

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР «БИОРЕСУРСЫ»
ЦЕНТРАЛЬНЫЙ БОТАНИЧЕСКИЙ САД
Отдел биохимии и биотехнологии растений

**ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ПРИКЛАДНЫЕ
АСПЕКТЫ БИОХИМИИ
И БИОТЕХНОЛОГИИ
РАСТЕНИЙ**

Сборник научных трудов
III Международной научной конференции
14–16 мая 2008 г., Минск

*К 50-летию Отдела биохимии
и биотехнологии растений*

Минск
«Издательский центр БГУ»
2008

УДК 581:576.3(043.2)
ББК 28.55
Т33

Научные рецензенты:

д-р биол. наук, проф., акад. НАН Беларуси *В. Н. Решетников*;
д-р биол. наук, проф. *В. М. Юрин*;
д-р биол. наук, проф. *В. Л. Калер*

Редакционная коллегия:

*В. Н. Решетников, О. П. Булко, И. И. Паромчик, Т. И. Фоменко,
Е. В. Спиридович, Т. В. Антипова*

Теоретические и прикладные аспекты биохимии и биотехнологии растений : сб. науч. тр. 3-й Междунар. науч. конф., 14–16 мая 2008 г., Минск : к 50-летию Отд. биохимии и биотехнологии растений / НАН Беларуси, Центр. ботан. сад [и др.] ; редкол. : В. Н. Решетников [и др.] . — Минск : Изд. центр БГУ, 2008. — 562 с.
ISBN 978-985-476-604-1.

В сборнике изложены результаты исследований по составу, свойствам, организации интерфазных клеточных ядер и пластид высших растений, путей регулярного воздействия на ядерный аппарат, включая реконструкцию генома с помощью трансгеноза. Представлены отдельные проблемы регуляции морфогенеза растительных клеток и микроклонального размножения некоторых культур, использования молекулярных маркеров в документировании ботанических коллекций. Рассмотрены биохимические основы практического использования растительных ресурсов.

УДК 581:576.3(043.2)
ББК 28.55

ISBN 978-985-476-604-1

© Центральный ботанический сад
НАН Беларуси, 2008

УДК 582.951.4:581.143.6:577.1

КАЛЛУСО- И МОРФОГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ БАКТЕРИАЛЬНЫЙ ГЕН *CEL7*

Фоменко Т.И., Бердичевец Л.Г., Кузовкова А.А., Малюш М.К.

ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси», Минск,
ул. Сурганова 2в, e-mail: fomenko_ti@mail.ru

*Включение гена *cel7* под контролем различных структурных элементов в геном растений табака, влияя на гормональный статус трансгенных растений, изменяет каллусо- и морфогенную активность трансформантов. Показаны отличия по экспрессии бактериального гена *cel7* на уровне активности белкового продукта в линиях табака при тестировании методом выявления в полиакриламидном геле изоформ глюканаз.*

Интенсификация исследований на клеточном и молекулярном уровне, развитие генетики и современной биотехнологии сделали актуальным решение проблемы переноса и включения чужеродных генов с целью создания трансгенных растений и оценки их влияния на процесс онтогенеза. Основное внимание уделяется активации собственных генов растений, либо усилению экспрессии чужеродных генов. Изучение метаболизма трансгенных растений и немодифицированных растений позволяет предположить возможные изменения и определить биохимические и физиологические последствия проведенной генетической модификации [1, 2]. Изучение экспрессии бактериального гена *cel7* под контролем различных структурных элементов в дифференцированной и дедифференцированной ткани *in vitro* позволяет более полно оценить уровень экспрессии генов на тканевом уровне.

Контрольные и четыре линии трансгенных растений *pe1* (1.1 и 1.7), *pe2*, *pe3* и *pe4* [3] *Nicotiana tabacum* сорта *Samsun*, экспрессирующие бактериальный ген *cel7* с разными структурными элементами, культивировали *in vitro*. Режим культивирования: 16-часовой световой период, освещенность 3 клк, 22⁰ С. Для каллусообразования на листовых эксплантах растений табака использовали среды на основе МС: МСА (1мг/л ИУК, 0,1 мг/л БАП), МСБ (3мг/л ИУК, 0,1 мг/л БАП) и RMKU (1мг/л α-НУК, 1мг/л кинетин). Индукцию морфогенеза проводили на средах МСI – 1мг/л БАП, 0,1 мг/л ИУК и МСII – 2 мг/л БАП, 0,1 мг/л ИУК. Глюканазы экстрагировали 0,1М ацетатным буфером (рН 5.6) [4]. Разделение изоформ глюканаз проводили в 10% ПААГе в денатурирующих условиях в щелочной системе по Laemmli [5]. В разделяющий гель вносили 0,1% лихенан – полиглюкан [6].

Результаты и их обсуждение. Трансгенные растения всех линий отличались от контрольных замедленным ростом [3]. Причем растения, экспрессирующие ген *cel7* под контролем стрессоиндуцибельного промотора гена экстенсина моркови (ре1), практически не отставали в росте от контрольных растений, что может объясняться низкой активностью промотора в нормальных условиях роста растения и, следовательно, низким содержанием гетерологичной глюконазы. Растения, экспрессирующие бактериальный ген *cel7* с сигнальной последовательностью гена экстенсина моркови под контролем сильного промотора 35S вируса мозаики цветной капусты (ре2), отличались ускоренным побегообразованием и корнеобразованием, что характерно для повышенных концентраций эндогенных ауксинов. Усиленное корнеобразование трансгенных растений может быть вызвано также стимулирующим эффектом олигосахаридов, продуктов гидролиза бактериальной глюконазы, способных имитировать действие ауксинов [7]. Растения, экспрессирующие ген *cel7* с лидерной последовательностью под контролем слабого Tr2' промотора гена нополинсинтазы (ре3), отличались ослабленным побего- и корнеобразованием. Трансгенные растения, экспрессирующие бактериальный ген без лидерной последовательности гена экстенсина моркови под контролем слабого Tr2' промотора (ре4), отличаются пропорциональным, но замедленным ростом.

Морфологические отличия трансгенных растений показывают возможное изменение гормонального баланса, что дает основание исследования процессов дедифференциации и морфогенеза в культуре *in vitro*. С целью сравнения каллусогенной активности контрольного и трансгенных растений табака листовые экспланты растений высаживали на среды МСА, МСВ и РМКУ. Для всех вариантов наибольшая каллусогенная активность наблюдалась на среде РМКУ, на которой пролиферация шла в 3 – 4,5 раза активнее, чем на среде МСА и МСВ (табл. 1). Для большинства линий на среде МСА индекс роста каллусной ткани по сырой массе приближался к контрольному значению, исключением являлась только линия ре2, для которой он был в 1,4 раза ниже. Добавление в среду культивирования 3 мг/л ИУК способствовало увеличению каллусогенной активности в контрольном варианте и линиях ре1.1 и ре1.7, в то время как для линий ре2, ре3 и ре4 этот показатель близок величине, полученной на среде, содержащей 1 мг/л ИУК. Отличия от контроля и между трансформантами наиболее выражено проявились на средах с высокой активностью каллусогенеза.

Для подтверждения возможных изменений в эндогенном балансе трансгенных растений проведена оценка морфогенной активности листовых эксплантов на безгормональной среде МС. Развития побегов у всех

вариантов не было, однако отмечено корнеобразование, частота которого в контроле составила 66,7%, в то время как у линий pe1.1 - 30,0% и pe2 - 33,3%. У линии pe4 наблюдали идентичную с контролем реакцию. У линий pe1.7 и pe3 инициация ризогенеза была более интенсивной, чем в контроле, и составила 86,7% и 73,3%, соответственно. На основании полученных данных можно предположить, что у линий pe1.7 и pe3 эндогенный баланс сдвинут в сторону ауксинов.

Таблица 1

Сравнение каллусогенной активности листовых эксплантов трансгенных растений, экспрессирующих ген бактериальной β -1,4-глюканазы

| Растение | Среда | Индекс роста по сырой массе | % сухих веществ |
|----------|-------|-----------------------------|-----------------|
| Контроль | МСА | 86,92 ± 3,08 | 6,71 ± 0,13 |
| | МСБ | 110,48 ± 2,75 | 6,50 ± 0,03 |
| | RMKU | 337,29 ± 43,39 | 4,19 ± 0,12 |
| pe1.1 | МСА | 66,54 ± 3,49 | 7,66 ± 0,23 |
| | МСБ | 80,06 ± 4,67 | 7,02 ± 0,11 |
| | RMKU | 298,18 ± 15,62 | 3,83 ± 0,16 |
| pe1.7 | МСА | 94,33 ± 3,70 | 6,54 ± 0,13 |
| | МСБ | 123,22 ± 8,84 | 6,25 ± 0,08 |
| | RMKU | 312,29 ± 1,89 | 3,79 ± 0,05 |
| pe2 | МСА | 67,57 ± 1,71 | 6,81 ± 0,08 |
| | МСБ | 63,33 ± 1,61 | 7,34 ± 0,14 |
| | RMKU | 221,94 ± 38,61 | 4,30 ± 0,26 |
| pe3 | МСА | 87,83 ± 7,33 | 7,36 ± 0,21 |
| | МСБ | 80,35 ± 4,88 | 7,49 ± 0,21 |
| | RMKU | 261,77 ± 27,40 | 4,51 ± 0,05 |
| pe4 | МСА | 89,42 ± 6,63 | 6,87 ± 0,16 |
| | МСБ | 87,86 ± 4,06 | 6,39 ± 0,30 |
| | RMKU | 256,29 ± 1,39 | 3,81 ± 0,10 |

Для оценки морфогенного потенциала листовых эксплантов трансгенных растений использовали среды, содержащие ИУК (0,1 мг/л) и БАП (1 и 2 мг/л). Частота регенерации у всех вариантов составила 100%. Отличия трансгенных линий выявлены при подсчете числа адвентивных побегов на экспланте. Морфогенная активность линий трансгенных растений pe1.1, pe1.7 и pe 2 была выше, а у линий pe 3 и pe 4 не превышала контроля (табл. 2). При анализе размеров побегов отмечена аналогичная тенденция.

С целью сравнения морфогенной активности каллусной ткани, полученной на среде RMRU, исследовали две морфогенные среды МСI и МСII, где в качестве гормональных добавок использовали одинаковое количество ауксина (0,1 мг/л ИУК) и две концентрации цитокинина (МСI – 1мг/л БАП; МСII – 2 мг/л БАП). Оценка развития морфогенной реакции

показала, что после недели культивирования во всех вариантах наблюдали пролиферацию только каллусной массы без инициации побегообразования. Показано, что при культивировании каллусных тканей на среде МСІ только у линии ре3 уровень регенерации через две недели культивирования не отличался от контрольного варианта, в то время как для остальных линий трансгенных растений морфогенная активность была значительно выше (рис. 1). Так, частота регенерации у линии ре1.7 в 2,4 раза превышала контроль.

Таблица 2

Морфогенная активность листовой и каллусной ткани контрольного и трансгенных растений табака, экспрессирующих ген бактериальной β -1,4-глюканазы

| Вариант | Среда | Среднее число побегов на эксплант, шт, | |
|----------|-------|--|------------|
| | | листовой эксплант | каллус |
| Контроль | МСІ | 15,24 ± 0,74 | 7,00±1,07 |
| | МСП | 13,90 ± 0,78 | 10,57±1,23 |
| ре1.1 | МСІ | 17,52 ± 1,25 | 5.0.9±0.93 |
| | МСП | 17,40 ± 1,09 | 5.13±1.14 |
| ре1.7 | МСІ | 16,26 ± 1,45 | 6.10±0.97 |
| | МСП | 17,57 ± 1,13 | 9.14±1.14 |
| ре2 | МСІ | 18,86 ± 1,05 | 5.91±0.82 |
| | МСП | 22,39 ± 1,85 | 5.91±0.81 |
| ре3 | МСІ | 12,52 ± 0,70 | 6.71±0.70 |
| | МСП | 13,84 ± 1,36 | 10.14±1.07 |
| ре4 | МСІ | 13,24 ± 0,68 | 4.95±0.58 |
| | МСП | 12,00 ± 0,87 | 4.72±0.55 |

Подобную зависимость наблюдали и через три недели культивирования на фоне общего увеличения морфогенной активности. Исключение составила линия ре1.1, у которой частота регенерации была ниже контроля. Через четыре недели культивирования на среде МСІ частота регенерации этой линии увеличилась в 1,5 раза, но соотношение с контрольным вариантом осталось прежним.

Морфогенная активность линий ре1.7 и ре2 на протяжении всего периода культивирования на среде МСІ была выше, чем в контроле. Изменилась зависимость, наблюдавшаяся в течение предыдущего периода, между морфогенной активностью контроля и линий ре3 и ре4. Через четыре недели культивирования частота регенерации у линии ре3 стала выше, а у линии ре4 ниже, чем в контроле. Увеличение в среде культивирования концентрации БАП до 2 мг/л повлияло на морфогенную активность как контрольного, так и трансгенных растений табака, экспрессирующих

ген бактериальной β -1,4-глюканазы. Частота регенерации в контрольном варианте через две недели культивирования на среде МСII была в 1,5 раза выше, чем на среде МCI. При дальнейшем культивировании каллусной ткани контроля морфогенная активность на среде МСII была выше, чем на среде МCI.

Обратную зависимость наблюдали у линий трансгенных растений. Морфогенная активность у линий re1.1, re1.7 и re2 в течение всего периода культивирования на среде МСII была ниже, чем на среде МCI. Одновременно у этих линий морфогенез шел менее активно, чем в контроле. Хотя у линии re4 на начальном этапе культивирования частота регенерации на среде МСII была выше, чем на среде МCI и даже выше, чем в контроле, однако, через четыре недели культивирования наблюдалась обратная зависимость. Морфогенная активность каллусной ткани линии re3 на среде МСII через две недели культивирования была ниже, чем на среде МCI. При дальнейшем культивировании на среде МСII частота регенерации этой линии постепенно увеличивалась и достигала 100%, как и в контрольном варианте.

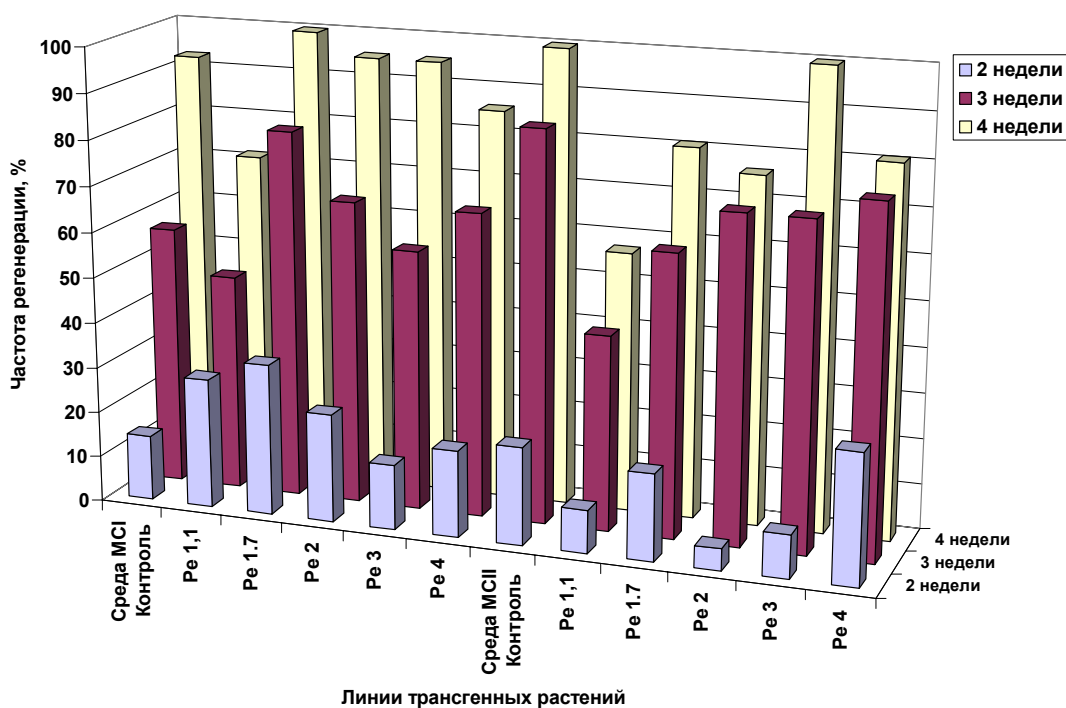


Рис.1. Динамика морфогенной активности каллусной ткани листа контрольного и трансгенных растений табака, экспрессирующих ген бактериальной β -1,4-глюканазы

Для характеристики морфогенной активности контрольного и трансгенных растений табака наряду с определением частоты регенерации про-

водили подсчет числа адвентивных побегов, образовавшихся на одном экспланте. Анализ полученных данных (табл. 2) показал, что регенерационная активность в контрольном варианте была выше, чем у трансгенных растений табака как на среде МСI, так и на среде МСII. В контрольном варианте с увеличением в среде культивирования концентрации БАП увеличилось число образовавшихся побегов на эксплантах в 1,5 раза. Число регенерантов, образовавшихся на каллусной ткани линий ре1.7 и ре3 на среде МСII приближалось к контролю, а для линий ре1.1, ре2 и ре4 было почти в два раза ниже контроля.

Оценивали также размер побегов как показатель интенсивности морфогенного процесса. Условно все побеги подразделялись на три группы: R1 – от 3 до 10 мм; R2 - от 11 до 30 мм; R3 – более 30 мм. Показано, что наибольшее число регенерантов принадлежало к R1 группе -от 72,43 до 90,89%. (табл. 3).

Таблица 3

Соотношение размера регенерантов каллусной ткани листа контрольного и трансгенных растений табака, экспрессирующих ген бактериальной β -1,4-глюканазы

| Вариант | Среда | Среднее число побегов на эксплант, шт, | Соотношение регенерантов разной степени развития, % | | |
|----------|-------|--|---|-------------|-------------|
| | | | 3 -10, мм | 11 – 30, мм | выше 30, мм |
| Контроль | МСI | 7,00±1,07 | 72,43 | 22,43 | 5,14 |
| | МСII | 10,57±1,23 | 78,43 | 18,92 | 2,74 |
| ре1.1 | МСI | 5.0.9±0.93 | 82.32 | 17.68 | 0 |
| | МСII | 5.13±1.14 | 86.16 | 13.84 | 0 |
| ре1.7 | МСI | 6.10±0.97 | 83.61 | 16.39 | 0 |
| | МСII | 9.14±1.14 | 86.43 | 13.57 | 0 |
| ре2 | МСI | 5.91±0.82 | 72.59 | 25.04 | 2.37 |
| | МСII | 5.91±0.81 | 78.17 | 20.14 | 1.69 |
| ре3 | МСI | 6.71±0.70 | 86.59 | 13.41 | 0 |
| | МСII | 10.14±1.07 | 87.77 | 12.23 | 0 |
| ре4 | МСI | 4.95±0.58 | 89.49 | 10.51 | 0 |
| | МСII | 4.72±0.55 | 90.89 | 9.11 | 0 |

Во всех вариантах процент побегов R1 группы на среде, содержащей 1 мг/л БАП, был ниже, чем на среде с 2 мг/л БАП. Одновременно с увеличением в среде культивирования концентрации БАП уменьшалась доля побегов, принадлежащих к R2 группе, как у контроля, так и у всех линий. Подобная зависимость наблюдалась и для побегов, размер которых превышал 30мм (R3 группа). Побеги этой группы обнаружены только в контрольном варианте и у линии ре2 трансгенных растений табака, причем в контроле их было больше.

Экспрессия бактериального гена *cel7* в линиях табака тестировали методом выявления изоформ глюканаз в полиакриламидном геле. Электрофоретическое разделение белков из дифференцированной ткани листьев трансгенных растений табака, содержащих ген *cel7*, и последующая окраска геля на выявление изоформ глюканаз, показали, что только у двух линий трансгенных растений идет активная экспрессия гена *cel7* и осуществляется синтез его белкового продукта β -1,4-глюканазы. В линиях табака *re2* и *re3* обнаружены глюканазы, термостабильные при +80°C и проявляющие максимальную активность при +60°C, что характерно исключительно для термостабильного бактериального модифицированного фермента. Причем высокая активность β -1,4-глюканазы выявляется в цитоплазматической фракции, тогда как в мембраносвязанной фракции обнаружены только следы данного фермента. Отмечено, что активность глюканазы у линии *re3* существенно выше, чем у рекомбинантов *re2* [4, 8].

Контрольные растения, а также рекомбинанты *re1* (*re1.1* и *re1.7*) и *re4* ни в цитоплазматической, ни в мембраносвязанной фракциях не проявляют глюканазную активность при температуре +60°C. Отсутствие же данного фермента в каллусной ткани линий *re1*, как и в случае листовой ткани этих линий, может объясняться низкой активностью индуцибельного промотора гена экстенсина моркови. Наиболее высокая активность β -1,4-глюканазы выявлена в цитоплазматической фракции белков каллусной ткани табака, тогда как в мембраносвязанной фракции и фракции белков клеточной стенки активность ферментов значительно ниже. При этом глюканаза обнаружена только во фракции цитоплазматических белков каллуса линии *re4*.

Заключение. Исследование процессов каллусо- и морфогенеза дифференцированной и дедифференцированной ткани показало, что введение в геном табака гена *cel7* привело к изменению уровня активности этих процессов в трансгенных растениях. Наибольший интерес представляет линия *re2*, у которой по числу регенерантов, полученных на листовых эксплантах, отмечено значительное превышение контроля. Также по активности морфогенных процессов можно выделить линии 1.1 и 1.7. В линии *re2* ген *cel7* обладает лидерной последовательностью экстенсина моркови и двумя промоторами – сильным 35S вируса мозаики цветной капусты и слабым – Tr2' гена наполинсинтетазы. Возможно, что именно включение такой конструкции наиболее значительно оказывает влияние на развитие морфо- и каллусогенеза. Однако, сами по себе дедифференциация и редифференциация являются весьма сложными процессами активации и реактивации генома. Поэтому, несмотря на то, что только в линиях *re2* и *re3* обнаружен высокий уровень активности глюканазы, это

видимо не является единственным фактором, определяющим каллусо- и морфогенную реакцию. При тестировании активности бактериального гена *cel7* в гетерологичном окружении обнаружен феномен эпигенетической регуляции экспрессии трансгена в линии ре4. Приведенные результаты исследований позволяют предположить, что включение гена *cel7* в геном, влияя на гормональный статус трансгенных растений, изменяет каллусо- и морфогенную активность трансформантов.

Литература

1. Получение и анализ трансгенных растений табака, экспрессирующих агробактериальный ген триптофанмонооксигеназы / В.В.Алексеева, Е.Б. Рукавцова, М.Е. Бобрешова и др. // Физиол. растений. – 2004.- Т.51, № 4. – С.600-606.
2. Романов Г.А. Генетическая инженерия растений и пути решения проблемы биобезопасности // Физиол. растений.- 2000.- Т.47, №3.- С. 343-353.
3. Василевко В.Т. Модель переноса гена бактериальной полиглюкангидролазы (β -1,4-глюканаза) в растения табака как способ защиты растений от фитопатогенов / Дис. канд. биол. наук. - Минск.- 2002.- 84 с.
4. Феномен эпигенетической регуляции экспрессии трансгена *cel7* в растениях *Nicotiana tabacum* Решетников В.Н., Ленец А.А., Фоменко Т.И., Бердичевец Л.Г., Малуш М.К. Молекулярная и прикладная генетика.- Сб. науч. трудов.- Минск.-2006.- Т.3.-С. 90-95.
5. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature, 1970. V.227. P.680-685.
6. Schwarz W.H., Bronnenmeier K., Grabnitz F., Staudenbauer W.L. Activity staining of cellulases in polyacrylamide gels containing mixed linkage β -glucans // Anal. biochemistry, 1987. V.164. P.72-77.
7. Fry S.C. Cellulases, hemicelluloses and auxin-stimulated growth: a possible relationship // Physiol.Plantaum.-1989.-Vol.75.-P.532-536.
8. Сравнительный анализ экспрессии бактериального модифицированного гена *cel7* в дифференцированной, дедифференцированной и редифференцированной ткани табака *Nicotiana tabacum*. Ленец А.А., Шабуня П.С., Бердичевец Л.Г., Фоменко Т.И Молекулярная и прикладная генетика.- Сб. науч. трудов. - Минск.-2005.-Т.1.- С. 93.

Summary

Inclusion of a gene *cel7* under the control of various structural elements into tobacco plants genome, influencing the hormonal status of transgenic plants, changes callus and morphogenic activity of transformants. Differences on bacterial gene *cel7* expression in tobacco lines were revealed at albuminous product activity level during the testing of glucanase isoforms by method of revealing in polyacrylamide gels.