

## ПОЛУЧЕНИЕ БИОБЕЗОПАСНЫХ БЕЗМАРКЕРНЫХ РАСТЕНИЙ *CAMELINA SATIVA* С ПОВЫШЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ФИТОПАТОГЕНАМ

Н.С. Захарченко, О.В. Фурс, О.В. Дьяченко, Я.И. Бурьянов, Т.В. Шевчук

Филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Пущино, [zachar@bibch.ru](mailto:zachar@bibch.ru)

**Аннотация.** Получены безмаркерные растения камелины (*Camelina sativa* (L.)), с геном антимикробного пептида цекропина P1. Для трансформации растений был использован вектор, не содержащий селективных генов устойчивости к антибиотикам и гербицидам. Скрининг безмаркерных трансформантов проводили методами детектирования цекропина P1 в клетках растений, основанными на определении антибактериальной активности растительных экстрактов и иммуноферментном анализе. Полученные растения были устойчивы к фитопатогенам.

**Ключевые слова:** *Camelina sativa*, цекропин P1, генетическая трансформация, биобезопасность

**DOI:** 10.31255/978-5-94797-319-8-350-353

Камелина (*Camelina sativa* (L.) Crantz) – масличное растение семейства капустных (Brassicaceae) известно как рыжик посевной, немецкий кунжут, ложный лен [Васильченко, 1939]. Это однолетнее травянистое растение, семена которого имеют уникальный состав жирных кислот. Ценность камелинового масла заключается в высоком содержании полиненасыщенных жирных кислот (до 90%), причем доля  $\omega$ -3 ненасыщенных жирных кислот составляет 35-40% [Pilgeram et al., 2007; Putnam et al., 1993]. Масло этого растения отличается также высоким содержанием жирорастворимых каротиноидов, превышающим их количество в подсолнечном, соевом и других маслах, богато витамином E, который является мощным антиоксидантом (105 мг на 100 мл масла), что в 2,5 раза больше, чем в масле рапса, и в 7 раз больше, чем в масле льна [Zubr, 1997]. Камелина выращивается, в основном в Северной Америке, в Австралии и в некоторых районах Европы. В России камелина выращивается как культура для поддержания севооборота под подсолнечником и зерновыми культурами. Для производства масла ее культивируют в ограниченном количестве в Орловской, Волгоградской и Саратовской областях. Проводятся исследования, направленные на получение трансгенных растений камелины как продуцента ценных биотехнологических продуктов [Kuvshinov et al., 2009; Nguyen et al., 2011]. Несмотря на свою общую повышенную устойчивость, камелина чувствительна к бактериальным и грибным фитопатогенам, вызывающим увядание (*Fusarium*), ложную мучнистую росу (*Peronospora*) и корневую гниль (*Pythium*). Одним из методов повышения устойчивости растений к фитопатогенам может быть трансформация растений генами антимикробных пептидов, обладающих широким спектром антибиотической и фунгицидной активности. Для отбора трансгенных растений традиционно используют селективные гены устойчивости к антибиотикам и гербицидам или гены репортеры [Angenon et al., 1994]. Полученные с помощью селективных маркеров трансгенные растения представляют потенциальную биологическую опасность, связанную с присутствием в их геноме этих генов и с возможностью их неконтролируемого переноса другим растениям и микроорганизмам. Перспективным направлением создания биобезопасных биотехнических растений является получение безмаркерных растений, не содержащих в своем геноме селективных генов устойчивости к антибиотикам и гербицидам.

Целью настоящей работы было получение биобезопасных безмаркерных растений *Camelina sativa*, с повышенной устойчивостью к фитопатогенам за счет экспрессии гена антимикробного пептида цекропина P1 [Захарченко и др., 2005; Martemyanov et al., 1996].

Для трансформации использовали полученную ранее генетическую конструкцию [Захарченко и др. 2009]. Трансформацию камелины проводили методом агроинфильтрации незрелых цветочных почек [Захарченко и др., 2013]. Для этого сосуды с растениями помещали в герметичную камеру и погружали цветочные почки в суспензию агробактерий LBA 4404(pAL4404), pBM::*cecP1*). В камере создавали вакуум – 0.8 атм на 5 мин. При этом агробактерии легко проникали в растительные ткани. После процесса агроинфильтрации растениям создавали условия покоя, и они сутки находились в горизонтальном положении между слоями влажной фильтровальной бумаги. Затем в теплице растения культивировали в теплице до цветения и получения семян. Семена стерилизовали и проращивали в чашках Петри на среде МС. Для поиска трансформированных растений брали по одному листовому экспланту у каждого из 50 проростков, их объединяли в группы (всего 40 групп) и использовали для приготовления исходных тестируемых образцов растительного экстракта. В этих экспериментах проанализировали 2000 растений. Прямой поиск в этих группах индивидуальных растений, синтезирующих антимикробный пептид цекропин P1, проводили методом вестерн-блот анализа. В экстрактах некоторых групп растений был обнаружен искомый пептид с молекулярной массой 3,3 кДа, соответствующий зрелой форме цекропина P1. В каждой из исследованных групп с положительным сигналом было выявлено от одного до трех цекропин P1-положительных растений. Чувствительность метода позволяет детектировать в образцах экстрактов трансгенных растений цекропин P1 в количестве 1–10 нг. Присутствие гена *cecP1* в трансгенных растениях подтверждено методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймерами к гену *cecP1* 5'-CGGGATCCATGGGCTCTTG-3' и 5'-CGAGATCTCTACTTAGCGCGGC-3'. Размер амплифицированных фрагментов ДНК (102 п.н.) соответствовал полному размеру гена цекропина P1, кодирующего зрелую форму этого пептида.

Антибактериальную активность исследуемого экстракта оценивали также по наличию зоны отсутствия роста бактерий *Erwinia carotovora* на агаризованной среде вокруг лунок, куда был добавлен растительный экстракт с одинаковым количеством белка из листьев трансгенных и нетрансгенных растений. Экстракты полученных растений обладали повышенной антибактериальной активностью по отношению к бактериям *E. carotovora* по сравнению с контрольными экстрактами из нетрансформированных растений. Количественную оценку содержания цекропина P1 в экстрактах трансгенных растений проводили сравнением с калибровочными экспериментами, где в качестве стандарта использовали известные концентрации синтетического цекропина P1 (“Sigma”, США). Содержание цекропина P1 в трансгенных растениях составляло 0,006% от общего растворимого белка листьев растений.

Полученные *cecP1*-растения проявляли повышенную устойчивость к фитопатогенным микроорганизмам: бактериям *Erwinia carotovora* и грибам *Fusarium graminearum*. Заражение проводили, делая укол поверхности черешка иглой, смоченной суспензией бактерий или нанося кусочки мицелия гриба на черешки листьев. Анализ трансгенных растений показал значительное повышение их устойчивости к бактерии *E. carotovora*. Уже через несколько часов после заражения на листьях контрольных растений были заметны следы повреждения – начинающееся от места заражения отмирание ткани. На вторые сутки происходило полное отмирание листа. Аналогичные результаты были получены при заражении листьев трансформированных растений

грибным патогеном *F. graminearum*. Степень повреждения растений оценивали спустя 10-15 сут после заражения. К концу второй недели на листьях контрольных растениях был замечен некроз ткани и отмирание, в то время как листья трансгенных растений оставались без признаков повреждения. Полученные на основе гена антимикробного пептида цекропина P1 безмаркерные растения камелины, могут найти применение в сельском хозяйстве. Семена этих растений могут быть использованы как источник ценного масла, содержащего полиненасыщенные жирные кислоты, в том числе  $\omega$ -3 ненасыщенные жирные кислоты.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ № 18-08-00752, № 16-04-00623 и ГЗ № 0101-2014-0046, № РК 01201352439.

#### Литература

Васильченко И.Т. Род 687. Рыжик – *Camelina Crantz* // Флора СССР. В 30-ти томах / Главный редактор акад. В. Л. Комаров; Редактор тома Н. А. Буш М.Л.: Издательство Академии Наук СССР. – 1939. – Т. VIII. – С. 596–602.

Захарченко Н.С., Рукавцова Е.Б., Гудков А.Т., Бурьянов Я.И. Повышенная устойчивость к фитопатогенным бактериям у трансгенных растений табака с синтетическим геном антимикробного пептида цекропина P1 // Генетика. – 2005. – Т. 41, № 11. – С. 1445–1452.

Захарченко Н.С., Пиголева С.В., Юхманова А.А., Бурьянов Я.И. Использование гена антимикробного пептида цекропина P1 для получения безмаркерных трансгенных растений. // Генетика. – 2009. – Т. 45, № 8. – С. 1061–1066.

Захарченко Н.С., Каляева М.А., Бурьянов Я.И. Экспрессия гена цекропина P1 повышает устойчивость растений *Camelina sativa* L. к микробным фитопатогенам // Генетика. – 2013. – Т. 49, № 5. – С. 609–616.

Angenon G., Dillen W., van Montagu M. Antibiotic-resistance markers for plant transformation // plant molecular biology manual / Eds. Gelvin S.B., Schilperoort R.A. Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 1994. – С1. – P. 1–13.

Kuvshinov V., Kanerva A., Koivu K., Kuvshinova S., Pehu E. Transformation system for *Camelina sativa* // Patent number: 20090151023 (US). – 2009.

Martemyanov K.A., Spirin A.S., Gudkov A.T. Synthesis, cloning and expression of genes for antibacterial peptides: cecropin, magainin, and bombinin // Biotechnology Lett. – 1996. – V. 18. – P. 1357–1362.

Nguyen T., Liu X., Derocher J. Floraldip method for transformation of *Camelina* // Patent number: 2011/0145950 (US). – 2011.

Pilgeram A. L., Sands D. C., Boss D., Dale N., Wichman D., Lamb P., Lu C., Barrows R., Kirkpatrick M., Thompson B., Johnson D. *Camelina sativa*, a montana omega-3 and fuel crop // Reprinted from: Issues in new crops and new uses. J. Janick and A. Whipkey (eds.). – Alexandria: ASHS Press, Alexandria, VA. – 2007.

Putnam D.H., Budin J.T., Field L.A., Breene W.M. *Camelina*: A promising low-input oilseed // New Crops. J.E. Simon, Editor. – Wiley: New York. – 1993.

Zubr J. Oil-seed crop: *Camelina sativa* // Ind Crop Prod. – 1997. – V. 6. – P. 113–119.

## PRODUCING BIOLOGICALLY SAFE MARKER-FREE CAMELINA SATIVA WITH INCREASED RESISTANCE TO PHYTOPATHOGENS

N.S. Zakharchenko, O.V. Furs, O.V. Dyachenko, Ya.I. Buryanov, T.V. Shevchuk

Branch of Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia, [znata\\_2004@rambler.ru](mailto:znata_2004@rambler.ru)

**Abstract.** The marker-free *Camelina sativa* (L.) plants carrying a gene encoding the antimicrobial peptide cecropin P1 were generated. The vector, free of any plant selective genes of resistance to antibiotics or herbicides, was used for transformation. The transformants were screened by detecting cecropin P1 in plant cells according to the antibacterial activity of plant extracts and enzyme immunoassay. The resulting marker-free plants displayed a considerably increased resistance to phytopathogens.

**Keywords:** *Camelina sativa*, cecropin P1, genetic transformation, biosafety