

**ГЕНОМИКА, ПРОТЕОМИКА
И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ РАСТЕНИЙ:
ПЕРСПЕКТИВЫ ПРАКТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ**

Геномика, протеомика, метаболомика, транскриптомика и биоинформатика – новые направления биологической науки, задача которых заключается в интегрировании информации, получаемой в результате различных исследований, в единую систему. Эти науки определяют начало XXI века, так же, как молекулярная биология, иммунология и биотехнология определяли конец XX века.

17.1. Геномика растений

Геномика – это комплексная наука, посвященная изучению геномов и отдельных генов живых организмов. Геномика сформировалась как особое направление в 1980–90-х гг. вместе с возникновением первых проектов по секвенированию геномов живых организмов [1]. Для отдела биохимии и биотехнологии растений ЦБС НАН Беларуси исследования в области геномики растений являются новыми. Первые исследования были проведены кандидатом биологических наук А. Б. Власовой, аспирантом Н. А. Шугалей под руководством кандидата биологических наук Е. В. Спиридович на сортах сои белорусской селекции с разной активностью пероксидазы в оболочках семян. Ранее из растений сои, различающихся по накоплению и активности пероксидазы в оболочках семян, был клонирован ген пероксидазы и в нем обнаружен Ер-локус, ответственный за экспрессию данного фермента [2]. Установлено, что неспособность растений сои накапливать в семенных оболочках пероксидазу является результатом мутации (делеции) структурного гена. А. Б. Власова, Н. А. Шугалей, Е. В. Спиридович провели скрининг 39 сортов (генотипов) сои белорусской и зарубежной селекции по активности пероксидазы оболочек семян. Были выделены два сорта сои белорусской селекции, контрастные по накоплению и активности данного фермента: сорт Припять (с высокими показателями) и Ясельда (с низкими показателями). **RT-ПЦР-анализ** исследуемых сортов сои с помощью специфичных к Ер-локусу праймеров показал наличие теоретически рассчитанного фрагмента амплификации 225 bp у сорта Припять и отсутствие его у сорта Ясельда. Данные исследования были проведены в рамках сотрудничества с лабораторией нехромосомной наследственности Института генетики и цитологии НАН Беларуси (заведующий – член-корреспондент НАН Беларуси О. Г. Давыденко), которая предоставила сорта сои для исследований.

В настоящее время сотрудниками отдела биохимии и биотехнологии растений ЦБС НАН Беларуси (канд. биол. наук А. Б. Власова, канд. биол. наук О. В. Чижик, канд. биол. наук Е. В. Спиридович, А. Н. Юхимук, А. М. Деева) по заданию «Характеристика, анализ и маркирование ДНК-локусов, кодирующих устойчивость к экзогенным факторам и синтез биологически активных веществ у природных форм и культурно возделываемых представителей рода *Vaccinium*» (научный руководитель – академик В. Н. Решетников), входящем в ГПНИ «Фундаментальные основы биотехнологий» (2011–2015 гг.), проводится сравнительная генетическая паспортизация различных культурно возделываемых генотипов (сортов, таксонов, форм) и видов дикой флоры рода *Vaccinium*. Выделены сорта голубики высокорослой с повышенным содержанием антоцианов в ягодах. В будущем планируется идентифицировать области генома, отвечающие за биосинтез вторичных метаболитов. На основе полученных результатов будет разработана система генетических и биохимических маркеров биосинтеза биологически активных веществ, которые найдут применение в селекции *Vaccinium*.

17.2. Общая протеомика растений

С 2000 г. в биологии растений наступила постгеномная эра: после завершения секвенирования первого растительного генома (арабидопсиса) необходимым стал анализ его экспрессии, и протеомика приобрела новое значение [3]. Идентификация белков, кодируемых геномами, является основной задачей современной протеомики растений. Геном и транскриптом (совокупность мРНК) растений относительно стабильны, тогда как протеом постоянно меняется, реагируя на воздействия целого ряда экзогенных и эндогенных факторов (условия произрастания, стрессы, воздействие регуляторов, регуляция экспрессии генов и т. д.), поддерживая физиологическое равновесие в клетке [4]. Результаты комплексных сравнительных исследований геномов, транскриптомов, протеомов и метаболомов взаимно дополняют друг друга и способствуют формированию наиболее полной картины клеточных процессов, происходящих в растении.

Отдел биохимии и биотехнологии растений ЦБС первым в Беларуси в 1968 г. начал протеомные исследования, с момента освоения В. Н. Решетниковым метода электрофореза белков в полиакриламидном геле. К сегодняшнему дню в отделе разработаны методические подходы протеомного анализа общего пула и суборганелльных белков растительной клетки с использованием разных типов 1D- и 2D-электрофореза, включая самый высокоразрешающий вид электрофореза, состоящий из изоэлектрофокусирования (ИЭФ) и электрофореза в денатурирующей системе (с додецилсульфатом натрия, ДДС) в щелочных условиях (ДДС-электрофорез). Выполненные сотрудниками отдела исследования были подчинены двум стратегическим целям современной протеомики и состояли в следующем:

разработка схем выделения общего пула белков клетки, а также схем фракционирования ядерных и хлоропластных белков с целью наиболее точного и полного отражения белкового состава каждой фракции и клеточной органеллы в целом;

выявление изменений протеома клетки, субпротеомов ядра и хлоропластов, происходящих в процессе развития растения и при воздействии внешних факторов, для исследования механизмов эпигенетического контроля экспрессии генов.

17.2.1. Протеомные исследования клеточных ядер растений

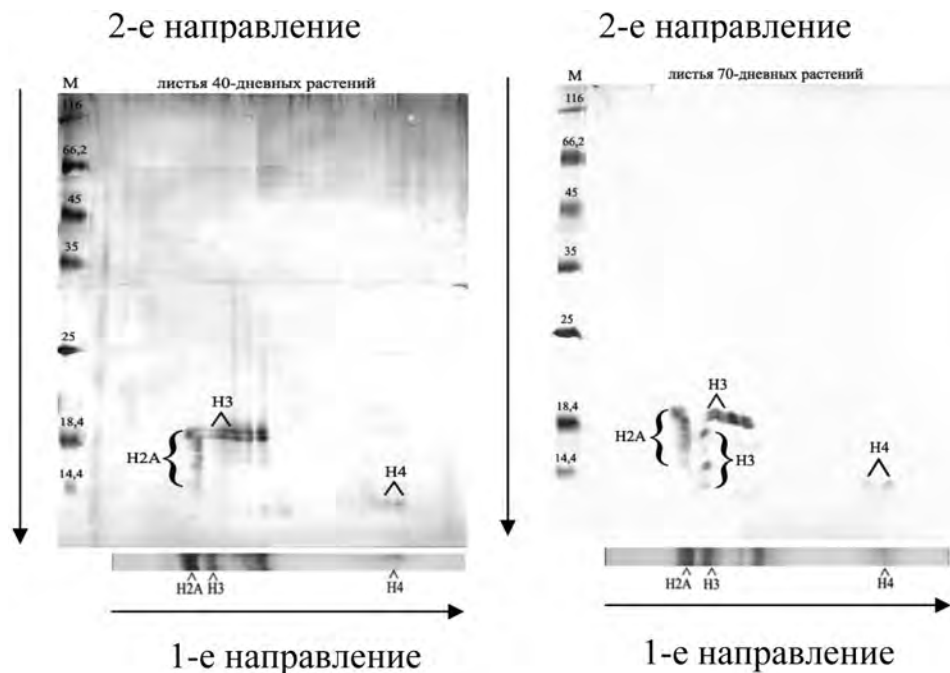
Клеточное ядро растений, будучи сложной и динамичной органеллой, содержит различные субструктуры, которые характеризуются отсутствием разделяющих их мембран, но имеют особые субпротеомы и функции. Данные субструктуры можно рассматривать как «компарменты», морфологически различимые при микроскопии [5]. Для выделения функциональных компарментов ядер растений сотрудниками отдела биохимии и биотехнологии растений ЦБС используются пять схем фракционирования ядер, основанных на применении водных растворов различной ионной силы и детергентов, а также с применением дифференциального центрифугирования. Применяя схему избирательной (ступенчатой) экстракции белковых комплексов ядер для проростков озимой ржи, группой исследователей (академик В. Н. Решетников, канд. биол. наук О. К. Лаптева, канд. биол. наук Е. В. Спиридович, канд. биол. наук О. В. Чижик, канд. биол. наук Т. Ф. Сосновская, канд. биол. наук Л. В. Гончарова) получены, разделены методом 1D-электрофореза (ДСН-электрофореза) и окрашены раствором азотнокислого серебра: 1) нуклеоплазматические белки; 2) белки слабо связанного с матриксом хроматина (диффузный хроматин или эухроматин I, в основном нуклеосомные фибриллы); 3) диффузный хроматин или эухроматин II (в основном 30 нм-фибриллы); 4) белки прочно связанного с матриксом хроматина (компактный хроматин, гетерохроматин); 5) белки ядерного матрикса [6]. Установлено, что прорастание зерновки озимой ржи (активация экспрессии генома) сопровождается увеличением гетерогенности ядерного протеома.

Применив вышеописанную схему эксперимента, было изучено (канд. биол. наук П. С. Шабуня, канд. биол. наук А. А. Кузовкова) накопление белков теплового шока (БТШ) в ядрах проростков озимой ржи Пуховчанка в условиях высокотемпературного стресса. Установлено, что кратковременный тепловой шок стимулирует в ядрах синтез низко- и высокомолекулярных БТШ. Наибольшим разнообразием БТШ обладали клеточные ядра проростков озимой ржи на стадиях прорастания и развития coleoptilya, при этом большая часть ядерных БТШ была свободно локализована в нуклеоплазме озимой ржи, а остальные были связаны с хроматином и ядерным матриксом [7].

Для более детального исследования компарментов ядра сотрудники отдела применяют методики выделения отдельных групп белков (например,

гистонов, НМГ и других негистоновых белков). Так, О. В. Чижик, используя 2D-электрофорез (1-е направление – электрофорез в кислых условиях с мочевиной, 2-е – электрофорез в щелочных условиях с ДСН), провела сравнительный анализ компонентного состава гистонов озимой ржи Верасень и секалотритикума S206 и выявила для каждого вида маркерные субфракции гистона Н1. Белковые маркеры широко применяются при идентификации видов, сортов, гибридов зерновых культур [8, 9]. Традиционно в качестве белковых маркеров зерновых культур используют запасные белки семян. В. Н. Решетников, О. В. Чижик предложили для этой же цели использовать фракцию гистона Н1, который в эволюционном отношении не отличается консерватизмом, как это показано для коровых гистонов [10].

Используя АУТ-электрофорез в качестве 1-го направления, а ДСН-электрофорез – в качестве 2-го направления 2D-электрофореза, группой исследователей (канд. биол. наук А. А. Кузовкова, канд. биол. наук П. С. Шабуня, канд. биол. наук О. В. Чижик) проведен сравнительный анализ кислоторастворимых ядерных белков 40- и 70-дневных растений табака. Установлено (рис. 17.1), что в листьях табака разного возраста экспрессируются различные субфракции гистона Н3. Данный факт был подтвержден MALDI-TOF-TOF масс-спектро-



М – белки-маркеры молекулярных весов в кДа
 H2A, H2B, H3 и H4 – гистоны

Рис. 17.1. 2D-электрофорез кислоторастворимых ядерных белков 40- и 70-дневных растений табака

метрией и последующим анализом базы данных Mascot, в ходе которого искомые белки показали гомологию с гистонами H3 *Glycine tabacina*, *G. falcata*, *G. max*, *G. tomentella*, *G. clandestina*, *Teramnus labialis*, *Dumasia villosa*, *Pseude-minia comosa*, *Marchantia polymorpha* [11].

Однако наиболее чувствительным на настоящий момент является изофокусирование (ИЭФ) в ПААГ с иммобилизованным градиентом pH, а в качестве 2-го — ДСН-электрофорез. Использование иммобилизованного в ПААГ градиента pH позволяет преодолеть проблемы воспроизводимости результатов, разрешения и разделения сильно кислых и/или основных белков, определяемые амфолитами, формирующими градиент pH. Данный тип электрофореза был применен сотрудниками отдела (А. Б. Власова, Е. В. Спиридович, А. А. Кузовкова) для разделения широкой группы ДНК-связывающих белков, которые были выделены по методу Giavalisco [12] напрямую из 72-часовых проростков озимой ржи Верасень, выращенных из контрольных и обработанных электромагнитным излучением миллиметрового диапазона нетепловой интенсивности (КВЧ-излучением) зерновок. Субпротеом опытных проростков озимой ржи отличался по компонентному составу полипептидов от такового контрольных растений (рис. 17.2). С помощью MALDI-TOF-TOF масс-спектрометрии в опытных растениях был идентифицирован один из дифференциально экспрессируемых белков (на рис. 17.2 обозначен овалом). Результаты исследований показали гомологию искомого белка с 30 растительными белками, 19 из которых являются БТШ 70 различных видов растений. Процент гомологии достигал 62–89%.

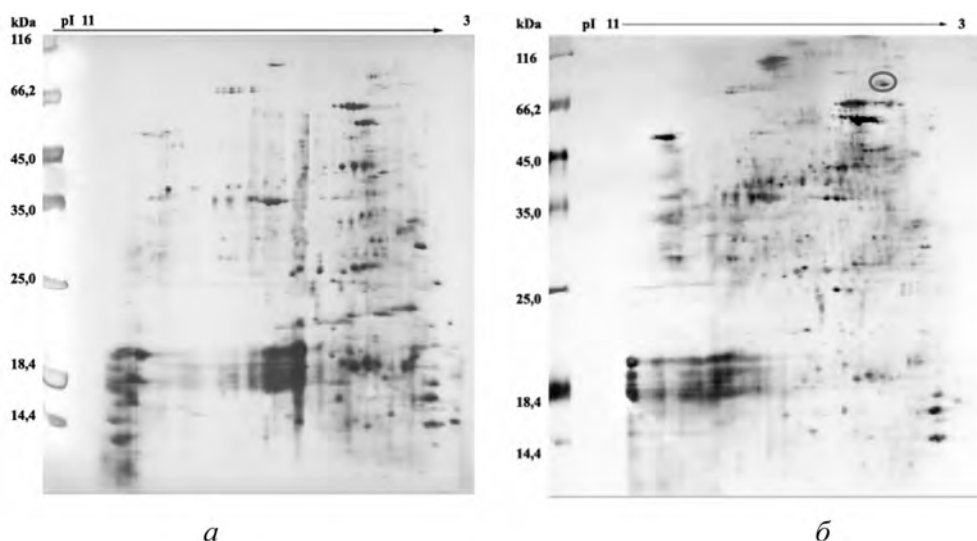


Рис. 17.2. 2D-электрофореграммы ядерных ДНК-связанных белков 72-часовых проростков озимой ржи Верасень, выращенных из контрольных (а) и обработанных КВЧ-излучением (б) зерновок

17.2.2. Протеомные исследования хлоропластов растений

Кандидатом биологических наук А. А. Кузовковой разработаны методические подходы к протеомному анализу хлоропластов озимой ржи с использованием 2D-электрофореза (ИЭФ на ПААГ-стрипах с иммобилизованным градиентом рН и ДСН-электрофорез) [13]. В ходе первичного протеомного анализа во фракции легкорастворимых хлоропластных белков 168-часовых проростков озимой ржи Верасень выявлено около 250 белков (рис. 17.3). Некоторые группы белков, содержащиеся в больших количествах, были предположительно идентифицированы, основываясь на представленных в литературе 2D-электрофореграммах хлоропластных белков *Arabidopsis* [14], гороха [15] и кукурузы [16]. В частности, это изоформы полифенолоксидазы (PPO), большие субъединицы рибулозобифосфаткарбоксилазы (RbcL), белки АТФ-синтетазного (CF α,β -cluster) и кислородвыделяющих (OEC 33-cluster, OEC 23-cluster, OEC 16) комплексов, пластоцианины (PLAS) и белок PsaN из фотосистемы I. Во фракции труднорастворимых хлоропластных белков 168-часовых проростков озимой ржи выявлено около 100 белков.

Вышеописанный подход к проведению протеомного анализа хлоропластов А. А. Кузовкова применила при исследовании влияния КВЧ-излучения на физиолого-биохимическое состояние злаковых. Обработка зерновок озимой ржи КВЧ-излучением в течение 15 мин изменила экспрессию ряда хлоропластных

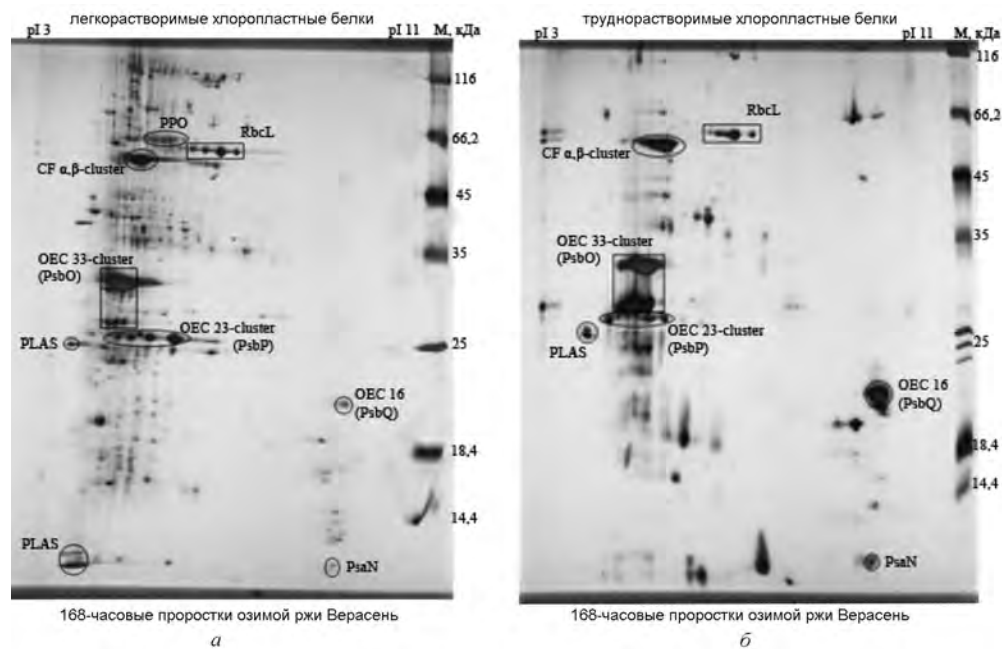


Рис. 17.3. 2D-электрофореграммы легко- (а) и труднорастворимых (б) хлоропластных белков 168-часовых проростков озимой ржи Верасень

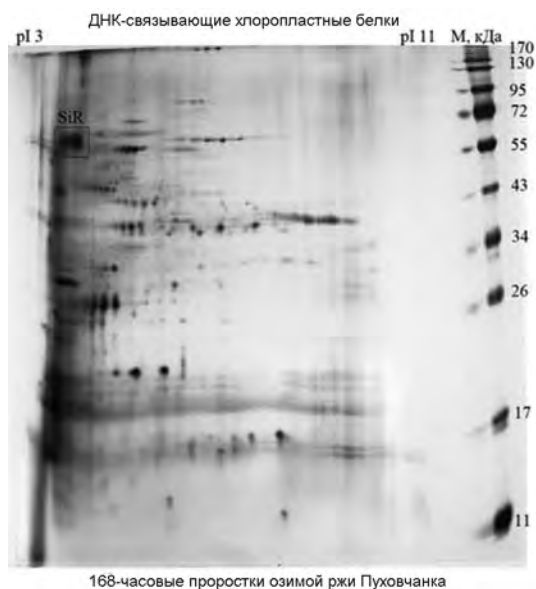


Рис. 17.4. 2D-электрофореграмма ДНК-связывающих нуклеоидных хлоропластных белков 168-часовых проростков озимой ржи Лота

168-часовые проростки озимой ржи Пуховчанка

которые компактизируют ДНК в структуры, известные как нуклеоиды. В отделе биохимии и биотехнологии растений ЦБС НАН Беларуси исследованием ДНК-белковых комплексов хлоропластов злаковых впервые занялись в 1980-е гг. (канд. биол. наук А. М. Ялошевич, канд. биол. наук И. В. Голденкова, под руководством академика В. Н. Решетникова). Позже исследования нуклеоидов злаковых были продолжены А. А. Кузовковой. ДНК-связывающие и другие (остаточные) нуклеоидные белки 168-часовых проростков озимой ржи Лота были разделены 2D-электрофорезом (ИЭФ на ПААГ-стрипах с иммобилизованным градиентом рН и ДСН-электрофорез), и была предпринята попытка первичного анализа субпротеомов нуклеоидов озимой ржи (рис. 17.4). Выявлено около 70 четко различимых белковых зон. Главным мажорным белком субпротеома ДНК-связывающих нуклеоидных белков хлоропластов озимой ржи является белок с молекулярной массой около 68 кД, обладающий, по сведениям G. C. Cannon et al. [17], способностью компактизировать хлоропластную ДНК.

17.2.3. Прикладные исследования протеома растений

Протеом семян растений. Начиная с 1990-х гг. в отделе биохимии и биотехнологии растений по инициативе В. Н. Решетникова используется электрофоретическое разделение запасных белков для характеристики и маркирования форм и сортов сельскохозяйственных культур, что позволяет при селекционном процессе осуществлять внутрисортовой отбор и выделять биотипы с необходимыми свойствами, а также находить применение в паспортиза-

белков 7-суточных проростков озимой ржи. В частности, была снижена экспрессия белков из CF α, β -cluster и ОЕС 33-cluster, но при этом усилена экспрессия одного из белков ОЕС 23-cluster. Также вследствие КВЧ-излучения модифицирована экспрессия отдельных изоформ RbcL (измененный рисунок шлейфа белковых пятен) и некоторых неидентифицированных нами хлоропластных белков.

Пластиды высших растений имеют кольцевой геном (пластом), который содержит гены, кодирующие белки, участвующие в фотосинтезе и транспорте электронов, а также компоненты, необходимые для транскрипции и трансляции внутри органеллы. Пластом организован с помощью белков, кото-

ции растений. Сотрудниками отдела (канд. биол. наук А. А. Веевник, канд. биол. наук Е. В. Спиридович, канд. биол. наук Л. В. Гончарова, канд. биол. наук Н. Ю. Королева) проведен анализ протеома и ферментных комплексов (амилаз, протеаз и ингибиторов протеаз) зерновок разных сортов и форм ячменя, ржи, пшеницы, тритикале и секалотритикума, созданных селекционерами РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию» [8, 18].

Сотрудниками отдела И. П. Кондрацкой, канд. биол. наук Т. И. Фоменко по заданию ГПОФИ «Селекция, семеноводство и генетика» совместно с лабораторией многолетних трав РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию» исследован общий пул и запасные белки зерновок новых отдаленных гибридов овсяницы луговой и тростниковой и выделены гибриды, являющиеся генисточниками улучшения кормовых показателей овсяницы. По результатам исследований подана заявка на получение авторского свидетельства на новый сорт овсяницы тростниковой «Таямница» (рис. 17.5).

Протеомный статус клеток лекарственных растений. ЦБС НАН Беларуси, располагая богатейшим генофондом местной и интродуцированной флоры (около 10 тыс. таксонов), имеет возможности и перспективы развития протеомных исследований наиболее ценных видов из коллекционных фондов, в том числе в культуре *in vitro*. Сегодня сотрудниками отдела (канд. биол. наук А. А. Кузовкова, канд. биол. наук О. В. Чижик, Т. В. Мазур) по заданию «Структурные и регуляторные белки клетки и компартментов органелл как показатель физиологического состояния и уровней накопления вторичных метаболитов дедифференцированными тканями лекарственных растений» (научные руководители – академик В. Н. Решетников, канд. биол. наук Е. В. Спиридович), входящем в ГПНИ «Фундаментальные основы биотехнологий» (2011–2015 гг.), проводится сравнительный анализ протеомного и метаболомного статуса дифференцированных тканей (лист, стебель, корень) полевых, оранжерейных и *in vitro* растений многоколосника морщинистого (*Agastache rugosa*), а также дедифференцированных (каллусных) клеток, полученных из листовых, стеблевых и корневых эксплантов, с целью идентифицировать ключевые белки, ответственные за биосинтез биологически активных веществ, и разработать подходы к направленной регуляции метаболизма данного лекарственного растения.

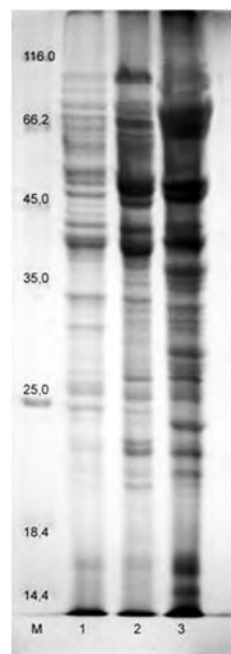


Рис. 17.5. 1D-электрофореграммы общих белков семян межродовых гибридов и их родительских форм: 1 – овсяница тростниковая дикая из Франции; 2 – межродовой гибрид – сорт Таямница (получен при скрещивании овсяницы луговой сорта Зорка и овсяницы тростниковой дикой из Франции); 3 – овсяница луговая сорта Зорка; М – белки-маркеры молекулярных весов в кД

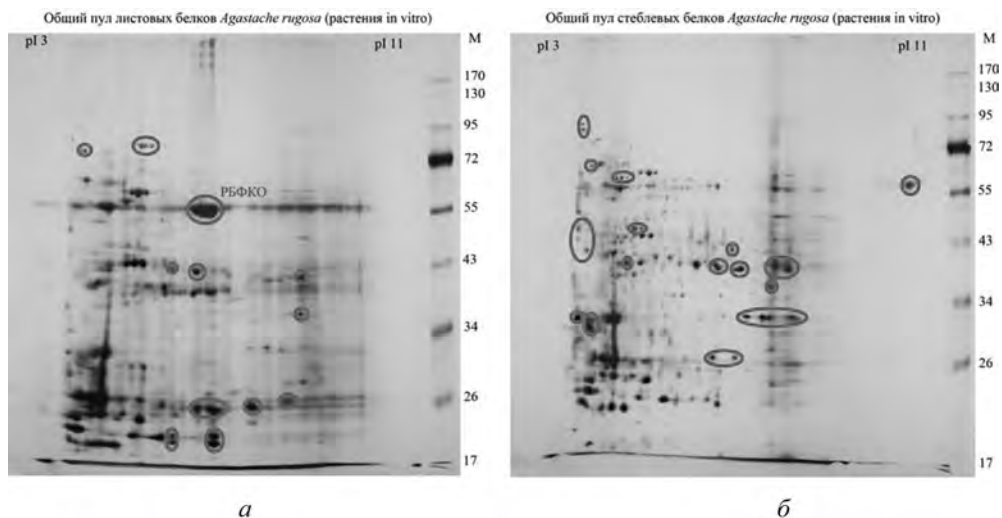


Рис. 17.6. 2D-протеомные карты дифференцированных тканей листа (а) и стебля (б) *A. rugosa*

На сегодняшний день сотрудниками отдела биохимии и биотехнологии растений (канд. биол. наук А. А. Кузовкова, канд. биол. наук О. В. Чижик) получены 2D-протеомные карты дифференцированных тканей листа и стебля *in vitro* растений многоколосника морщинистого (рис. 17.6), а также дедифференцированных (каллусных) клеток, иницированных из листовых и стеблевых эксплантов. Проведен первичный анализ протеомных карт и выявлены отличия в экспрессии ряда белков (на картах показаны овалами).

17.3. Генетическая инженерия растений

Первыми трансгенными растениями, созданными сотрудниками отдела биохимии и биотехнологии растений ЦБС, были растения *Nicotiana tabacum* cv Samsun, экспрессирующие ген β -1,4-глюканазы из термофильной бактерии *Clostridium thermocellum*. Данные растения были получены канд. биол. наук В. Т. Василевко на базе Института молекулярной генетики РАН (г. Москва) под руководством профессора Э. С. Пирузян. Введение в геном табака бактериального гена β -1,4-глюканазы повысило устойчивость растений к фитопатогену *Erwinia caratovora* и одновременно увеличило чувствительность к *Pseudomonas fluorescens*. Созданные трансгенные растения являются модельными и могут быть использованы для изучения влияния бактериального гена на экспрессию генов растения [19].

Другие модельные трансгенные растения *N. tabacum* cv Samsun были получены научными сотрудниками Л. Г. Бердичевец и М. К. Малюш под руководством канд. биол. наук Т. И. Фоменко на базе отдела биохимии и биотехнологии растений ЦБС. Для агробактериальной трансформации использовали штамм *A. tumefaciens*, несущий плазмиду E35S-licBSK с геном *licB*,

кодирующим фермент β -1,3-1,4-эндоглюканазу (лихеназу). Данный ген был клонирован из анаэробной грамположительной термофильной бактерии *C. thermocellum* и встроен в плазмиду E35S-licBSK сотрудниками лаборатории генетической инженерии растений Института общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН под руководством проф. Э. С. Пирузян [20,21]. В настоящее время трансгенные растения табака поддерживаются в коллекции культур *in vitro* отдела биохимии и биотехнологии растений ЦБС НАН Беларуси.

Следующими объектами для агробактериальной трансформации стали декоративные и древесно-ягодные растения, такие как гиацинт восточный, брусника обыкновенная и клюква крупноплодная. Для развития генной инженерии растений в отделе была сформирована новая тематическая группа, сотрудники которой (канд. биол. наук Е. А. Попович, В. Л. Филипня, канд. биол. наук О. В. Чижик, канд. биол. наук Т. В. Антипова, В. И. Горбачевич, магистрант Е. Скриган) разработали эффективные технологии адвентивной регенерации побегов, транзиентной и стабильной трансформации гиацинта, брусники и клюквы. Ими впервые в Беларуси получены трансгенные растения гиацинта восточного, брусники обыкновенной и клюквы крупноплодной, в которых стабильно экспрессируются трансгены.

17.3.1. Генетическая трансформация гиацинта восточного

В экспериментах по генетической трансформации гиацинта восточного (*Hyacinthus orientalis* L.) Е. А. Попович и В. Л. Филипня использовали стабилизированные асептические культуры сортов Edison, Peter Stuyvensan и Chine Pink из коллекции ЦБС НАН Беларуси. Генетическую трансформацию проводили супервирулентным штаммом *A. tumefaciens* СВЕ 21, содержащим бинарный вектор pBIT_{hau35} с геном белка тауматина II из плодов *Thaumatococcus danielli* L. под контролем промотора 35S РНК CaMV, любезно предоставленным директором станции искусственного климата «Биотрон» С. В. Долговым в рамках договора о научно-исследовательской деятельности между Филиалом Института биоорганической химии РАН и ЦБС НАН Беларуси [22]. В результате Е. А. Попович и В. Л. Филипня получили 4 линии трансгенных растений (Но140 сорта Edison и Но7401, Но7402, Но7403 сорта Chine Pink) с подтвержденным ПЦР-анализом встраиванием кассеты в геном и доказанным вестерн-блоттингом синтезом белка (рис. 17.7).

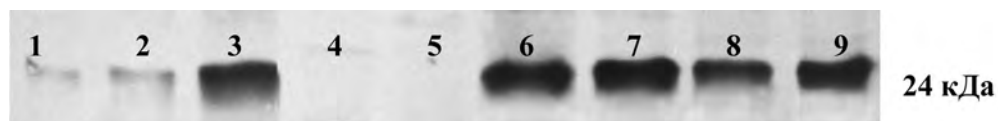


Рис. 17.7. Иммунологический анализ экспрессии тауматина в побегах трансгенных линий и контрольных растений гиацинта восточного: 1, 2, 3 – разведения коммерческого препарата тауматина (Sigma) в количестве 5, 10, 15 нг на дорожку соответственно; 4 – контроль сорт Edison; 5 – контроль сорт Chine Pink; 6 – трансгенная линия No140; 7 – трансгенная линия No7401; 8 – трансгенная линия No7402; 9 – трансгенная линия No7403

Трансгенные линии гиацинта с экспрессирующимся белком тауматином II были тестированы на устойчивость к патогенам *Fusarium oxisporum*, *F. culmorum*, *Botrytis cinerea* и *E. corotovora*. У луковиц трансгенных линий проявлялась большая толерантность к *F. oxisporum*, *F. culmorum*, *B. cinerea*, чем у побегов тех же линий. Линии Но7401 и Но7402 сорта Chine Pink отличались большей толерантностью к грибным патогенам, чем линия Но140 сорта Edison. В настоящее время трансгенные растения гиацинта восточного поддерживаются в коллекции культур *in vitro* отдела биохимии и биотехнологии растений ЦБС НАН Беларуси.

17.3.2. Генетическая трансформация брусники обыкновенной

Брусника обыкновенная (*Vaccinium vitis-idaea* L.) относится к труднотрансформируемым видам, поэтому сотрудники отдела биохимии и биотехнологии растений ЦБС НАН Беларуси (Т. В. Антипова, В. Л. Филипена, О. В. Чижик, Е. Скриган) технологию ее агробактериальной трансформации разрабатывали с использованием транзientной экспрессии в листовых эксплантах репортерного гена *gus*, кодирующего фермент β-глюкуронидазу. Экспланты брусники обыкновенной сортов Red Pearl, Koralle и Ammerland инфицировали штаммом *A. tumefaciens* CBE21, содержащим бинарный вектор p35SGUSint (штамм любезно предоставлен нам директором станции искусственного климата «Биотрон» С. В. Долговым в рамках договора о научно-исследовательской деятельности между филиалом Института биоорганической химии РАН и ЦБС НАН Беларуси). Транзientную экспрессию анализировали сразу же после кокультивирования эксплантов с *A. tumefaciens* подсчетом числа экспрессирующих GUS зон, проявляющихся как голубые очаги и локусы на эксплантах. Для повышения частоты трансформации листовых эксплантов в среду для инокуляции добавляли ацетосирингон (рис. 17.8, см. цв. вклейку).

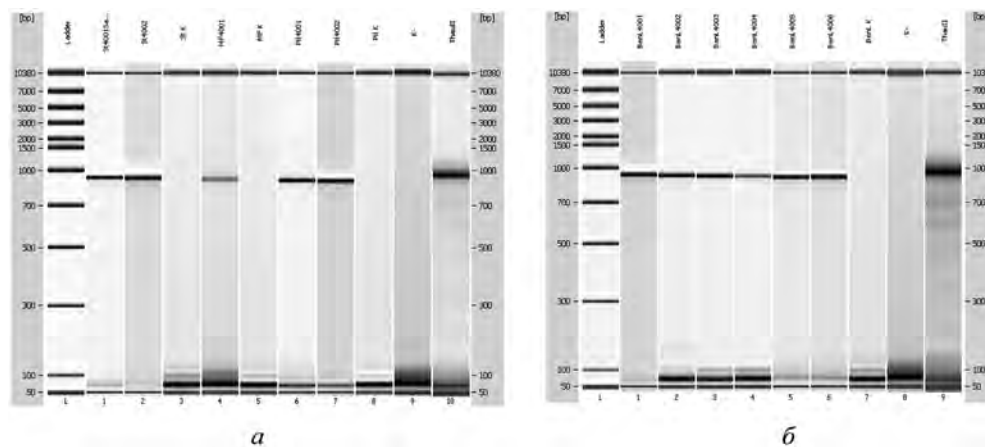
В итоге после успешной агробактериальной трансформации брусники сорта Red Pearl и селекции регенерантов на среде с канамицином (рис. 17.9, см. цв. вклейку) были отобраны 11 линий, из которых произвольно выбрали две (RPgus28 и RPgus36) для подтверждения наличия генов неомицинофосфотрансферазы и β-глюкуронидадсинтетазы методом ПЦР.

Функциональность экспрессирующей кассеты 35S-*uidA*-3'-nos, интродуцированной в растения брусники обыкновенной анализировалась гистохимическим окрашиванием листовых пластинок с черешками трансгенных растений. Трансгенные линии RPgus28 и RPgus36 брусники обыкновенной сорта Red Pearl были подвергнуты летальной селекции на среде со 100 мг/л канамицина и прошли 2 субкультивирования после отделения от первичного экспланта. Активность GUS визуально детектировалась в листьях и стеблях всех трансгенных линий брусники, в то время как голубого окрашивания не наблюдалось в контрольных нетрансформированных побегах. В настоящее время трансгенные растения брусники обыкновенной поддерживаются в коллекции культур *in vitro* отдела биохимии и биотехнологии растений ЦБС НАН Беларуси.

17.3.3. Генетическая трансформация клюквы крупноплодной

Клюква крупноплодная также является трудным объектом для генетической трансформации. Впервые в мире в отделе биохимии и биотехнологии растений ЦБС НАН Беларуси научным сотрудником В. Л. Филипеней с помощью генно-инженерных подходов созданы трансгенные растения клюквы крупноплодной, экспрессирующие смысловой ген белка тауматина II (PR-5-белок) из плодов *Thaumatococcus danielli* L. под контролем промотора 35S РНК CaMV. В экспериментах по агробактериальной трансформации клюквы крупноплодной В. Л. Филипеня использовала стабилизированные асептические культуры сортов Ben Lear, McFarlin, Pilgrim, Stevens, Franclin из коллекции ЦБС НАН Беларуси [23, 24]. Коллекция *in vitro* сортовой клюквы крупноплодной также была создана В. Л. Филипеней. Генетическую трансформацию проводили супервирулентным штаммом *A. tumefaciens* CBE 21, содержащим бинарный вектор pBIThau35 с геном белка тауматина II под контролем промотора 35S РНК CaMV, любезно предоставленным С. В. Долговым.

В результате было получено 11 линий трансгенных растений клюквы крупноплодной сортов Ben Lear (BeanL 4001, BeanL4002, BeanL4003, BeanL4004, BeanL4005, BeanL4006), McFarlin (MF4001), Pilgrim (Pil4001, Pil4002), Stevens (St4001, St4002), которые устойчиво росли на среде с высокой дозой канамицина (200 мг/л Km) без признаков хлороза и некроза [25]. Трансгенные растения



а: 1–2 – линии St4001, St4002; 4 – линия MF4001; 6, 7 – линии Pil4001, Pil4002; 3, 5, 8 – геномная ДНК нетрансформированных растений (отрицательный контроль); 9 – H₂O; 10 – ДНК *A. tumefaciens* CBE 21/pBIThau35 (положительный контроль); L – маркер размеров ДНК (DNA 7500, Agilent)

б: 1–6 – линии BenL4001, BenL4002, BenL4003, BenL4004, BenL4005, BenL4006; 7 – геномная ДНК нетрансформированных растений (отрицательный контроль); 9 – H₂O; 10 – ДНК *A. tumefaciens* CBE 21/pBIThau35 (положительный контроль); L – маркер размеров ДНК (DNA 7500, Agilent)

Рис. 17.10. ПРЦ-анализ трансгенных линий клюквы крупноплодной на присутствие *thauII* гена: *а* – сорта McFarlin, Pilgrim, Stevens; *б* – сорт Ben Lear

клюквы были акклиматизированы к условиям контролируемого закрытого грунта (*ex vitro*) и протестированы В. Л. Филипеней, Т. В. Антиповой и О. В. Чижик методом ПЦР на присутствие целевого гена, кодирующего белок тауматин II, гена *nptII* и гена *virG*, который находится вне области переносимой Т-ДНК (детектирование отсутствия/наличия агробактериальной инфекции). Результаты ПЦР-анализа показали, что в геноме всех 11 линий трансгенных растений и в положительном контроле присутствует фрагменты, соответствующие генам *thauII* (рис. 17.10) и *nptII*. В геноме нетрансформированных растений (отрицательный контроль) данные последовательности не обнаружены. В то же время в трансгенных растениях и отрицательном контроле не присутствовала последовательность гена *virG*, что свидетельствует об отсутствии латентной агробактериальной инфекции.

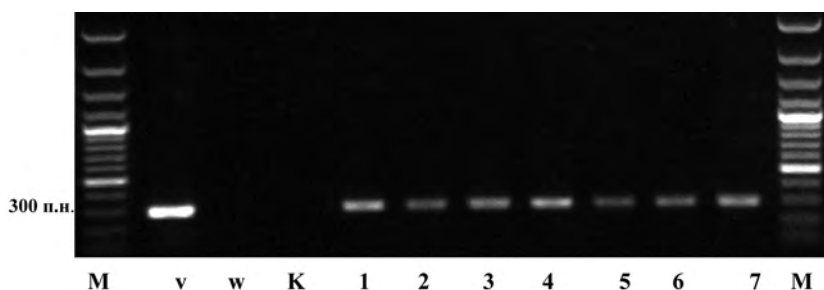
Для двух трансгенных линий сорта **Ben Lear** показана **повышенная по сравнению с контролем устойчивость к фитопатогенам *Pestalotia guerpini* Desm. и *Botrytis cinerea* Pers** (Л. Головченко и др.).

17.3.4. Генетическая трансформация голубики высокой

В 2011 г. сотрудниками отдела О. В. Чижик, В. Л. Филипеней под руководством академика В. Н. Решетникова в рамках темы «Разработать и освоить технологию ускоренного производства высококачественного посадочного материала перспективных сортов голубики высокой с использованием биотехнологических приемов. Разработать методы молекулярной селекции и создать генетически модифицированные формы голубики с повышенной устойчивостью к воздействиям биотических и абиотических факторов среды» (подпрограмма 1 «Инновационные биотехнологии в Республике Беларусь» Межгосударственной целевой программы Евразийского экономического сообщества «Инновационные биотехнологии» на 2011–2015 гг.) начата разработка технологии агробактериальной трансформации голубики высокой. К настоящему моменту оптимизированы условия культивирования *in vitro* на всех этапах микроклонального размножения перспективных сортов голубики с учетом сортовых особенностей и разработана эффективная методика адвентивной регенерации из соматических тканей перспективных сортов голубики высокорослой. Запланировано к началу 2014 г. создать линии трансгенных растений голубики высокой с повышенной устойчивостью к воздействиям биотических и абиотических факторов среды и провести их молекулярно-генетический анализ.

17.3.5. Генетическая трансформация клевера лугового

Подбор эксплантов клевера лугового (*Trifolium pratense* L.) с **максимальным морфогенным потенциалом**, а также условий его реализации являются ключевыми этапами в генетической трансформации данной культуры. Для этой цели научные сотрудники Л. Г. Бердичевец и М. К. Малюш под руководством канд. биол. наук Т. И. Фоменко применили транзientную экспрессию гена *gus* при агробактериальной трансформации клевера лугового сорта Янтар-



М – маркер молекулярного веса GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder («Fermentas», Литва), v – положительный контроль (плазмидный вектор pGV3850-35SlicB), w – контроль чистоты

Рис. 17.12. Отобранные в результате ПЦР-анализа растения-регенеранты клевера лугового сорта Янтарный, содержащие в геноме последовательность целевого гена *licB*

ный штаммом *A. tumefaciens* с бинарным вектором pBI 121, содержащим ген β -глюкуронидазы. В качестве эксплантов использовали семядольные узлы с участками гипокотилей (1–2 мм) 6–7-дневных проростков. Показано, что локализация транзientной экспрессии GUS в эксплантах клевера лугового сорта Янтарный наблюдалась в семядольных листьях, меристемной зоне семядольного узла и на срезе гипокотилия (рис. 17.11, см. цв. вклейку). Наибольшая экспрессия GUS проявлялась на семядольных листьях.

Оптимальные условия агробактериальной трансформации клевера лугового, выявленные с использованием транзientной экспрессии GUS, были использованы Л. Г. Бердичевец, М. К. Малюш и Т. И. Фоменко при трансформации *in vitro* семядольных узлов клевера лугового сорта Янтарный штаммом *A. tumefaciens* C58C1 [pGV3850] с целевым геном *licB*, кодирующим фермент β -1,3-1,4-эндоглюканазу (лихеназу), под контролем промотора 35S CaMV. Данный ген был клонирован из анаэробной грамположительной термофильной бактерии *C. thermocellum* и встроен в плазмиду pGV3850-35SlicB сотрудниками лаборатории генетической инженерии растений Института общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН под руководством проф. Э. С. Пирузян [20, 21]. В результате были получены 23 растения-регенеранта клевера лугового, укоренившихся на среде с селективным агентом без признаков хлороза и некроза. Присутствие в геноме первичных трансформантов последовательности целевого гена *licB*, селективного гена *nptII* и гену *virE* (детектирование отсутствия/наличия агробактериальной инфекции) было проанализировано методом ПЦР (канд. биол. наук И. Н. Бердичевец, науч. сотр. Л. Г. Бердичевец). В итоге было отобрано 7 трансгенных линий клевера лугового сорта Янтарный (рис. 17.12).

В ближайшем будущем сотрудниками отдела биохимии и биотехнологии растений ЦБС будет проведен анализ экспрессии фермента β -1,3-1,4-эндоглюканазы в полученных трансгенных линиях клевера лугового.

17.3.6. Создание опытного поля для испытаний трансгенных растений

Впервые в Республике в соответствии с Постановлением Министерства природных ресурсов и охраны окружающей среды Республики Беларусь № 56 от 29 августа 2006 г. сотрудниками отдела биохимии и биотехнологии растений ЦБС канд. биол. наук О. В. Чижик, В. Л. Филипеной под руководством академика В. Н. Решетникова разработан и согласован с Минским городским комитетом природных ресурсов и охраны окружающей среды паспорт опытного поля, предназначенного для проведения испытаний непатогенных генно-инженерных организмов при их первом высвобождении в окружающую среду.

Паспорт включает: 1) схему опытного поля; 2) информацию о расположенных на расстоянии до 500 м посевах и посадках генно-инженерных растений и сельскохозяйственных культур традиционной селекции; 3) перечень видов диких животных, обитающих на опытном поле, а также на расстоянии 300 м от него; 4) перечень видов дикорастущих растений, произрастающих на прилегающих к опытному полю территориях на расстоянии до 300 м; 5) описание типа почвы, системы севооборота, используемых органических и минеральных удобрений, средств защиты растений от вредителей, болезней и сорняков.

17.3.7. Биохимия и физиология трансгенных растений

В настоящее время существует неоднозначное отношение современного общества к трансгенным хозяйственно ценным растениям, которое обуславливается не только их недостаточной изученностью в плане биобезопасности для здоровья человека, но и ограниченными знаниями о влиянии самого процесса трансгенеза на растение. В частности, далеки от полного понимания вопросы, связанные с физиолого-биохимическими и метаболическими изменениями, которые могут происходить в растениях, трансформированных с использованием обезоруженных штаммов *A. tumefaciens*.

Вопросами структурно-функциональных перестроек, происходящих в хроматине трансгенных растений, в отделе заинтересовались с 1993 г., с момента появления в его асептической коллекции первых трансгенных растений табака и открытия новой темы исследований «Биотехнология-39» (1993–1997 гг.). О. В. Чижик проведено исследование структурной организации дезоксирибонуклеопротеидного комплекса трансгенных растений табака, экспрессирующих бактериальный ген изопентилтрансферазы (ipt-ген). Общие биохимические анализы показали, что в ядрах листьев табака контрольных и трансгенных ipt-растений суммарное содержание белка, ДНК и РНК не имело существенных различий. Используя два различных подхода к дифференциальному выделению ядерных компартментов и методы электрофореза, О. В. Чижик установила различия в белковых спектрах функциональных компартментов ядер контрольных и трансгенных растений табака. При встраивании в ядро табака бактериальной ДНК, несущей ipt-ген, наблюдается увеличение гетерогенности эухроматина I (с 30 до 32 зон) и ядерного матрикса (с 18 до 23 зон), тогда

как в карิโอплазме и гетерохроматине число зон сократилось (на 4 и 3 при солевой экстракции). Эти данные свидетельствуют о влиянии *ipt*-гена на перераспределение белков в структурных частях ядра, поскольку общая гетерогенность белков ядра контрольных и *ipt*-растений не изменилась (130 зон при солевой экстракции) [26].

Особое внимание необходимо уделить тому факту, что растение-хозяин сопротивляется внедрению чужеродных генов свой геном, и этот момент во взаимодействии «растение–агробактерия» изучен слабо. Растения воспринимают *Agrobacterium* и переносимые трансгены как чужеродных интервентов и используют свои защитные системы для борьбы с инфекцией и экспрессией чужих генов. В настоящее время рядом ученых процесс трансгенеза растений с помощью агробактериальной трансформации рассматривается как сложный многоуровневый биотический стресс, имеющий физиолого-биохимические последствия для растений [27]. Данному аспекту агробактериальной трансформации было уделено внимание и в отделе биохимии и биотехнологии растений ЦБС. Так, А. А. Кузовковой (Ленец) на трансгенных растениях табака F_0 было показано, что введение в геном табака бактериального гена 1,2-дигидрооксинафталиндиоксигеназы (*nahC*) изменило экспрессию ряда генов растения, что привело к индуцированию синтеза стрессовых белков (в частности PR-белков), модификации активностей полифенолоксидазы, щелочных и кислых пероксидаз, фенилаланинаммиаклиазы [28], протеаз, ферментов стромы хлоропластов и, в конечном итоге, в целом отразилось на белковых спектрах и структурно-функциональном состоянии фотосинтетического аппарата [29]. Трансгенные *ipt*- и *NahC* растения табака были любезно предоставлены профессором Э. С. Пирузян (Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН). В настоящее время трансгенные растения табака поддерживаются в коллекции культур *in vitro* отдела биохимии и биотехнологии растений ЦБС НАН Беларуси.