

РАЗРАБОТКА МЕТОДА АГРОБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ РЕМОНТАНТНОЙ МАЛИНЫ НА ОСНОВЕ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ ЛИХЕНАЗЫ*

А.Г. СОБОЛЕВА, к. б. н.; В.В. СОБОЛЕВ, к. б. н.; И.В. КАЗАКОВ, д. с.-х. н.

Подобраны условия для трансформации листовых эксплантов ремонтантной малины: определен оптимальный способ инокуляции листовых эксплантов культурой агробактерии; предложен двухэтапный способ селекции трансформированных побегов, который позволит отобрать трансгенные растения и избежать подавления регенерации из трансформированных клеток. Получены трансгенные растения, несущие в составе ДНК репортерные гены лихеназы и гены устойчивости к канамицину, что было продемонстрировано на чашечном тесте и при помощи ПЦР.

Использование методов генетической инженерии занимает важное место в современных подходах физиологии растений. Малина вообще и ремонтантная малина в особенности очень плохо изучены в физиологическом отношении. Освоение методов получения трансгенных растений малины открывает возможность изучения функций, строения и регуляции экспрессии отдельных генов, организации генома; появляется возможность модифицировать активность генов с помощью технологий антисмысловых нуклеиновых кислот [4]. Вместе с тем получение трансгенных растений малины может иметь практическое значение для увеличения продуктивности и улучшения качества продукции, повышения устойчивости к болезням, применения более эффективных и экологически безопасных гербицидов и т.д.

В литературных источниках опубликовано небольшое количество работ по трансформации растений малины. В большинстве случаев авторы использовали модельные генетические системы, содержащие селективные и репортерные гены. Однако отдельные исследователи проводили трансформацию векторами, содержащими гены дефензинов или белка оболочки виру-

сов, т.е. гены, которые могут быть полезны для повышения устойчивости растений к вирусной и грибной инфекции. Например, трансформацию проводили обезоруженным штаммом агробактерии, содержащим ген белка оболочки вируса кустистой карликовости малины и селективный ген *nptII* [11].

В результате проведенных исследований рядом авторов были получены трансформированные растения малины. В отдельных растениях была продемонстрирована экспрессия перенесенных генов, но при этом исследователи отмечают низкую эффективность системы трансформации, а ткани листовых эксплантов проявляют высокую чувствительность к антибиотикам. Канамицин, используемый в качестве селективного антибиотика, является сильным ингибитором органогенеза на эксплантах малины и в значительной степени ингибирует регенерацию на селективной среде [7, 9, 10, 13].

На основании вышеизложенного можно отметить, что работа по определению условий для генетической трансформации ремонтантной малины весьма актуальна. Систему трансформации необходимо разрабатывать индивидуально для конкретных сортов, так как характер влияния фитогормо-

* ФГОУ ВПО Брянская государственная сельскохозяйственная академия.

нов и других условий культивирования на процесс регенерации изучен недостаточно.

Целью данной работы было определить условия для агробактериальной трансформации ремонтантных форм малины.

Материалы и методы

Объектом исследований служили ремонтантные формы малины, предоставленные Кокинским опорным пунктом ВСТИСП. В работе использовали две формы 14-205-27, 8-79-2 и сорт Бабаье лето-2. От укорененных в асептических условиях растений (ИМК 0,5 мг/л) отделяли самые молодые листья и проводили кокультивирование с ночной бактериальной культурой. Для трансформации готовили ночную культуру *A. tumefaciens* на среде LB, дополненной рифампицином и канамицином при 29°C. После этапа кокультивации экспланты переносили на питательную среду для регенерации побегов, основанную на минеральной части среды Мурасиге — Скуга [12], дополненную тидиазуроном 0,1 мг/л, цефотаксимом 200–600 мг/л, канамицином. Использование цефотаксима необходимо для подавления развития агробактерии. В некоторых опытах питательную среду дополняли абсцизовой кислотой в концентрации 3 мг/л, которая снижает негативное действие агробактерии на процессы регенерации. При этом первые десять дней экспланты культивировали в отсутствии света, что способствовало повышению частоты регенерации. Спустя 10–14 дней культивирования на свету наблюдали образование первых побегов, которые впоследствии переносили на питательную среду для размножения, содержащую 6-БАП — 2 мг/л.

Для трансформации использовали штаммы *A. tumefaciens*, любезно предоставленные лабораторией функциональной геномики Института общей генетики РАН, с векторами E35S-L-lic b, E35S-lic b. Используемые векторы содержали ген устойчивости к канами-

цину под опиновым pos-промотором, ген репортерного белка лихеназы под промотором 35S. Эта репортерная система основана на высокой термостабильности бактериального фермента лихеназы *Clostridium thermocellum*. [5]. Ген репортерного термостабильного белка лихеназы позволяет продемонстрировать экспрессию трансформирующих векторов по проявлению лихеназной активности (в ячейки геля, содержащего лихенан, помещали растительный экстракт из трансформированных побегов; выдерживание геля при 65°C, позволяет лихеназе проявить свою активность, в то время как все другие растительные ферменты инактивируются). Ген устойчивости к канамицину позволяет отобрать трансформированные растения на селективных средах, содержащих этот антибиотик.

При трансформации растений *A. tumefaciens* использовали следующие модификации метода: 1 — инкубация растительных эксплантов в жидкой культуре бактерии; 2 — нанесение капель жидкой культуры *A. tumefaciens* на листовые экспланты; 3 — использование газона ночной культуры бактерии.

Институтом клеточной биологии и генетической инженерии Национальной академии наук Украины был любезно предоставлен для работы штамм агробактерии GANE 7. Штамм содержит агробактериальный ген *b6*, который принимает участие в тонкой регуляции действия цитокининов на растения. Промотор этого гена является органоспецифичным и индуцируется присутствием ауксина, а также при повреждении растительной ткани [3]. В опытах определяли возможность повышения частоты регенерации листовых эксплантов после кокультивации с агробактериальным штаммом GANE 7.

Опыты проводили в 3-кратной повторности. Полученные данные после статистической обработки представили в виде $M \pm m$, где M — математическое ожидание, а m — стандартная ошибка среднего [2].

Для подтверждения трансформации выделяли ДНК малины. 60 мг растительной ткани, растирали тефлоновым пестиком в микропробирке объемом 1,5 мл и интенсивно гомогенизировали при комнатной температуре в 400 мкл экстракционного буфера (200 мМ Трис-НСl; рН 7,5; 250 мМ NaCl; 25 мМ ЭДТА; 0,5% SDS). Встряхивали на вортексе 5 с. Экстракция при 65°C 20 мин, после чего добавляли 200 мкл 5 М КАС и инкубировали на ледяной бане 20 мин. Центрифугировали 10–15 мин при 16000 об/мин. Отбирали 400 мкл супернатанта и переносили в новую пробирку, добавляя 1 объем 20% ПЭГ и оставляли в морозилке на 5 мин. Центрифугировали 20 мин при 20000 об/мин. Осадок промывали 70% этанолом. 10 мин центрифугировали при 16000 об/мин, растворяли в 50–100 мкл Н₂О. Хранили при –20°C.

При анализе трансгенной природы полученных регенерантов использовали олигонуклеотиды, синтезированные ЗАО «SYNTOL» Москва. Ниже приведены последовательности олигонуклеотидов для прт II:

5'- ATG ATT GAA CAA GAT GGA TTG CAC G -3'

5'- TCA GAA GAA CTC GTC AAG AAG GCG -3'

Длина амплифицируемого фрагмента 791 п. н.

Результаты и их обсуждение

При получении трансформированных растений важным условием является частота регенерации побегов из инокулированных клеток. А при выборе способа кокультивирования листовых эксплантов с культурой бактерии

предпочтение следует отдавать тем, которые в меньшей степени подавляют проявление регенерационного потенциала. В связи с этим мы сравнивали различные способы кокультивирования (табл. 1).

Из приведенных результатов можно сделать вывод, что наиболее щадящими способами кокультивирования являются нанесение капель ночной культуры на листовые экспланты и использование газона ночной культуры агробактерии, на который помещают листовые экспланты. Важно, что при использовании названных методов наблюдается довольно высокий уровень регенерации побегов — 66%–75%. Инкубация эксплантов с жидкой культурой приводит к значительной гибели растительного материала (68%), т.е. при использовании этого способа кокультивирования негативное влияние агробактерии проявляется наиболее ярко. Вакуумная инфильтрация агробактерией не приводит к значительной и быстрой гибели листовых эксплантов, они продолжительное время остаются зелеными, но регенерантов в этом варианте также не образуется.

При кокультивировании агробактерии с листовыми эксплантами необходимо, чтобы последние имели поражения, так как повышению инокуляции эксплантов бактерий в значительной степени способствуют вещества, выделяемые клетками при повреждениях [6]. На листовых эксплантах малины эту роль играли краевые срезы и надрезы центральной жилки. Следует отметить, что в области центральной жилки частота регенерации несколько выше.

Таблица 1
Влияние способа кокультивирования листовых эксплантов малины сорта Бабье лето-2 с агробактериальным штаммом E35S-L-lic b на регенерационную способность

Способ кокультивирования эксплантов с агробактерией	Зеленые экспланты (спустя 14 сут), %	Частота регенерации (спустя 30 сут), %
Инкубация с жидкой культурой, 4 ч	31,76 ± 4,2	0
Капли ночной культуры, 12 ч	95,94 ± 1,5	66,46 ± 3,1
Газон ночной культуры, 12 ч	97,89 ± 1,2	75,06 ± 2,3
Вакуумная инфильтрация, 10 мин	93,77 ± 1,9	0

В литературных источниках встречаются данные о положительном влиянии абсцизовой кислоты на регенерационную способность при трансформации некоторых культур [1]. С целью повышения частоты регенерации мы включали АБК в состав питательных сред. По истечении двух недель экспланты переносили на среду, не содержащую абсцизовую кислоту, так как дальнейшая культивация приводила к гибели эксплантов. Результаты опыта приведены в таблице 2.

Максимальное количество регенерантов образуется в контрольном варианте. Под влиянием кокультивирования с агробактерией (в описываемом опыте использовали газон ночной культуры) существенно снизилось количество регенерирующих эксплантов на 28 и 38% для форм 8-79-2 и 14-205-27 соответственно. Включение абсцизовой кислоты на 14 сут в состав регенерационной среды после этапа кокультивирования оказало положительный эффект на частоту органогенеза из листовых эксплантов. На эксплантах формы 8-79-2 включение абсцизовой кислоты в состав среды регенерации позволило повысить количество регенерирующих эксплантов на 11%. На эксплантах формы 14-205-27 вариант с АБК отличался по количеству регенерирующих эксплантов уже после 26 сут культивирования, получено на 29% больше регенерирующих эксплантов. Можно заключить, что

включение в состав питательной среды абсцизовой кислоты позволило повысить частоту регенерации эксплантов, которая уменьшается под влиянием кокультивирования с агробактерией, в среднем на 20%.

В результате проведенных исследований можно сделать вывод, что включение абсцизовой кислоты в состав регенерационных сред способствует некоторому снятию негативного влияния кокультивирования с культурой агробактерии на частоту регенерации листовых эксплантов ремонтантной малины, при отсутствии положительного влияния на процесс регенерации в контрольном варианте, без контакта с агробактерией. То есть использование АБК для стимулирования органогенеза из листовых эксплантов ремонтантной малины целесообразно после этапа кокультивирования с агробактерией.

При изучении регенерационной способности форм ремонтантной малины мы выделили образцы с низким регенерационным потенциалом. Штамм агробактерии GANE 7 содержит ген *b6*, который, по литературным источникам, принимает участие в тонкой регуляции действия цитокининов на растения. Сравнительно недавно было показано, что активность гена *b6* может приводить к увеличению регенерационной способности у табака [6]. Мы провели опыт, в котором сравнивали частоту регенерации эксплантов

Таблица 2

Частота регенерации на листовых эксплантах ремонтантной малины под влиянием кокультивирования с агробактерией и содержанием в составе питательной среды АБК

Вариант	Продолжительность культивирования листовых эксплантов							
	20 сут		26 сут		31 сут		41 сут	
	14-205-27	8-79-2	14-205-27	8-79-2	14-205-27	8-79-2	14-205-27	8-79-2
Контроль	31,0±2	63,0±3	37,6±3	65,3±1	43,3±4	69,3±3	50,0±7	69,3±3
После этапа кокультивирования с <i>A. tumefaciens</i>	15,3±10	29,3±4	25,3±6	44,0±6	25,3±6	47,5±4	31,6±1,5	50,0±4
После этапа кокультивирования с <i>A. tumefaciens</i> и переносом на среду с АБК	4,6±6	29,0±2	35,0±6	44,0±1	35,0±6	56,0±1	39,6±4	56,0±1

после этапа кокультивирования со штаммом, содержащим этот ген, и без кокультивирования с агробактерией (рис. 1). На рисунке 1 видно, что при инокуляции штаммом GANE 7 частота регенерации увеличивается в полтора раза, в то время как контакт с агробактерией обычно резко подавляет процессы регенерации.

Положительный эффект использования данного штамма наблюдался уже после 3 недель культивирования эксплантов на регенерационной среде. Обозначившаяся тенденция в дальнейшем только возрастала.

И спустя 50 сут культивирования кокультивирование эксплантов со штаммом агробактерии GANE 7 позволило повысить частоту регенерации побегов на 55%. Природа действия гена, который несет названный штамм, до конца не изучена, но его использование может быть эффективным при получении регенерантов у форм ремонтантной малины с низким регенерационным потенциалом.

Большинство агробактериальных штаммов, используемых при трансформации, содержат селективный ген *nptII*. Используемые нами штаммы также содержали *nptII* — ген устойчивости к канамицину, позволяющий отбирать трансформанты на селективных средах. В литературных источниках встречаются данные об использовании концентраций канамицина 25–50 мг/л в качестве селективных для эксплантов малины [8]. При подборе селективных концентраций канамицина мы тестировали способность листовых эксплантов к образованию регенерантов в указанном диапазоне концентраций. После этапа кокультивирования листовых эксплантов с культурой агробактерии их отмывали и помещали на селективную среду регенерации с различными концентрациями канамицина. При помещении листовых эксплантов ремонтантной малины на среды, содержащие Km от 5 до 25 мг/л, образования регенерантов не наблюдали, в т.ч. на эксплантах, контакти-



Рис. 1. Влияние кокультивации со штаммом агробактерии GANE 7 на регенерационную способность листовых эксплантов сорта Бабье лето-2

ровавших с агробактерией штамма E35S-L-licB, содержащего ген устойчивости к канамицину. Экспланты темнели и погибали до начала процесса регенерации. Поэтому мы изучали влияние более низких концентраций канамицина на частоту регенерации (табл. 3).

При повышении концентрации канамицина до 2,5 мг/л частота регенерации резко падает до 9%. Образующиеся немногочисленные регенеранты явно угнетены и хлоротичны, т.е. проявляют признаки неустойчивости к канамицину и впоследствии погибают, даже после переноса их в среду, не

Таблица 3

Частота регенерации на листовых эксплантах сорта Бабье лето-2 в присутствии канамицина после контакта со штаммом агробактерии E35S-L-lic B

Концентрации канамицина, мг/л	Частота регенерации через 32 сут, %
0,5	56 ± 2
1	48 ± 3,5
1,5	42 ± 4,5
2	30 ± 4,0
2,5	9 ± 2,5

содержащую антибиотик. Поэтому в качестве первичной селективной среды для регенерации из листовых эксплантов ремонтантной малины мы использовали в дальнейшей работе питательную среду, содержащую канамицин в концентрации 3 мг/л. Во всех последующих опытах эта концентрация канамицина полностью подавляла регенерацию на эксплантах, не контактировавших с агробактерией.

При трансформации растений селекцию можно проводить и после появления регенерантов, получать побеги без включения селективного фактора в питательные среды, после чего переносить их на среды, содержащие канамицин. При этом концентрации канамицина должны быть выше, чем при добавлении его в среду для регенерации. Такой подход позволяет избежать потери трансформированных клеток из-за массовой гибели окружающих их неустойчивых клеток и выделение ими в среду токсических продуктов распада. Поэтому в следующих опытах мы подбирали концентрации канамицина для селективного отбора трансформированных регенерантов. Количество выживших регенерантов снизилось с возрастом концентрации канамицина: спустя 56 сут культивирования при концентрации 5 мг/л выжило 63% регенерантов, при концентрации 10 мг/л — 32%, а при содержании селективного антибиотика 15 мг/л — 18% побегов. При последней концентрации образовались побеги с хлоротичными листьями и масса побегов с белыми центральными жилками, вследствие влияния канамицина. Однако присутствовали и побеги без признаков влияния канамицина, что может служить косвенным доказательством их трансгенной природы. Хлоротичные побеги постепенно погибали и спустя 56 сут культивирования, когда проводили окончательный учет, на среде, содержащей канамицин в концентрации 15 мг/л, оставались лишь зеленые, устойчивые побеги. На средах с меньшей концентрацией канамицина хло-

ротичные побеги еще продолжали развиваться, но впоследствии погибали. Поэтому для ремонтантных форм малины при селекции трансформированных побегов можно рекомендовать концентрацию канамицина 15 мг/л.

В работах других авторов также отмечается сильное ингибирующее действие этого антибиотика на органогенез из листовых эксплантов малины [7, 13]. Выход трансформантов может оказаться очень низким из-за потери их большей части при слишком жестких условиях селекции. Учитывая вышесказанное, мы предлагаем использовать 2-этапную систему отбора. На первом этапе регенерантные побеги отбирают на среде, содержащей канамицин в концентрации 3 мг/л. При этом содержание антибиотика в составе регенерационной среды в течение 2 недель достаточно для проявления его селективного действия. Затем после получения регенерантов при первом же пассаже на среде размножения проводят второй этап селекции путем включения канамицина в состав питательной среды в концентрации 15 мг/л. Использование описанной системы отбора трансформированных побегов позволит с максимальной эффективностью отобрать побеги с устойчивостью к канамицину и вместе с тем избежать негативного влияния антибиотика на процесс регенерации из тканей листовых эксплантов ремонтантной малины.

Все штаммы агробактерии, используемые в работе, в составе трансформирующих векторов содержали ген *nptII* — ген устойчивости к канамицину. Образовавшиеся регенеранты после отбора на селективных средах были протестированы на присутствие в них участка ДНК, кодирующего ген *nptII* методом ПЦР. Трансгенная природа полученных растений была доказана методом ПЦР, при этом использовались праймеры, комплементарные последовательности гена *nptII*. Полученные результаты приведены на рисунке 2, где можно видеть, что не-

которые из анализированных побегов содержат последовательность ДНК, соответствующую последовательности гена *nptII*. На 1-7 и 9-й дорожках нанесены продукты ПЦР, полученные с ДНК, выделенной из канамициноустойчивых растений.

Расчитанная по нуклеотидной последовательности гена *nptII* длина амплифицируемого фрагмента 791 п.н. хорошо соответствует результатам, полученным при определении длины фрагмента после разделения в электрофорезном геле с использованием маркерных молекул ДНК.

Наибольшее количество трансформированных побегов образовалось при трансформации штаммом GANE 7, даже без селекции с помощью канамицина. Этот штамм помимо гена *b6* содержит также ген *nptII*. Это еще раз подтверждает его стимулирующее действие на процессы регенерации из листовых эксплантов ремонтантной малины.

Кроме того, была продемонстрирована экспрессия введенных генов: гена *nptII* косвенно по устойчивости к канамицину на селективных средах и гена *isc B* по результатам чашечного теста, в котором растительные экстракты отобранных растений проявили лихеназную активность.

На рисунке 3 приведены результаты анализа экспрессии гена термостабильной бактериальной лихеназы, введенного в растения ремонтантной малины. На рисунке можно заметить гало, которое появляется при разрушении содержащегося в геле лихена из лихеназой из нанесенных в лунки растительных экстрактов. Гель инкубировали при 65°C. При этом растительные ферменты инактивируются и сохраняется активность только бактериальной лихеназы, которая разрушает лихенан вокруг лунок.

В работе были подобраны условия для трансформации листовых эксплантов ремонтантной малины и получены трансформированные растения, несущие в составе ДНК репортерные гены и гены устойчивости к канамицину. Это стало возможным благодаря отработке ряда приемов: способ инокуляции листовых эксплантов агробактерией с минимальным снижением регенерационной способности; преодоление высокой чувствительности тканей малины к канамицину с помощью двухэтапной схемы селекции: включение канамицина в регенерационную среду в концентрации 3 мг/л и повторная селекция полученных регенерантов на среде размножения с содержанием 15 мг/л

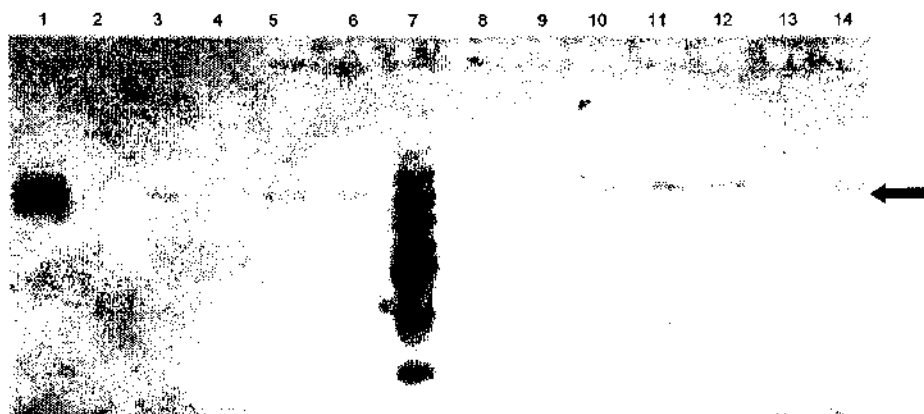


Рис. 2. ПЦР анализ регенерантов малины на наличие гена *nptII*. 7 — маркер весов, 1 — ДНК из агробактериальной плазмиды, 2-6, 10-14 — ДНК, выделенная из устойчивых к канамицину регенерантов малины; 8,9 — ДНК, выделенная из неустойчивых к канамицину растений

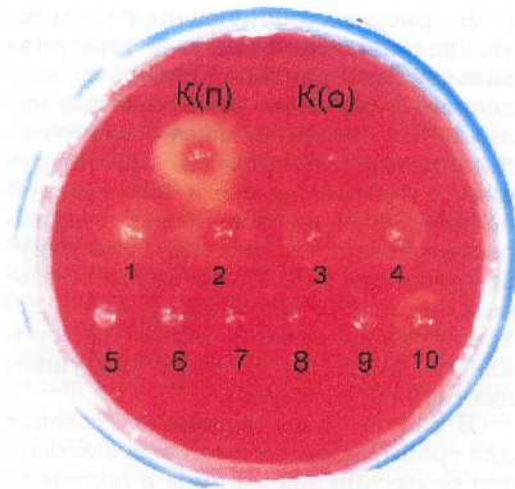


Рис. 3. Анализ экспрессии гена термостабильной лихеназы.

К(п) — положительный и К(о) — отрицательный контроли; 1–10 — экстракты из анализируемых растений

канамицина. Предложенный способ селекции трансформантов позволяет отбирать трансформированные побеги, избегая подавления регенации на этапе селекции из трансформированных клеток.

Библиографический список

1. Белоногова М.А., Ралдугина Г.Н., Кубрак С.А. Побегообразование на семядольных эксплантах различных генотипов льна обыкновенного (*Linum usitatissimum*). Тезисы докладов V Съезда

общества физиологов растений России. Пенза, 2003. — 2. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. М.: Колос, 1979. — 3. Кучук Н.В. Генетическая инженерия высших растений. Киев: Наукова думка, 1997. — 4. Пирузян Э.С., Кобец Н.С., Метт В.Л.и др. Трансгенные растения с экспрессируемыми чужеродными генами как модель для изучения стрессовых ответов и источник создания устойчивых форм // Физиология растений, 2000. Т. 43. № 3. С. 370–381. — 5. Пирузян Э.С., Голденкова И.В., Мусийчук К.А. и др. Новая репортерная система, основанная на высокой термостабильности лихеназы, для изучения регуляции экспрессии генов у растений // Физиология растений, 2000. Т.47. № 3. С. 382–389. — 6. Bagyan I.L., Revenkova E.V., Pozmogova G.E. // Plant Mol. Biol., 1996. V. 29. P. 1299–1304. — 7. DeFaria M.J.S.S., Donnelly D.J., Cousineau J.C. // Physiologia plantarum, 1962. N 15. P. 473–497. — 8. Fiola J.A., Hassan M., Swartz H.J., Bors R., McNicol R.J. // Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1990. N.20. P. 223–228. — 9. Graham J., McNicol R.J., Kumar A. // Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1990. N.20 P. 9–35. — 10. Mathews H., Wagoner W., Cohen C. et al. // Plant Cell Reports., 1995. V. 14. P. 6–471. — 11. Millan-Mendoza B., Graham J. // Horticultural science & biotechnology, 1999. N. 74(2). P. 219–223. — 12. Murashige T., Skoog F. // Physiologia plantarum, 1962. № 15. P. 473–497. — 13. Swartz H.J., McNicol R., Hyman B. // Annu Rep Scottish Crop Rep Inst, 1987 V. 7. P. 85–86.

Рецензент — к. б. н. Г.Н. Карпов

SUMMARY

Conditions for transformation sheet explants of everbearing raspberry have been chosen: the optimum way of inoculation of sheet explants by culture agrobacteria has been determined two-stage method of selection of transformed shoots which allows to select transformed plants and to avoid suppression regeneration from transformed cells is offered.