен ПЦР-анализ гибридов второго поколения. Во всех анализированных растениях содержался ген *ARL*. В гибридных растениях, характеризующихся увеличенными размерами органов, был зафиксирован высокий уровень экспрессии гена *ARL* (рис. 1, а).

#### Морфологический анализ гибридных растений табака *N. rustica*, экспрессирующих ген *AtEXPA10*

Для скрещивания с *N. rustica* использовались трансгенные по гену *AtEXPA10* растения *N. tabacum* сорта Petit Havana SR1. Около половины попыток переопыления не увенчались успехом. В результате было получено 20 коробочек, имеющих в среднем по 35 семян, что на порядок меньше количества семян, образующихся в результате самоопыления. Размеры коробочек с гибридными семенами были значительно меньше – 0,5 × 0,3 см, тогда как коробочки контрольного растения *N. rustica* имели размеры в среднем 1 × 1 см (рис. 2, а). Для дальнейшей работы была отобрана наиболее крупная коробочка (рис. 2, б), всхожесть содержащихся в ней семян при посеве на среду с селективным антибиотиком составила 61 %. Полученные проростки были использованы для морфологического анализа.

Пять растений были пересажены на почву и выращивались до стадии цветения. Затем были получены 5 линий гибридов второго

поколения, у которых были проведены измерения основных морфологических параметров (табл. 2) и анализ активности репортерного гена *GUS*. В качестве контроля использовали гибридные между нетрансгенными формами *N. tabacum* и *N. rustica* растения табака (контроль-3). Для морфологического анализа по каждому варианту растений было использовано по 3–4 растения.

Гибридные растения имели фенотип *N. rustica*, но с утолщенными листьями (рис. 3, з). По длине стебля и листьев лишь гибридные растения № 1 и № 3 характеризовались их значительным увеличением (табл. 2). Размеры органов других гибридов лишь немного превосходили или соответствовали контрольным растениям. Гистохимический анализ показал наличие активности гена *GUS* в гибридах № 1, № 3 и № 5 (рис. 3, ж). Эти же растения характеризовались наиболее значительным увеличением размеров клеток эпидермиса листьев (рис. 3, б, г, е). Увеличение размеров клеток наблюдалось и у двух *GUS*-отрицательных гибридов, но в гораздо меньшей степени (рис. 3, в, д).

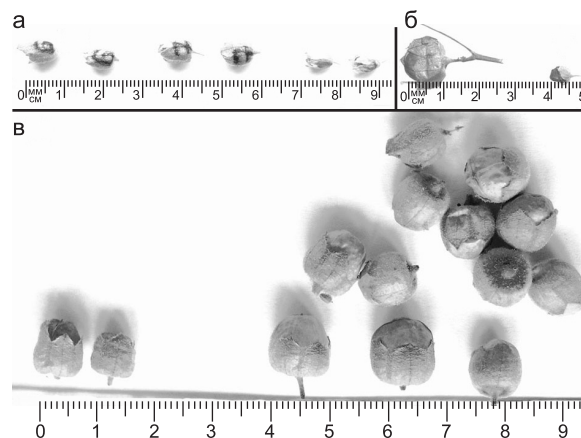
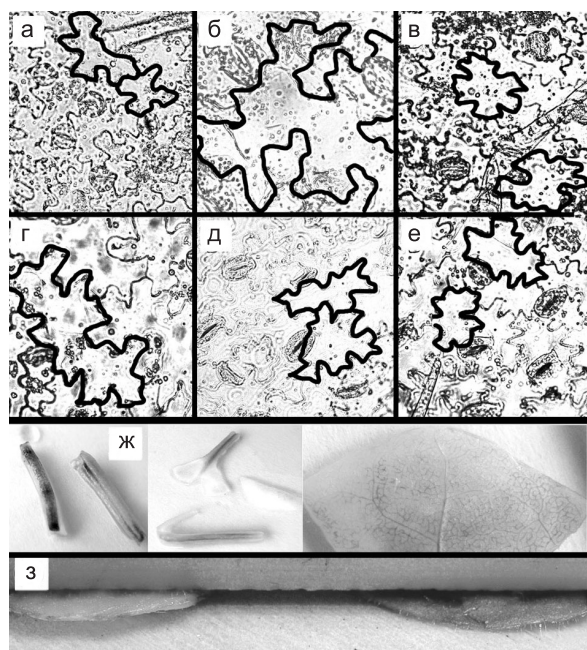


Рис. 2. Сравнение коробочек гибридных и диких форм растений *N. rustica*.

а – коробочки, полученные в результате опыления родительского нетрансгенного растения *N. rustica* пыльцой трансгенного по гену *AtEXPA10* табака Petit Havana SR1, семена которых оказались невсхожими; б – наиболее крупная коробочка, полученная в результате опыления родительского нетрансгенного растения *N. rustica* пыльцой трансгенного растения с геном *AtEXPA10* (слева), и коробочка, не содержащая семян (справа); в – коробочки, полученные в результате самоопыления родительского нетрансгенного растения *N. rustica* (слева), и коробочки, полученные в результате самоопыления гибридных растений *N. rustica* (справа).



**Рис. 3.** Морфологическая характеристика трансгенных по гену *AtEXPA10* и гибридных растений табака.

Клетки нижнего эпидермиса листьев (а–е): а – контрольное растение *N. rustica*; б – гибрид трансгенного растения и *N. rustica* № 1; в – гибрид № 2; г – гибрид № 3; д – гибрид № 4; е – гибрид № 5; ж – активность репортерного гена *GUS* в черешках и жилках листьев гибридных растений; з – сравнение толщины листьев *N. rustica* (справа) и ее гибрида с трансгенным растением (слева).

В среднем размеры клеток эпидермиса листьев у гибридных растений были увеличены на 160 % (табл. 2). Корреляции между размерами органов и величиной отдельных клеток в данном случае не обнаруживалось. Например, большие размеры клеток были характерны для гибридных растений № 5, но размеры их органов соответствовали контрольным растениям (табл. 2). Полученные гибриды также отличались увеличенным размером коробочек по сравнению с коробочками, полученными в результате самоопыления родительского нетрансгенного растения (рис. 2, в). Методом ПЦР было показано наличие репортерного гена *GUS* и целевого гена *AtEXPA10* во всех анализируемых гибридных растениях. Для 5 линий гибридных растений был проведен анализ экспрессии трансгена *AtEXPA10*, причем наибольшее количество мРНК целевого гена было характерно для гибридов № 1 (рис. 1, б,

4-я дорожка), которые отличались наибольшей степенью увеличения размеров клеток и органов.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Конститутивная экспрессия генов *ARL* и *AtEXPA10* в гетерологичных условиях так же, как и у *A. thaliana* (Cho, Cosgrove, 2000; Hu *et al.*, 2006), приводит к увеличению конечных размеров ряда органов. При этом в трансгенных растениях стимулируется в первую очередь клеточное растяжение, а количество клеток, наоборот, уменьшается. Видимо, в растениях существует компенсаторный механизм, регулируемый фитогормонами и транскрипционными факторами, который позволяет растениям поддерживать размеры органов, близкие к норме, несмотря на значительное увеличение размеров отдельных клеток. Несмотря на это, гены *ARL* и *AtEXPA10* все же могут быть применены на практике для получения хозяйственно важных растений с крупными размерами листьев и стебля, но, судя по нашим данным, степень увеличения органов, скорее всего, не будет превосходить 30 %. Для более существенного увеличения размеров органов, видимо, необходимо также стимулировать клеточное деление в зачатках органов (Mizukami, Fischer, 2000; Hu *et al.*, 2003) и в апикальной меристеме побега (Lenhard *et al.*, 2002), а также повышать уровень эндоредупликации (Sugimoto-Shirasu *et al.*, 2005). Кроме того, необходимо учитывать эффективность фотосинтеза, дыхания, биосинтеза белка и компонентов клеточной стенки, а также устойчивость растения к многочисленным неблагоприятным факторам среды.

Причиной увеличения размеров органов у полученных нами гибридных растений, видимо, являлся именно повышенный уровень экспрессии генов *ARL* и *AtEXPA10*, а не гетерозис, так как скрещивание нетрансгенных форм исследуемых сортов табака в наших исследованиях не приводило к увеличению длины листьев и, более того, иногда способствовало уменьшению размеров клеток (табл. 1). При переопылении трансгенных растений табака *N. tabacum* Petit Havana SR1 с другими видами и сортами табаков экспрессия трансгенов сохранялась на высоком уровне, а

их фенотипические проявления варьировали от незначительных до превышающих таковые в родительских трансгенных растениях. Это означает, что переопыление в принципе можно использовать в качестве одного из простых методов создания трансгенных форм растений, при этом их даже не надо вводить в культуру *in vitro*. Активность гена устойчивости к гигромицину в гибридах проявлялась гораздо чаще, чем активность репортерного гена *GUS*. Это, однако, не означает раздельную передачу этих двух маркерных генов в ходе переопыления, так как ПЦР-анализ показал наличие гена *GUS* в анализируемых гибридных растениях. Видимо, у части гибридных растений уровень экспрессии гена *GUS* сильно снижался или блокировался, несмотря на его наличие в геноме. Интересно отметить, что именно у гибридных растений с детектируемой активностью гена *GUS* наблюдалось более выраженное фенотипическое проявление целевого гена-регулятора клеточного растяжения. В результате переопыления представителей одного вида (*N. tabacum*) оплодотворение всегда было эффективным. При скрещивании же двух разных видов (*N. tabacum* и *N. rustica*) оплодотворение происходило гораздо реже и семян образовывалось меньше, чем при самоопылении. Методами ПЦР и ОТ-ПЦР были доказаны наличие и экспрессия целевых генов у гибридов второго поколения, что подтверждает возможность использования полученных нами трансгенных растений табака на практике, например, для декоративных целей или повышения урожайности.

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

## ЛИТЕРАТУРА

- Кулуев Б.Р., Князев А.В., Лебедев Я.П., Чемерис А.В. Морфофизиологическая характеристика трансгенных растений табака, экспрессирующих гены экспансинов *AtEXPA10* арабидопсиса и *PnEXPA1* тополя // Физиология растений. 2012. Т. 59. № 1. С. 108–117.
- Шарова Е.И. Экспансины – белки, размягчающие клеточные стенки в процессе роста и морфогенеза растений // Физиология растений. 2007. Т. 54. № 6. С. 805–819.
- Cho H.T., Cosgrove D.J. Altered expression of expansin modulates leaf growth and pedicel abscission in *Arabidopsis thaliana* // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. P. 9783–9788.
- Feng G., Qin Z., Yan J. *et al.* *Arabidopsis* *ORGAN SIZE RELATED1* regulates organ growth and final organ size in orchestration with ARGOS and ARL // New Phytologist. 2011. V. 191. P. 635–646.
- Gallois P., Marinho P. Leaf disk transformation using *Agrobacterium tumefaciens*-expression of heterologous genes in tobacco // Methods Mol. Biol. 1994. V. 49. P. 39–48.
- Hu Y., Poh H., Chua N. The Arabidopsis *ARGOS-LIKE* gene regulates cell expansion during organ growth // Plant J. 2006. V. 47. P. 1–9.
- Hu Y., Xie Q., Chua N. The Arabidopsis auxin-inducible gene *ARGOS* controls lateral organ size // Plant Cell. 2003. V. 15. P. 1951–1961.
- Jefferson R.A. Assaying chimeric genes in plants: the *GUS* gene fusion system // Plant Mol. Biol. Rep. 1987. V. 5. P. 387–405.
- Lenhard M., Jurgens G., Laux T. The *WUSCHEL* and *SHOOT-MERISTEMLESS* genes fulfil complementary roles in Arabidopsis shoot meristem regulation // Development. 2002. V. 129. P. 3195–3206.
- Mizukami Y., Fischer R.L. Plant organ size control: AINTEGUMENTA regulates growth and cell numbers during organogenesis // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. P. 942–947.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. V. 15. P. 473–497.
- Sugimoto-Shirasu K., Roberts G.R., Stacey N.J. *et al.* *RHL1* is an essential component of the plant DNA topoisomerase VI complex and is required for ploidy-dependent cell growth // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. P. 18736–18741.

**TRANSFER OF *ARGOS-LIKE* AND *AtEXPA10* GENES  
INTO NONTRANSGENIC FORMS OF TOBACCO  
AND PHENOTYPIC EFFECTS OF THEIR CONSTITUTIVE EXPRESSION**

**B.R. Kuluev, E.V. Mikhaylova, A.V. Chemeris**

Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center of RAS, Ufa, Russia,  
e-mail: kuluev@bk.ru

**Summary**

Hybrid plants were obtained by pollination of *Nicotiana rustica* and *Nicotiana tabacum* Black Cuban cultivar with pollen of transgenic *Nicotiana tabacum* plants of Petit Havana SR1 cultivar bearing the *ARGOS-LIKE* and *AtEXPA10* genes. RT-PCR analysis showed high levels of *ARGOS-LIKE* and *AtEXPA10* expression in the hybrids. It led to an increase in the sizes of their leaves and stems. Organs of both transgenic and hybrid plants were enlarged due to the enlargement of individual cells. The inheritance was stable, but the phenotypic effects varied from insignificant to levels exceeding those in parental transgenic plants.

**Key words:** *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana rustica*, *ARGOS-LIKE*, *AtEXPA10*, transgenic plants, cross-pollination, cell expansion, organ size.