

УДК 631.147+631.526.3+631.527

Редакционная коллегия:

академик НАН Беларуси В.Н. Решетников (отв. редактор), д.б.н. В.В. Титок (отв. редактор), к.б.н. Е.В. Спиридович, к.б.н. Т.И. Фоменко, к.б.н. А.А. Кузовкова

Биотехнологические приемы в сохранении биоразнообразия и селекции растений: материалы международной научной конференции 18–20 августа 2014 г., Минск. — Минск: ГНУ «Центральный ботанический сад Академии наук Беларуси», 2014.—277 с.

В сборник вошли материалы Международной научной конференции, посвященной актуальным проблемам сохранения биоразнообразия, селекции растений с использованием биотехнологических приемов, представленные учеными Беларуси, России, Украины, Казахстана, Сербии, Литвы, Молдовы, Таджикистана и Узбекистана.

УДК 631.147+631.526.3+631.527

ГНУ «Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси», 2014 г.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕПОРТЕРНОГО GUS ГЕНА ДЛЯ ОПТИМИЗАЦИИ УСЛОВИЙ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ *VACCINIUM CORYMBOSUM L.*

Чижик О.В., Филипеня В.Л.

ГНУ «Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси», г. Минск,

ул. Сурганова 2в, 220012, Беларусь

E-mail: alisa67@hotmail.ru

Ключевые слова: *Vaccinium corymbosum L.*, *Agrobacterium tumefaciens*, генетическая трансформация, индукторы *vir*-генов, репортерный ген, β -глюкуронидаза, транзистная экспрессия

Введение. Голубика высокая — высокопродуктивная ягодная культура, ценность которой определяется прекрасными вкусовыми качествами плодов и содержанием в них широкого спектра биологически активных веществ, нетребовательностью к обогащению почвы, возможностью длительного пользования плантациями. В Беларуси производство ягод голубики начато в 1980 году. В последнее десятилетие активно развивается новое для республики направление промышленного плодоводства — голубиководство, так как имеются все предпосылки для высокорентабельного выращивания этой культуры на промышленной основе. Одной из наиболее актуальных задач в производстве и селекции голубики является задача создания сортов с новыми хозяйственно-ценными характеристиками. Наиболее перспективными в этой области являются исследования, направленные на получение растений, устойчивых к патогенам (вирусам, грибам, бактериям, насекомым), гербицидам, неблагоприятным факторам внешней среды. В настоящее время для создания новых форм растений активно применяют методы современной биотехнологии, в том числе, генетическую трансформацию растений. Несмотря на достигнутые успехи в получении генетически-модифицированных растений многих сельскохозяйственных культур, у большинства плодовых и ягодных видов, к которым относится и голубика, частота трансформации посредством *Agrobacterium spp.* все еще остается очень низкой. Механизмы, лежащие в основе этого явления практически неизвестны.

Основываясь на многочисленных исследованиях по генетической модификации древесных видов можно выделить основные ключевые факторы, влияющие на эффективность трансформации [1, 2]. Этими факторами являются: генотип растения (экспланта); уровень индукции *vir*-генов; активность клеточного деления в тканях экспланта (эффективный адвентивный органогенез); состав среды культивирования на различных этапах трансформации; вирулентность штаммов агробактерий и строение векторных конструкций для переноса генов. В каждом отдельном случае необходимо идентифицировать экспланты с множеством способных к регенерации клеток, оптимизировать условия переноса генов в эти клетки и условия селективного отбора потенциально трансгенных растений. При разработке эффективных систем генетической трансформации растительных объектов, для которых неприемлемы методики, используемые на модельных растениях (табаке, арабидопсисе) применяют векторные конструкции, содержащие репортерные гены. Репортерные гены кодируют белки нерастительного происхождения, наличие или активность которых относительно легко и удобно тестировать в растительных клетках [3]. Детекция транзистной экспрессии репортерных генов позволяет оценить потенциальную возможность встраивания и уровень экспрессии гена, вирулентность используемой конструкции, оценить влияние условий трансформации на эффективность включения трансгена в растительный геном.

Изучение факторов, которые оказывают влияние на взаимодействие растительной и бактериальной клеток, на перенос, встраивание и дальнейшую экспрессию чужеродных

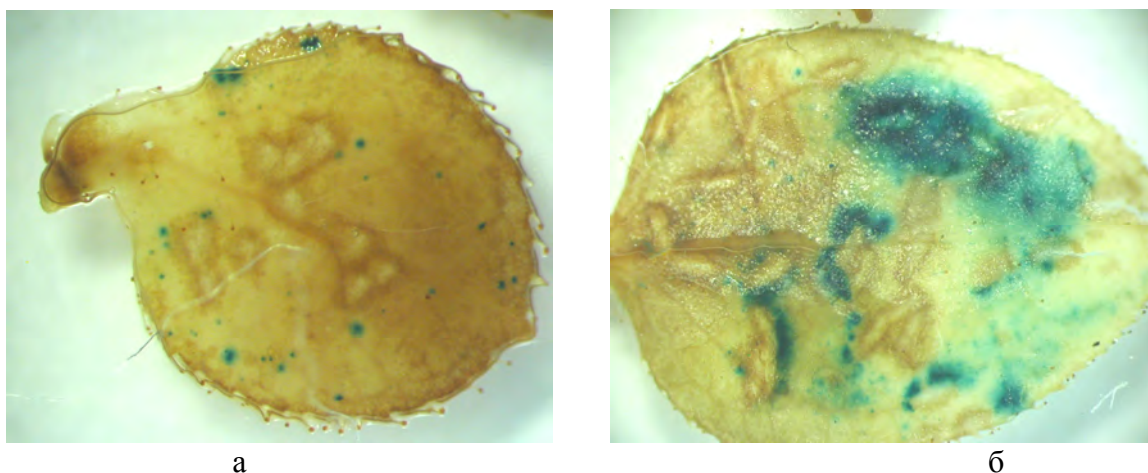
генов на основе анализа транзientной экспрессии репортерного GUS гена, является основой для оптимизации условий трансформации перспективных для молекулярной селекции сортов голубики высокой.

Материалы и методы. В экспериментах по оптимизации условий генетической трансформации голубики использовали обезоруженный супервирулентный штамм *Agrobacterium tumefaciens* СВЕ 21, содержащий бинарный вектор pBI121 с геном uidA, кодирующий фермент β-глюкуронидазу, но с модифицированным интроном PIV2 из картофельного гена ST-LS1 в своей 5' -концевой части. Конструкция включала маркерный ген неомизинфосфотрансферазы II (nptII), обеспечивающий устойчивость к селективному антибиотику канамицину. Для проведения трансформации 50 мл ночной культуры агробактерии в среде LB [4] (pH 7,2) осаждали центрифугированием при 6000g в течение 5 минут, супернатант сливали, а осадок ресуспендировали в жидкой среде WPM [5] (pH 5,3). Эту процедуру повторяли дважды. Инокуляцию эксплантов осуществляли в полученной суспензии. В качестве эксплантов были взяты листья размноженных *in vitro* растений голубики сортов Блюкроп и Нортланд. Листовые пластины при помощи скальпеля надрезали (всего 10-15 небольших надрезов) и помещали в подготовленную суспензию агробактерий на 35-40 минут. Инокуляцию проводили в присутствии 100 мкМ ацетосирингона и без него. После инокуляции экспланты переносили на среды для кокультивирования: 1 – среда для кокультивирования (агаризованная WPM, содержащая 5 мг/л 2иП и 0,5 мг/л тидиазурона) без тестируемых соединений (контроль); 2 - среда для кокультивирования со 100 мкМ ацетосирингона (AS); 3 – среда для кокультивирования со 100 мМ глюкозы; 4 – среда для кокультивирования со 100 мМ арабинозы. Транзientную экспрессию β-глюкуронидазы осуществляли на 4, 5, 6, 7, 8 день после проведения трансформации. Экспрессию GUS в трансформированных и не трансформированных тканях детектировали гистохимически по протоколу, предложенному Jefferson с сотрудниками [6]. Для анализа транзientной экспрессии GUS, листовые экспланты голубики сразу же после кокультивирования с агробактерией без префиксации, отмывали дважды 100 мМ фосфатным буфером (pH 7,0). Затем экспланты окрашивали в буфере для X-Gluc, содержащем 100 мМ NaH₂PO₄, 10 мМ ЭДТА, 0,5% Triton X-100, 2 мМ X-Gluc (5-бром-4-хлор-3-индолил-β-D-глюкуронид) при 37°C, в течение ночи. От хлорофилла экспланты освобождали отмыванием в 70% этиловом спирте в течение 12 часов. Результаты документировали фотографированием. Подсчитывали количество голубых зон на экспланте, в случае, когда отдельные зоны сливались, оценивали процент окрашенной площади от общей площади экспланта.

Результаты и их обсуждение. Известно, что гены вирулентности (*vir*-гены) *Agrobacterium tumefaciens* индуцируются низкомолекулярными фенольными соединениями (моноциклическими ароматическими гидрокарбонатами, такими как ацетосирингон, конифероловый спирт и ванилин) и моносахарами (глюкозой, арабинозой и глюкуроновой кислотой). Моносахара, являющиеся компонентами клеточной стенки растений, также как и ацетосирингон, выделяются в окружающую среду при поранении клетки и индуцируют систему вирулентности агробактерий в природных условиях. В литературе встречаются данные об увеличении подвижности, усилении хемотаксиса и способности к прикреплению *Agrobacterium tumefaciens* к клетке-хозяину под действием этих соединений при проведении генетической трансформации [2].

С целью исследования влияния ацетосирингона, арабинозы и глюкозы на процесс инфицирования эксплантов голубики сортов Нортланд и Блюкроп, проводили анализ эффективности транзientной экспрессии GUS при добавлении тестируемых соединений в среду культивирования на разных этапах трансформации. Также изучена зависимость уровня транзientной экспрессии GUS от продолжительности периода кокультивирования растительных тканей голубики с агробактерией.

В предварительных экспериментах по подбору времени кокультивирования зафиксировано отсутствие транзientной экспрессии GUS (данные не представлены) при инфицировании эксплантов исследуемых таксонов в течение первых трех дней, поэтому дальнейшие эксперименты по анализу экспрессии GUS начинали с 4 дня кокультивирования. Установлено следующее. Максимальный уровень транзientной экспрессии GUS в контрольном варианте эксперимента (без индукторов *vir*-генов) наблюдали после 5 дней кокультивирования у эксплантов голубики сорта Нортланд, и после 6 дней – у эксплантов сорта Блюкроп (30% и 20%, соответственно). Добавление ацетосирингона в среду для инокуляции при пятидневном кокультивировании повысило частоту транзientной экспрессии GUS у листовых эксплантов голубики сорта Нортланд до 60%. У листовых эксплантов сорта Блюкроп на 5 день кокультивирования присутствие ацетосирингона увеличило эффективность транзientной экспрессии GUS до 65% (рисунок 1).



а – инокуляция без ацетосирингона; б – инокуляция со 100 мкМ ацетосирингона

Рисунок 1 - Транзientная экспрессия GUS в эксплантах голубики высокой сорта Нортланд при добавлении ацетосирингона на этапе инокуляции после 5 дней кокультивирования.

Использование ацетосирингона не только на этапе инокуляции, но и при кокультивировании оказалось неэффективным и привело к критическому снижению уровня транзientной экспрессии репортерного гена: на 20% у сорта Нортланд и на 40% у сорта Блюкроп по сравнению с описанным выше вариантом эксперимента. Аналогичный результат был получен и при совместном добавлении в среду для регенерации голубики ацетосирингона и тестируемых моносахаров.

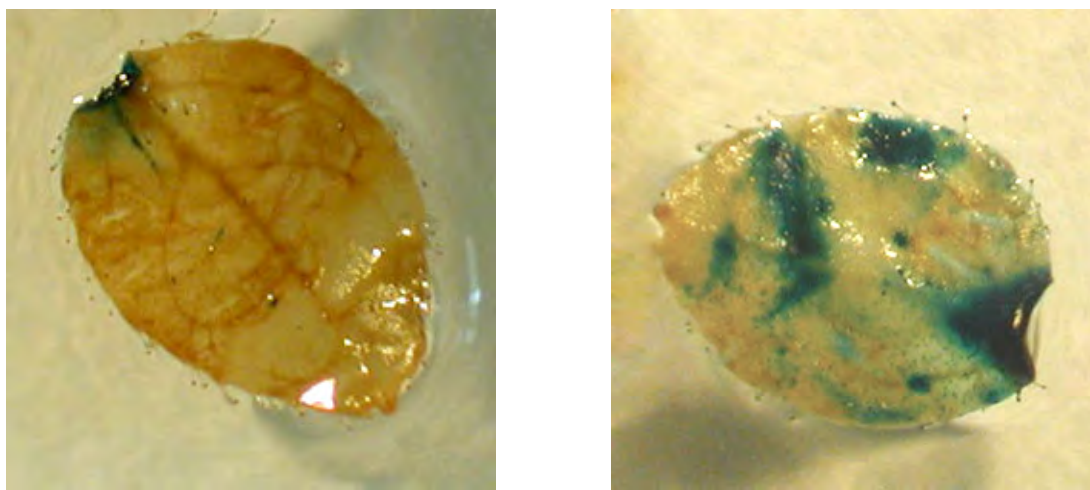
Полученные данные по зависимости частоты транзientной экспрессии GUS в эксплантах голубики высокой от длительности процесса кокультивирования и присутствия ацетосирингона при инокуляции согласуются с результатами Song и Sink, которые у двух сортов Аврора и Блюкроп наблюдали повышение уровня экспрессии GUS со 2-го по 6-й день кокультивирования, и снижение уровня в последующие дни. Ацетосирингон стимулировал увеличение частоты транзientной экспрессии у сорта Аврора на 30%, а у сорта Блюкроп на 65% [7].

Наличие глюкозы в среде для кокультивирования оказало существенное влияние на процесс переноса генов в листовые экспланты голубики исследуемых сортов. Так, при кокультивировании в течение 5 дней на среде содержащей глюкозу частота транзientной экспрессии GUS достигла 60% площади эксплантов сорта Нортланд (рисунок 2), и 65% эксплантов сорта Блюкроп. Тенденция к увеличению эффективности транзientной экспрессии GUS в листовых эксплантах голубики также наблюдали и при добавлении арабинозы на этапе кокультивирования. Наибольшее действие этот моносахар оказывал на 8 день кокультивирования, когда количество зон,

экспрессирующих *gusA* в эксплантах сорта Нортланд достигало 90%, сорта Блюкроп - 80%. Однако при таком длительном культивировании эксплантов на средах, содержащих арабинозу, зафиксирован интенсивный рост бактерий, не позволивший в дальнейшем избавиться от контаминации.

Заключение. Таким образом, анализ результатов проведенных экспериментов позволил сделать вывод, что все исследуемые факторы (время кокультивирования, добавление индукторов *vir*- генов - ацетосирингона, глюкозы и арабинозы) оказывают существенное влияние на процесс инфицирования эксплантов голубики супервирулентным штаммом *A. tumefaciens* СВЕ21. Установлено, что для голубики исследуемых сортов наиболее эффективно проведение кокультивирования в течение 5 - 6 дней, а также добавление в среду для инокуляции 100 мкМ ацетосирингона и в среду для кокультивирования – 100мМ глюкозы.

На основании анализа результатов транзientной экспрессии GUS гена разработана эффективная методика генетической трансформации голубики высокой хозяйственно-ценных сортов Нортланд и Блюкроп.



а

б

а – инокуляция без глюкозы; б – инокуляция со 100 мМ глюкозы

Рисунок 2 – Транзientная экспрессия GUS в эксплантах голубики сорта Нортланд при добавлении глюкозы на этапе инокуляции после 5 дней кокультивирования

Литература

- 1 Brencic A. Detection of and response to signal involved in host-microbe interaction by plant-associated bacteria / A. Brencic, S.C. Winans // Microbiol. and Mol. Biol. Rev. - 2005. - V. 69, № 1. - P. 155-194.
- 2 Gill, M.I.S. Factors affecting Agrobacterium-mediated genetic transformation in fruit and nut crops – An overview / M.I.S. Gill, Z. Singh, V. Agrez // Environment and Agriculture. – 2004. - Vol. 2. – P. 327–347.
- 3 Jefferson, R.A. The GUS reporter gene system / R.A. Jefferson // Nature. - 1987. - V. 342. – P. 837 – 838
- 4 Генная инженерия растений. Лабораторное руководство / Дж. Дрейпер [и др.]. – М.: Мир, 1991. – С. 11–232.
- 5 Lloyd, G. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture / G. Lloyd G., B. McCown // Comb. Proc. Intl. Plant Prop. Soc. – 1980. – Vol. 30. – P. 421–427.
- 6 Jefferson R.A. GUS fusion: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants / R.A. Jefferson, T. Kavanaugh, M.V. Bevan // EMBO J. - 1987. - V. 6. - P. 3901-3907.

7 Song, G.-Q. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) / G.-Q. Song, K.C. Sink // *Plant Cell Rep.* - 2004. - V. 23. - P. 475-484.