

С. В. Кубрак, мл. науч. сотрудник ИГиЦ НАН Беларуси;
Л. В. Хотылева, гл. науч. сотрудник ИГиЦ НАН Беларуси;
О. С. Игнатовец, мл. науч. сотрудник;
В. В. Титок, зав. лабораторией ИГиЦ НАН Беларуси

АГРОБАКТЕРИАЛЬНАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ СОРТОВ ЛЬНА-ДОЛГУНЦА

Process of reception of genetically changed organisms concerns to actively developing directions of biotechnology of agricultural crops and allows to manipulate more purposefully with genome of higher plants. Results of carried out research have shown, that conditions of growth of plants *in vitro* and structure of nutrient mediums have been chosen optimum for successful passage of all stages agro-bacterial transformation of fiber flax. Genetically modified plants with heterologous gene of bacterial enzyme were produced on the basis of cultivar K-65 which was characterized the highest regenerative ability under the given culturing conditions. The produced transgenic plants will be used for studying expression of endo-1,4- β -glucanase in a plant cell and for finding out the role of the above enzyme during cellulose synthesis and in a mechanism of plant cell wall polysaccharides assembly.

Введение. Лен-долгунец является важной технической культурой умеренной климатической зоны. Подавляющее большинство сортов льна-долгунца создано методами традиционной селекции на основе использования генетического разнообразия исходных генотипов. Появление методов генной и клеточной инженерии позволило усовершенствовать процесс создания новых хозяйственно ценных форм путем введения единичных генов для придания существующим сортам новых желаемых свойств. В настоящее время процесс создания трансгенных растений относится к активно развивающимся направлениям биотехнологии сельскохозяйственных культур.

Выведение сортов, характеризующихся волокном высокого качества, лимитируется отсутствием точных сведений о процессах формирования и роста клеток флоэмной ткани, которая служит основой льняного волокна. Хорошо развитая флоэмная ткань льна состоит из высокоспециализированных клеток, метаболизм которых ориентирован на масштабный синтез целлюлозы и других полисахаридов [1]. Синтез целлюлозы – сложный процесс, требующий участия комплекса ферментов, в том числе, гидролизующих определенный тип связей в полимерах клеточной стенки. Увеличение экспрессии растительных полиглюкангидролаз отмечено во время роста растений, что указывает на их возможную роль в биосинтезе целлюлозы, сборке и коррекции полисахаридов клеточной стенки [2].

Ферменты эндо- β -1,4-глюканазы (целлюлазы) гидролизуют β -1,4-глюкозидные связи в некристаллической целлюлозе, и в вопросах об участии их в биосинтезе целлюлозы нет единого мнения. Существуют предположения о непосредственном участии целлюлаз в инициации синтеза целлюлозы [3]. Другие авторы предполагают косвенную, скорее регуляторную роль целлюлаз в образовании вторичной клеточной стенки и удлинении клетки [2, 4]. Понимание

роли β -глюканаз в процессах роста растений затруднено по причине, связанной с трудностями выделения, очистки и определения биохимических характеристик эндоглюканаз в растениях. Кроме того, в растениях обнаружено несколько изоформ ферментов, которые отличаются клеточной локализацией и индуцибельностью, что мешает определению активности исследуемой изоформы фермента на фоне остальных растительных эндоглюканаз [5]. Получение генетически модифицированных растений льна-долгунца, экспрессирующих гены бактериального происхождения, которые кодируют ферменты с активностями, аналогичными растительным ферментам, способным имитировать их действие позволит, с одной стороны, выяснить роль этих ферментов в процессах формирования растительных волокон и, с другой стороны, получить новые формы с модифицированным строением клеточной стенки, которые в дальнейшем найдут применение в селекционном процессе.

Биологические особенности вида *Linum usitatissimum* L. позволяют успешно использовать его для манипуляций в культуре *in vitro* [6]. Создание генетически модифицированных растений льна-долгунца может эффективно проводиться только в том случае, когда есть возможность получать большое число регенерантов и трансформантов. Все проводимые в настоящее время исследования по культуре тканей льна направлены на усовершенствование существующих методик и стабильное получение большого количества растений-трансформантов [6, 7].

Цель данного исследования – оптимизировать параметры генетической трансформации сортов льна-долгунца, районированных в Республике Беларусь; на основе сорта, обладающего самой высокой регенерационной способностью, получить генетически модифицированные растения с измененным метаболизмом полисахаридов.

Материалы и методы. Все используемые питательные среды содержали стандартный набор солей MS [8], 0,7% агар, pH 5,6–5,8. Семена проращивали на безгормональной среде. Среда для индукции каллусообразования содержала витамины В₁, В₆, РР (в концентрации 1 мг/л), инозитол (100 мг/л); фитогормоны – 0,1 мг/л 2,4-Д, 4 мг/л кинетин, 2 мг/л НУК; 30 г/л сахарозы. Для индукции морфогенеза и селекции первичных трансформантов использовали среду, аналогичную описанной выше, но отличающуюся гормональным составом: БАП (1 мг/л), АБК (3 мг/л) и содержанием углеводов (20 г/л сахарозы). Укоренение полученных регенерантов проводили на среде, не содержащей фитогормонов.

В качестве растительного материала использовался сорт льна-долгунца белорусской селекции К-65, обладающий высоким морфогенным потенциалом при регенерации из семядольных эксплантов.

Для трансформации растений были использованы экспрессионные векторы на основе штамма *AGL0 A.tumefaciens* с плазмидой E35S-L-*celE* [9]. Область Т-ДНК плазмиды содержит: последовательность целевого гена *celE*, кодирующего бактериальную эндо-β-1,4-глюкоканазу, слитую с последовательностью, кодирующей лидерный сигнал экстенсина моркови, ответственный за вынос целлюлазы в апопласт, под контролем конститутивного промотора 35S СаMV (промотор ДНК вируса мозаики цветной капусты). Помимо целевого гена векторная плазида содержит селективный ген неомифосфаттрансферазы II (*npt II*) под контролем *nos* промотора, который экспрессируется в растительных клетках и придает им устойчивость к антибиотикам неомифинового ряда (неомицин, канамицин).

Для проведения генетической трансформации экспланты льна-долгунца культивировали совместно с *Agrobacterium tumefaciens*. Суточную культуру агробактерий выращивали при температуре 28°C на среде Лурия-Бертани, 50 мг/л рифампицина и 100 мг/л канамицина. У 6-дневных проростков отделяли семядоли и помещали их на среду для каллусогенеза, на которую предварительно была нанесена 12-часовая культура *Agrobacterium tumefaciens*. Совместное культивирование эксплантов с агробактерией продолжалось 48 ч, при этом происходило образование первичного каллуса, после чего экспланты переносили на селективную среду для морфогенеза, содержащую антибиотики.

Результаты и их обсуждение. После 3 недель культивирования на семядольных эксплантах льна формировались небольшие плотные каллусы зеленого или желто-зеленого цвета с хорошо заметными точками инициации. Начало регенерации наблюдалось через

4–5 недель культивирования эксплантов на среде для морфогенеза. При данных условиях культивирования частота регенерации эксплантов сорта К-65 составляла 4,0 (отношение количества побегов к общему количеству эксплантов), что сочеталось с большим числом побегов на экспланте (от 1 до 8, в среднем – 4,2). Побег, полученный из трансформированного каллуса, и контрольные (нетрансформированные) растения помещали на среду для корнеобразования.

В ходе работы было отобрано 3 линии независимых первичных трансформантов сорта К-65, которые укоренились на селективной среде, содержащей канамицин в концентрации 100 мг/л, что делало ее токсичной для немодифицированных растений льна-долгунца. Через 4–6 недель укорененные побеги переносили в простерилизованный грунт и выращивали в условиях светоустановки при постоянной влажности 70%, температуре 22°C и 16-часовом фотопериоде до стадии созревания семян.

Устойчивость к селективным антибиотикам не служит исключительным доказательством успешного проведения генетической модификации растительного генома. Обязательным этапом работы по генетической трансформации является проведение молекулярного анализа, который позволяет выявить наличие чужеродного гена в клетках реципиента. В наших экспериментах перенос Т-ДНК в геномную ДНК растений льна подтвержден методом ПЦР-анализа с использованием праймеров к последовательности целевого гена (см. рисунок).

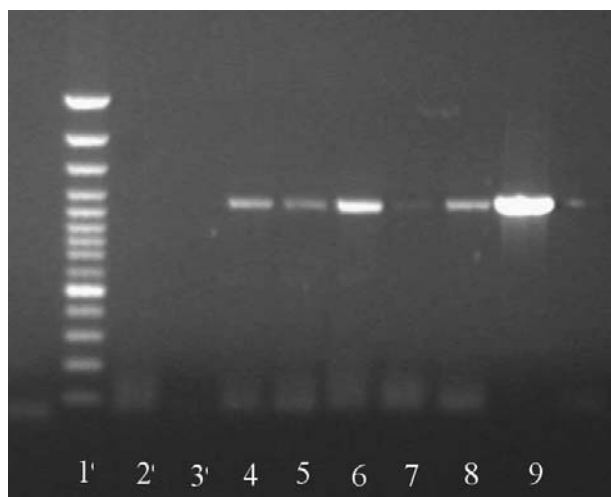


Рисунок. ПЦР-анализ с праймером к последовательности целевого гена:
1 – маркер GenRuler 100 bp;
2, 3 – контрольное растение;
4, 5, 6, 7, 8 – регенеранты сорта К-65;
9 – плазида

Результаты проведенного исследования показали, что условия культивирования растений *in*

in vitro и состав питательных сред были выбраны оптимально для успешного прохождения всех этапов агробактериальной трансформации льна-долгунца. Получены трансгенные растения льна-долгунца, экспрессирующие бактериальные гены эндо- β -1,4-глюканазы, которые кодируют фермент с активностью, близкой к растительным ферментам.

Заключение. Генетически модифицированные растения на основе сорта К-65 с гетерологичным геном бактериального фермента станут удобными моделями для биохимических исследований, поскольку позволят более точно определить функции растительных белков, проследить за работой единичных генов, оценить их влияние на другие гены растений и в итоге получить дополнительные сведения о работе и принципах регуляции метаболизма полисахаридов.

Литература

1. Cell-wall polysaccharides of developing flax plants / T. A. Gorshkova [et al.] // *Plant Physiol.* – 1996. – Vol. 110, № 4. – P. 721–729.
2. Understanding the role of membrane-bound Endo- β -1,4-glucanases in cellulose biosynthesis / M. Molhoj [et al.] // *Plant Cell Physiol. Physiol.* – 2002. – Vol. 43, № 12. – P. 1399–1406.
3. Sitosterol- β -glucoside as primer for cellulose synthesis in plant / L. Peng [et al.] // *Science.* – 2002. – Vol. 295, № 4. – P. 147–150.
4. Cellulose metabolism in plants / T. Hayashi [et al.] // *Inter. Review of Cytology.* – 2005. – Vol. 247. – P. 1–34.
5. Woolley, L. C. Purification and properties of an Endo- β -1,4-glucanases from strawberry and down-regulation of the corresponding gene, cel 1 / L. C. Woolley, D. J. James, K. Manning // *Planta.* – 2001. – Vol. 214. – P. 11–21.
6. Поляков, А. В. Биотехнология в селекции льна / А. В. Поляков. – Тверь: Формат, 2000. – 180 с.
7. Белоногова, М. А. Регенерация побегов на семядольных эксплантах льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.) и их укоренение / М. А. Белоногова, Г. Н. Ралдугина // *Физиол. раст.* – 2006. – Т. 53, № 4. – С. 560–566.
8. Murashige, T. Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures / T. Murashige, F. A. Skoog // *Physiol. Plant.* – 1962. – Vol. 15. – P. 473–497.
9. Изменение морфологии и фитогормонального статуса у трансгенных растений табака в результате экспрессии бактериальной термостабильной целлюлазы / Р. М. Абдеев [и др.] // *Физиол. раст.* – 2004. – Т. 51, № 5. – С. 714–720.