

## ПРИМЕНЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО ГЕНА СИНТЕЗА ОСМОТИКА ДЛЯ АДРЕСНОЙ ЗАЩИТЫ ХЛОРОПЛАСТА ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ПРИ АБИОТИЧЕСКОМ СТРЕССЕ

А.А. Гулевич<sup>1</sup>, Л.В. Куренина<sup>1</sup>, Г.Н. Ралдугина<sup>2</sup>, Е.Н. Баранова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, e-mail: a\_gulevich@mail.ru

<sup>2</sup>ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева, Москва, e-mail: galina@ippras.ru

Для защиты культурных растений от осмотического стресса успешно используют трансформацию растений генами, которые усиливают синтез молекул, обладающих осмопротекторными свойствами. К одному из таких соединений, обеспечивающих эффективную защиту клеткам как некоторых прокариот, так и ряда растений, относится глицинбетаин (Park et al., 2007). У ряда почвенных бактерий он синтезируется из предшественника, холина, в один прием ферментом холиноксидазой, тогда как в растительных клетках – в несколько стадий из других предшественников и, минимум, двумя ферментами. Холин присутствует в хлоропластах клеток растений, и это позволяет воспользоваться бактериальным ферментом для проведения синтеза осмотика глицинбетаина в один прием. Для этого необходимо снабдить ген холиноксидазы сигнальной последовательностью, направляющей белковый продукт в пластиду. В генно-инженерных конструкциях наиболее распространена сигнальная последовательность малой субъединицы фермента рибулозобисфосфаткарбоксилазы (*rbcS*), эффективность которой в таргетинге в хлоропласт доказана довольно давно (Coruzzi et al, 1984). Таким образом, внедрением гена *codA* в ядерный геном можно придать растительным клеткам толерантность к осмотическому стрессу и в дальнейшем завизуализировать на ультраструктурном уровне происходящие при абиотических стрессах изменения внутри клеток как трансгенных, так и нетрансгенных растений. Ранее мы показали, что при таргетинге фермента FeSOD1, ответственного за первые этапы нейтрализации активных форм кислорода, происходит изменение пигментного комплекса (Широких и др., 2014), структурной организации пластид у табака и томата (Baranova et al., 2010): модификация структуры тилакоидов стромы, размера пластоглобул и крахмальных зерен, а также извилистых ламеллярных образований у нуклеоидов в хлоропластах трансгенных растений (Баранова и др., 2011).

Целью настоящей работы была оптимизация условий трансформации растений томата и табака геном *codA* для защиты хлоропластов от повреждений.

**Методика.** Семена табака (*Nicotiana tabacum* L.) сорта Самсун и томата (*Solanum lycopersicon* L.) сорта Белый Налив были поверхностно стерилизованы в 70 %-ном этаноле, а затем 5–6 мин в 30 %-ном водном растворе коммерческого препарата «Белизна». Стерилизованные семена 3 раза промывали стерильной дистиллированной водой и помещали в чашки Петри на агаризованную среду Мурасиге-Скуга (MS) для прорастания. Проростки табака и томата культивировали при температуре 22–25 °С, освещенности 3000 лк и фотопериоде 12 ч (день/ночь). Для трансформации использовали фрагменты семядольных листьев, стеблей и настоящих листьев. Ранее мы сконструировали экспрессионный вектор для агробактериальной трансформации растений (Гулевич, Баранова, 2008) на основе стандартной плазмиды pBI121. Вектор pBIcodA содержал в качестве маркера ген устойчивости к канамицину NPTII и полусинтетический ген холиноксидазы *codA* из почвенной бактерии *Arthrobacter globiformis*. Этот ген находится под контролем промотора CaMV35S и снабжен синтетической хлоропластной сигналь-

ной последовательностью из гена *rbcS* томата. Конструкция были перенесена электропорацией в клетки штамма AGL0 *Agrobacterium tumefaciens*.

После предкультивации в течение 4 сут растительные экспланты инфицировали бактерией *A. tumefaciens* штамма AGL0. Агробактериальные клетки выращивали 2 сут на качалке (180 мин<sup>-1</sup>) в жидкой среде Лурия-Бертани (LB) с добавлением канамицина (40 мг/л) при температуре 28°C. Экспланты погружали в бактериальную суспензию и выдерживали в течение 1 ч, затем промывали 3 раза стерильной дистиллированной водой, обсушивали и помещали на чашки Петри с агаризованной средой MS для регенерации с добавлением регуляторов роста в трех комбинациях: 1 – 3,0 мг/л БАП + 0,2 мг/л НУК; 2 – 5,0 мг/л БАП + 0,1 мг/л НУК + 1 мг/л зеатина; 3 – 5,0 мг/л БАП + 0,2 мг/л 2,4-Д. После появления бактериального ореола вокруг эксплантов их снова промывали стерильной дистиллированной водой и помещали на среду MS для регенерации с добавлением аугментина. Через 2 нед растительные экспланты переносили на новую среду для регенерации, куда помимо антибиотиков для подавления агробактерии добавляли также канамицин в концентрации 30–50 мг/л. Для переноса на среду с канамицином отбирали экспланты с зелеными участками каллуса и развивающимися проростками, которые оценивали на наличие целевого гена методом ПЦР.

**Результаты и обсуждение.** Регенеранты табака и томата получали на среде MS с различным сочетанием гормонов. У обеих культур побеги из различных эксплантов появлялись через 30–40 дней после перенесения на среду для регенерации. Лучшие результаты регенерации побегов из эксплантов томата получены на среде с добавлением 1 мг/л зеатина. Частота регенерации достигала гипокотилей и семядольных листьев соответственно 60 и 35 % на среде без зеатина, в то время как наиболее значимыми были показатели на гипокотилях и настоящих листьях на среде с зеатином до 74 %. На среде без зеатина и с меньшей концентрацией БАП (3 мг/л) процент регенерации оказался ниже. Хуже всего регенерация проходила в среде с 2,4-Д вместо НУК. Частота регенерации была довольно небольшой – 6–12 %, количество регенерантов на экспланте – в среднем меньше одного, и образовывался белый каллус, не индуцирующий побеги. Для индукции побегообразования табака также лучшие результаты отмечены на среде с зеатином: частота регенерации побегов из фрагментов листьев и стеблей составляла 82–77 %, тогда как без зеатина – 61–68 %. Как и у томата, на среде с 2,4-Д вместо зеатина частота регенерации снижалась в несколько раз и составляла 22–34 %, среднее количество побегов на эксплант было меньше и наблюдали более выраженное каллусообразование вместо индукции побегов. По результатам экспериментов была выбрана среда для регенерации, содержащая 5,0 мг/л БАП, 0,1 мг/л НУК и 1,0 мг/л зеатина, которую в дальнейшем использовали для элиминации агробактерии. Аугментин (Ieamkhang et al., 2005) как антибиотик показал высокую результативность при всех изученных концентрациях. Лишь при самой низкой его концентрации в среде (100 мг/л) у отдельных эксплантов табака и томата наблюдали возобновление роста агробактерии, частота контаминации не превышала 4%. При повышении концентрации антибиотика развитие агробактерии ингибировалось полностью. Необходимо отметить, что аугментин не оказывали сильного влияния на развитие регенерантов из трансформированных эксплантов табака и томата. Однако, при 300 мг/л частота регенерации из эксплантов слегка снижалась.

В работе (Makela et al., 2002) было показано, что наличие фермента, синтезированного с помощью интродуцированного гена *codA*, обеспечивает защиту даже в тех случаях, когда отсутствует сигнальный пептид, ответственный за доставку в пластиду. Однако по данным исследований (Park et al., 2007) на трансгенных томатах, при обеспечении таргетинга в пластиду, то есть непосредственно к месту синтеза холина, эффективность защиты повышалась. Экспрессия гена *codA* под контролем стрессиндуцируемого промотора улучшала некоторые физиолого-биохимические показатели растительных тканей (Jiang et al., 2013). При этом ген *codA* не был снабжен сигнальной

последовательностью, и функционирование фермента осуществлялось в цитоплазме. Использование полученной нами конструкции рV<sub>I</sub>codA не препятствует регенерации трансформированных растений и позволяет вести эффективный отбор регенерантов, содержащих интродуцированные в геном табака и томата как маркерный ген *nptII*, так и целевой ген *codA*. Эта конструкция может быть эффективна для обеспечения защиты пластидного компартмента клеток, а также для усиления устойчивости клеток различных тканей и целого растения к окислительному и осмотическому стрессу.

*\*Работа проведена в рамках ГП 14 по теме госзадания № 0574-2015-0004.*

#### Литература

Баранова Е.Н., Гулевич А.А., Майсурян А.Н., Лаврова Н.В. Ультраструктурная организация клеток трансгенных растений томата с геном Fe-SOD при засолении питательной среды // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2011. – № 1. – С. 90–97.

Гулевич А.А., Баранова Е.Н. Создание генно-инженерной конструкции с геном холиноксидазы для улучшенной экспрессии в растениях // Российская сельскохозяйственная наука. – 2008. – № 3. – С. 7–9.

Широких И.Г., Бакулина А.В., Огородникова С.Ю., Баранова Е.Н., Лундовских И.А., Гулевич А.А. Влияние встройки Fe-SOD1 гена на рост, перекисный гомеостаз и состояние пигментного комплекса трансгенных растений картофеля // Агрехимия. – 2014. – № 8. – С. 72–78.

Baranova E.N., Serenko E.K., Balachnina T.I., Kosobruhov A.A., Kurenina L.V., Gulevich A.A., Maisuryan A.N. Activity of the photosynthetic apparatus and antioxidant enzymes in leaves of transgenic *Solanum lycopersicum* and *Nicotiana tabacum* plants, with FeSOD1 gene // Russian Agricultural Sciences. – 2010. – V. 36. – P. 242–249.

Coruzzi G., Broglie R., Edwards C., Chua N.-H. Tissue-specific and light-regulated expression of a pea nuclear gene encoding the small subunit of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase // EMBO Journal. – 1984. – V. 3. – P. 1671.

Ieamkhang S., Chatchawankanphanich O. Augmentin® as an alternative antibiotic for growth suppression of *Agrobacterium* for tomato (*Lycopersicon esculentum*) transformation // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2005. – P. 82 – P. 213–220.

Jiang J., Li H., He G., Yin Y., Liu M., Liu B., Qiao G., Lin S., Xie L., Zhuo R. Over-expression of the *codA* gene by Rd29A promoter improves salt tolerance in *Nicotiana tabacum* // Pakistan J. Botany. – 2013. – V. 45. – P. 821–827.

Makela P., Kärkkäinen J., Somersalo S. Effect of glycinebetaine on chloroplast ultrastructure, chlorophyll and protein content, and RuBPCO activities in tomato grown under drought or salinity // Biologia Plantarum. – 2000. – V. 43 – P. 471–475.

Park E.J., Jeknic Z., Pino M.T., Murata N., Chen T.H.H. Glycinebetaine accumulation is more effective in chloroplasts than in the cytosol for protecting transgenic tomato plants against abiotic stress // Plant, Cell and Env. – 2007. – V. 30 – P. 994–1005.