

Симпозиум 7

**БИОЛОГИЯ
ТРАНСГЕННОГО РАСТЕНИЯ**

**ПОДАВЛЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ АГРОБАКТЕРИАЛЬНЫХ ОНКОГЕНОВ
С ПОМОЩЬЮ АНТИСМЫСЛОВЫХ РНК****Inhibition of agrobacterial oncogenes expression
by means of antisense RNA**

В.В. Алексеева, Е.Б. Рукавцова, Ю.С. Голубчикова¹, Я.И. Бурьянов
Филиал Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова, г. Пушкино
E-mail: lera@fibkh.serpukhov.su

¹ Уральский государственный университет, г. Екатеринбург

Почвенные патогенные бактерии *Agrobacterium tumefaciens* индуцируют опухоли у многих растений. Процесс опухолеобразования у растений начинается в месте поранения и обусловлен переносом и встраиванием в геном растений бактериальных генов синтеза фитогормонов. Это приводит к изменению гормонального статуса трансформированных клеток растений, их неконтролируемому росту, дедифференцировке клеток и формированию опухолей, так называемых корончатых галлов. Около тысячи видов двудольных растений подвержены агробактериальному раку, но особенно сильно от этого заболевания страдают виноград, плодовые культуры и некоторые декоративные растения. Болезни, вызываемые фитопатогенными агробактериями, могут приводить к большим экономическим потерям, поскольку снижается продуктивность трансформированных растений, возрастает чувствительность к другим фитопатогенам и стрессовым факторам. Решение этой проблемы с помощью современных методов биотехнологии очень актуально.

Онкогены агробактерий находятся в составе Т-ДНК Ti-плазмиды бактерий. Основными среди них считаются гены *iaaM* и *ipt*, кодирующие ключевые ферменты синтеза индолилуксусной кислоты и цитокининов – триптофанмонооксигеназу и изопентенилтрансферазу, соответственно. Как и большинство генов Т-ДНК, гены *iaaM* и *ipt* различных штаммов агробактерий имеют высокую степень гомологии. Ингибирование экспрессии этих генов в растениях могло бы предотвратить процесс опухолеобразования. В настоящее время для подавления экспрессии генов широко используются стратегии антисмысловых РНК и РНК-интерференции. Механизм действия антисмысловых РНК расшифрован и эта стратегия входит в состав общей стратегии РНК-интерференции, вызывающей посттранскрипционное ингибирование экспрессии генов в

растениях. Путем введения в клетку антисмысловых РНК можно получить высокоэффективное и специфическое подавление экспрессии целевых генов, например генов, ответственных за опухолеобразование (*iaaM* и *ipt*).

Целью данной работы было создание трансгенных растений с антисмысловыми копиями генов *iaaM* и *ipt* и их анализ при трансформации вирулентными штаммами агробактерий. Получение трансгенных растений, ингибирующих экспрессию этих генов, создает предпосылки для получения растений, устойчивых к агробактериальному раку. После переноса клонированных нами соответствующих генетических конструкций в растения табака отобраны одинарные трансформанты табака с антисмысловыми копиями генов *iaaM* и *ipt* под контролем одинарного и двойного промоторов 35S РНК вируса мозаики цветной капусты (CaMV 35S и CaMV 35SS). Двойные трансформанты, содержащие одновременно антисмысловые копии генов *ipt* и *iaaM*, получены при помощи скрещивания трансгенных растений – одинарных трансформантов. При заражении вирулентными штаммами *Agrobacterium tumefaciens* C58 (pTiC58) и A6 (pTiA6) всех вариантов трансгенных растений с антисмысловыми копиями онкогенов показано существенное, но неполное ингибирование экспрессии этих генов. В процессе агробактериальной трансформации трансгенных растений образуются только «ослабленные» опухоли различной морфологии, из которых возможна регенерация целых растений. Анализ антисмыслового ингибирования экспрессии онкогенов в некоторых растениях, полученных из опухолевых тканей при заражении штаммом C58, проводили методом РНК-ДНК гибридизации. Мы обнаружили, что уровень мРНК гена *ipt* снижается меньше, чем уровень мРНК гена *iaaM*. Более высокая степень ингибирования гена *iaaM* может объясняться силой двойного промотора CaMV 35SS, а также более высокой гомологией генов. Представленные результаты об ингибировании экспрессии генов *iaaM* и *ipt* в клетках образованных опухолей, указывают на перспективность получения растений с устойчивостью к агробактериальному раку с помощью применения стратегии РНК-интерференции.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 06-08-00237).

ГЕТЕРОЛОГИЧНАЯ ЭКСПРЕССИЯ
ПРОМОТОРА ГЕНА МЕТАЛЛОТИОНЕИНА АРАХИСА В ТАБАКЕ

Heterologous expression of peanut gene metallothionein promoter
in tobacco-plant

Д.В. Беляев, Г.Н. Ралдугина

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва
E-mail: bdv@ippras.ru

Целью нашей работы является изучение регуляции генной экспрессии на уровне транскрипции, которая, как известно, сильно зависит от активности промоторной области. Ранее нами был клонирован тканеспецифичный промотор гена металлотиионеина арахиса MT-1 (POD), экспрессирующегося в кожуре, но не в зеленых частях арахиса. Этот тканеспецифичный промотор предполагается использовать для экспрессии антигрибных белков или пептидов, подавляющих рост гриба *Aspergillus flavus* на плоде арахиса. Продукт целевого гена экспрессировался бы только в кожуре арахиса и подавлял бы рост гриба, в то время как семена, т.е. пищевой продукт, не содержал бы чужеродных белков. С целью выявления специфичности промотора нами была создана конструкция для экспрессии репортерного гена β -глюкуронидазы под контролем данного промотора. Однако трансформация арахиса трудоемка и занимает около двух лет. Поэтому конструкция сначала использовалась в модельных системах – протопластах, выделенных из листьев табака, которые были транзистентно трансформированы путем инкубации с PEG, а также на трансгенных растениях табака, полученных с помощью агробактериальной трансформации. Результаты оказались неожиданными – по данным измерений активности β -глюкуронидазы, если в мезофильных трансформированных протопластах промотор экспрессировал репортерный ген всегда, то у трансгенных растений активность β -глюкуронидазы наблюдали только в пыльце цветков этих растений, причем как в зрелой, так и в развивающейся. В других тканях растений табака стабильная экспрессия гена β -глюкуронидазы, стоящего под промотором POD, не обнаружена, т.е. экспрессия была тканеспецифичной. Таким образом, нами показана возможность использования промотора POD для создания генно-инженерных конструкций с генами, которые должны экспрессироваться тканеспецифично. В частности, такой промотор, специфичный для пыльцы, может быть использован для быстрой проверки наследования трансгена в первично трансформированных растениях и для анализа числа копий трансгена.

ЦИТОЛОГИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЛОКАЛИЗАЦИИ ЭКСПРЕССИИ ПРОМОТОРА
ПАТАТИНА КЛАССА I В РАСТЕНИЯХ
ТРАНСГЕННОГО КАРТОФЕЛЯ (*SOLANUM TUBEROSUM* L.)

A cytological study of patatin promoter class I expression localization
in transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.)

Ю.П. Болякина, Е.М. Наумкина, Г.А. Романов

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва
E-mail: gar@ippras.ru

Патаатиновый промотор класса I картофеля (ВЗЗ-промотор) является клубнеспецифичным промотором, перспективным для использования в современной биотехнологии и генной инженерии. Поэтому изучение особенностей функционирования этого промотора на органном и тканевом уровнях является актуальной задачей фундаментальной и практической физиологии растений. Нами проведено цитологическое изучение уровня активности ВЗЗ-промотора у зрелых растений картофеля с использованием световой микроскопии. Растения картофеля были предварительно трансформированы генетической конструкцией, включающей патаатиновый промотор класса I длиной примерно 1.5 kb, соединенный с репортерным геном *GUS*. Это давало возможность оценивать уровень активности промотора в разных органах и тканях по интенсивности гистохимического окрашивания на ген *GUS*. В работе использовали две линии независимых трансформантов, обозначаемых как L1 и L2, в возрасте около 2.5 мес., выращенных *in vitro* в условиях фитотрона на среде с 3 или 8 % сахарозы на свету (16 час). Положительным контролем в опытах служили растения трансгенного 35S::*GUS* картофеля, у которых тот же репортерный ген *GUS* был соединен с конститутивным вирусным промотором 35S CaMV. Отрицательным контролем служили растения нетрансгенного картофеля, которые во всех случаях оставались практически неокрашенными. В работе использовали поперечные срезы из средней части клубня, продольные срезы стеблей и корней, листья и их фрагменты. Для лучшего проникновения субстрата X-Gluc листья предварительно надрезали скальпелем. Для гистохимического исследования использовали материал в свежем нефиксированном состоянии.

Результаты окрашивания показали, что в целом интенсивность окрашивания клубней ВЗЗ- и 35S-трансформантов была сходной, хотя отмечались некоторые различия по соотношению степени окрашивания разных тканей. В листьях, стеблях и корнях интенсивность окрашивания у ВЗЗ-растений оказалась существенно

ниже, чем у 35S-растений. Так, черешки листьев были окрашены у 35S-, но не у ВЗЗ-трансформантов. Для стеблей характерно неравномерное распределение окраски по их длине у трансформантов ВЗЗ::*GUS*, в них заметно красились нижние части в зонах ветвления вблизи расположения меристематических зон. В то время как у трансформанта 35S::*GUS* стебли красились равномерно интенсивно по всей длине. В корневой системе растений ВЗЗ::*GUS* заметно окрашивались лишь кончики корней, тогда как у трансформантов 35S::*GUS* корни были окрашены гораздо интенсивнее и равномерно по всей их длине.

Таким образом, с помощью трансгенных растений подтверждена и детализирована на тканевом/клеточном уровне органоспецифичная экспрессия промотора пататинового гена класса I в растениях картофеля.

ТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ И АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ ЭКОЛОГИЧЕСКИ БЕЗОПАСНЫЕ БИОТЕХНОЛОГИИ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

Transgenic plants of new generation and alternative ecologically safe plant resistance strategies

Я.И. Бурьянов, Н.С. Захарченко, Е.Б. Рукавцова, А.А. Юхманова
Филиал Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова РАН, г. Пущино
E-mail: buryanov@fibkh.serpukhov.su

В настоящем сообщении представлены данные исследований по получению биологически безопасных трансгенных растений, отличающихся отсутствием в их геноме нежелательных селективных маркерных генов устойчивости к антибиотикам и гербицидам и отсутствием риска передачи целевых генов другим организмам, а также данные применения альтернативных стратегий для повышения устойчивости растений к фитопатогенам.

Представлены результаты экспериментов по трансформации растений с помощью специализированных агробактериальных векторов, содержащих синтетический ген антимикробного пептида цекропина P1 и ген поверхностного антигена вируса гепатита В без селективных генов устойчивости к антибиотикам и гербицидам. Прямой отбор трансформантов, содержащих ген зрелой формы антимикробного пептида цекропина P1 проведен по устойчивости регенерантов к маркерному тест-патогену, а регенерантов, содержащих ген поверхностного антигена вируса гепатита В – отбором трансформантов с помощью иммуноферментного анализа.

Антимикробная активность, связанная с синтезом цекропина

P1 в клетках трансгенных растений, была показана в различных биотестах как на экстрактах трансгенных растений, так и на целых растениях, растущих *in vitro*, и на их эксплантах. Трансгенные растения картофеля демонстрировали существенное повышение устойчивости к фитопатогенной бактерии *Erwinia carotovora* и фитопатогенным грибам *Phytophthora infestans* и *Sclerotinia sclerotiorum*. Полученные результаты подтверждают перспективы применения этого гена в стратегии создания биологически безопасных трансгенных растений нового поколения с полезными свойствами.

Проведено молекулярно-генетическое исследование трансгенных растений табака и картофеля, экспрессирующих антисмысловую форму гена *hmg1*, кодирующего 3-окси-3-метилглутарил-КоА-редуктазу. Полученные растения *Nicotiana tabacum* характеризуются изменением морфологии и окраски венчиков цветков и мужской стерильностью, а также модификацией метаболизма изопреноидных соединений. Изменение состава этих соединений, в частности – фитостеринов, жизненно необходимых для грибов-фитопатогенов, может привести к устойчивости к ним полученных растений. Таким образом, метод получения растений с антисмысловой формой гена *hmg1* может послужить перспективной основой стратегии создания растений с мужской стерильностью и устойчивостью к фитопатогенам.

Представлены данные о положительных эффектах колонизации растений *in vitro* новыми для исследований видами ассоциативных бактерий и дрожжей. Колонизированные метилотрофными штаммами *Methylobacterium* и метанотрофом *Methylomonas methanica* растения картофеля, табака и пшеницы отличались способностью ускоренного роста *in vitro* и мощным корнеобразованием на питательной среде без добавок фитогормонов и витаминов. Аналогичные свойства имели растения, включая виноград, колонизированных дрожжами *Pseudozyma fusiformata*. Кроме того, эти растения характеризовались повышенной устойчивостью к грибному патогену *Sclerotinia sclerotiorum*. Обнаружена устойчивость растений, колонизированных модифицированными ассоциативными бактериями с генами *nptII* и *bar*, к канамицину и фосфинотрицину.

Применение комбинированных методов клонального микро-размножения растений *in vitro* и микробной колонизации, а также методов колонизации растений *in vivo* новыми видами ассоциативных микроорганизмов создает основу для перспективных биотехнологий растений.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Динамика генофондов растений животных и человека», а также грантов РФФИ № 06-08-81008 и 07-04-00235.

ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ ПО ГЕНУ ЛЕКТИНА БОРОДАТЫХ КОРНЕЙ НА ЛЮЦЕРНЕ, ОБЛЕПИХЕ И РАПСЕ**Induction of transgenic hairy roots carrying lectin gene on *Medicago sativa*, *Hippophae rhamnoides* and *Brassica napus* var. *napus*****З.Р. Вершинина, М.Ю. Дмитрюкова, А.Х. Баймиев**Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, г. Уфа
E-mail: zilyaver@mail.ru

Недостаточная обеспеченность растений соединениями азота является одним из основных препятствий на пути повышения продуктивности сельскохозяйственных культур. Создание небобовых трансгенных растений, вступающих в симбиоз с ризобиями, позволит в какой-то мере решить эту проблему.

Одним из критических факторов на пути формирования бобово-ризобиального симбиоза являются лектины – группа белков растений. Эксперименты с трансгенными растениями, несущими различные гены лектинов бобовых, в том числе и гибридных, позволяют оценивать роль этих белков в бобово-ризобиальном симбиозе и расширять круг микросимбионтов растения.

Так как получение истинных трансгенных растений сопряжено с некоторыми трудностями, симбиотические реакции на обработку ризобиями будут рассматриваться на трансгенных корнях, полученных путем обработки проростков растений бактериями *Agrobacterium rhizogenes*, способными вызывать образование «бородатых корней». Как показано авторами, такие трансгенные корни способны к нормальному клубенькообразованию с ризобиями.

В качестве объектов исследования выбраны люцерна, облепиха и рапс. Выбор люцерны посевной обусловлен высокой клубенькообразующей активностью этого растения.

Облепиха вступает в симбиоз с фиксирующими азот актиномицетами из рода *Frankia*. Азотфиксация у таких актиноризных растений имеет много общего с этим процессом у бобовых. Следовательно, в данном случае задача сводится лишь к замене для актиноризного растения микросимбионта.

Рапс был выбран в качестве объекта исследования, так как в некоторых статьях описывалось образование клубеньков, морфологически и структурно подобных клубенькам бобовых растений при обработке целлюлазой и пектолиазой корневых волосков проростков рапса. Эти клубеньки обладали незначительной нитрогеназной активностью.

В экспериментах использованы полноразмерные гены лектинов гороха посевного и козлятника восточного, клонированные в

Т-ДНК вектора pCAMBIA1305-1 под управлением S35-промотора вируса мозаики цветной капусты, а также гибридные конструкции на основе полноразмерного гена лектина гороха посевного с углеводсвязывающими участками лектинов следующих растений: клевер луговой, донник белый, эспарцет песчаный, астрагал со-лодколистный.

Для трансформации растений использована бинарная векторная система. Плаزمиды pCAMBIA1305-1 была перенесена из *E.coli* методом электропорации в клетки *Agrobacterium rhizogenes*, содержащие Ri-плазмиды дикого типа. Через три-пять недель после введения суспензии *Agrobacterium rhizogenes* в гипокотиль растения на месте ранения появлялся каллус, из которого начинали расти корни. Трансгенная природа корней подтверждена активностью содержащего интрон гена β -D-глюкоуронидазы, а также цепной полимеразной реакцией с использованием праймеров, фланкирующих лектиновый участок.

***IPT*-ТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ ТАБАКА
КАК ОБЪЕКТ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЙ РОЛИ ЦИТОКИНИНОВ
В ПЕРЕДАЧЕ СИГНАЛА ИЗ КОРНЯ**

***IPT*-transgenic tobacco plants as object for the study
of cytokinins role in signal transfer from roots**

Л.Б. Высоцкая, М.А. Дедова, Г.Р. Кудоярова
Институт биологии Уфимского научного центра РАН, г. Уфа
E-mail: vysotskaya@anrb.ru

Для успешного роста и развития растения необходима интеграция процессов, протекающих в побеге и корне. Считается, что между полярными органами постоянно осуществляется обмен сигналами различной природы. В настоящее время активно изучаются механизмы генерирования гидравлических и химических сигналов. Среди химических сигналов особое место принадлежит гормонам растений. Несмотря на большие успехи в изучении механизмов гормонального сигналинга на уровне клетки и генов, на уровне целого растения убедительно продемонстрирована лишь роль корневого сигналинга АБК, которая при недостатке воды в почве переходит из корня в побег и закрывает устьица. Роль цитокининов в передаче сигналов из корня и их роль в регуляции работы устьиц до сих пор дискутируется. Это связано с тем, что не всегда удавалось обнаружить изменение концентрации ЦК-нов в ксилемном экссудате или их содержание резко падало при стрессовых воздействиях, при которых наиболее ярко проявлялся эффект АБК,

маскируя роль ЦК-нов. Тем не менее, есть данные, которые говорят в пользу того, что ЦК могут поддерживать устьица в открытом состоянии, а их накопление в побеге приводит к увеличению скорости транспирации. Кроме того, сейчас уже доказано, что в побеге также может осуществляться синтез цитокининов, и вопрос о механизмах генерирования и передачи цитокининового сигнала из корня (который по-прежнему считается основным источником этого гормона) остается открытым. Удобным инструментом для изучения этой проблемы являются *ipt*-трансгенные растения табака, у которых синтез цитокининов контролируется *heat-shock* – промотором. Прибегая к локальному нагреванию корней трансформированных растений, можно вызвать активацию экспрессии гена изопентенилтрансферазы и, вероятно, первоначальное накопление цитокининов именно в корнях растений.

В нашей работе мы использовали трансформированные (*Nicotiana tabacum* L., cv. Petit Havana, HSIPT) растения табака на стадии шести листьев. Корни растений прямо в горшках с песчаной почвой подвергали локальному нагреванию зоны корней до 38-40 °C для стимуляции синтеза цитокининов. В качестве контроля служили растения, которые находились в тех же условиях произрастания, но не подвергались нагреванию. Ежедневно измеряли площадь листовой поверхности, а в конце эксперимента – массу побегов и корней. Термообработку продолжительностью 30-50 мин. проводили один раз в день. Стабильное, но транзиторное повышение уровня транспирации после нагревания корней наблюдали на третий день воздействия. Для определения содержания гормонов отбирали листья и корни контрольных и опытных растений после применения хит-шока в течение шести дней в период наиболее яркой транспирационной реакции на нагревание корней. Содержание гормонов определяли методом ИФА.

Нагревание корней трансформированных растений табака приводило к накоплению цитокининов в корнях и побегах этих растений. Повышение содержания зеатина в побегах растений сопровождалось повышением уровня транспирации. Это еще раз подтверждает участие цитокининов в регуляции состояния устьиц. В корнях наблюдали трехкратное увеличение содержания зеатина и двукратное – зеатинрибозида по сравнению с контрольными растениями. Очевидно, именно корни и стали источником накопления цитокининов в побегах. Однако следует учесть, что при разных воздействиях в растении также изменяется содержание АБК, которая в большинстве случаев является антагонистом цитокининов, в том числе и в регуляции поведения устьиц. В конечном результате именно соотношение этих гормонов определяет устьичную проводимость. В наших опытах накопление АБК в побегах имело ме-

сто, но было слабо выраженным. Интересно то, что в корнях этот гормон не только не накапливался, но его содержание даже снижалось. Это может быть связано с активным синтезом цитокининов в термобработанных корнях и, следовательно, возрастанием конкуренции за общий предшественник – мевалоновую кислоту.

Интересной также была и ростовая реакция трансгенных растений на довольно продолжительное воздействие корневого хитшока. Растения, претерпевшие в течение шести дней ежедневные процедуры нагревания корней, к концу эксперимента имели более низкое соотношение побег/корень. Следует отметить, что средняя масса корней оставалась на уровне контроля, в то время как площадь листовой поверхности и масса побега снижались. Эта ростовая реакция, вероятно, является результатом адаптации растений к возросшим транспирационным потерям, которые были индуцированы нагреванием корней.

ФОТОМОРФОГЕНЕЗ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА НА СЕЛЕКТИВНОМ СВЕТУ

Photomorphogenesis of the transgenic tobacco plant at the selective light

Е.С. Гвоздева, Р.А. Карначук, Е.В. Дейнеко
Томский государственный университет, г. Томск
E-mail: karnach@mail.tsu.ru

Свет, как важнейший для растений фактор, контролирует множество процессов, осуществляющихся за счет координированной экспрессии генов. Изменение структурной организации генома введением новой информации может менять ключевые события в регуляции экспрессии генов, что приводит к координированным изменениям экспрессии множества других генов, контролирующих рост и развитие растений. Это мало изученная область физиологии, поэтому исследование фотоморфогенеза позволяет понять, как изменяются основные ростовые реакции трансгенных растений в ответ на действие света различных участков спектра.

Был получен генетически модифицированный (*Nicotiana tabacum* L линия П 18 №7-1, исходная линия SR1) методом агробактериального переноса с применением различного типа генетических конструкций, включающих ген интерлейкина-18 человека и гены *nptII* и *GUS* в качестве репортера (Турчинович и др., 2004).

Цель работы – определение роста гипокотыля и семядольных

листьев трансгенных растений табака *Nicotiana tabacum* L. линии SR1 (дикий тип) и линий трансгенного типа П 18 № 7-1 и П 18 № 7-11. Растения выращивали семь суток на среде MS в темноте (контроль) и с досветкой монохроматическим синим (436 нм), зеленым (543 нм) и красным (640 нм) светом ($I = 5400$ лк).

Результаты показали, что в темноте рост генетически модифицированных проростков табака (линии П 18 № 7-1 и П 18 № 7-11) не изменился по сравнению с родительской линией SR1.

Реакция гипокотилей на красный свет оставалась одинаковой у обеих линий, но площадь семядолей трансгенного табака существенно превышала размеры родительской линии. Неоднозначной была реакция и на действие зеленого света, на котором значительно удлинялся гипокотиль и увеличивалась площадь семядолей трансгенных растений более, чем на синем свете. Такую реакцию можно назвать «не стандартной», так как другие виды растений, в том числе и проростки арабидопсиса на зеленом свете не увеличивают площадь листьев больше, чем при действии синего света. Возможно, что встраивание Т-ДНК инсерций в определенные районы генома может приводить к изменениям функционирования сложных генетических сетей, контролирующих признак фотоморфогенеза. Эффект синего света на рост гипокотилей и семядолей обеих линий табака был одинаков.

Таким образом, уже на стадии проростков проявляются отличия ростовых реакций генетически модифицированных растений табака от родительской линии на основной фактор жизни – свет.

МЕТОДОЛОГИЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ТРАНСГЕННЫХ КОМПОНЕНТОВ В ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ С ПОМОЩЬЮ МИКРОЧИПОВ

A methodology for transgenic component identification in food products of plant origin by using microchips

**И.А. Гетман, Е.М. Наумкина, С.И. Чижова, Я.Б. Колотовкина,
В.Д. Цыдендамбаев, В.В. Кузнецов, Г.А. Романов**

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва
E-mail: gar@ippras.ru

Быстрое распространение генетически модифицированных организмов (ГМО) и полученных из них продуктов питания и кормов остро ставит вопрос контроля за их потоками и оценки возможных экологических и биологических рисков. В большинстве европейских стран на законодательном уровне введены строгие ог-

раничения выращивания ГМО, их использования в продуктах питания, а также правила обязательной маркировки пищевых продуктов, если содержание трансгенных добавок в них превышает 0.9 %.

Современная методология выявления трансгенных компонентов осуществляется путем анализа ДНК растений или полученных из них продуктов. Поэтому крайне важен первый этап этой методологии, а именно выделение максимально интактной ДНК в количестве, достаточном для обнаружения трансгенов. И если выделение качественной ДНК из растений сейчас не представляет больших трудностей, то выделение ДНК из продуктов питания, особенно после их смешивания или термической обработки, остается серьезной проблемой.

В нашей работе базовым методом выделения ДНК являлся модифицированный метод с применением катионного детергента цетилтриметиламмоний-бромид (ЦТАБ-метод). С помощью этого метода были выделены препараты ДНК не только из растений, но и из различных продуктов питания. Пригодность выделенных препаратов ДНК для последующей идентификации ГМО проверялась с помощью электрофоретического анализа, а также полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймерами на фрагменты универсальных растительных генов (типа гена *rbcL*) или видоспецифичных генов, таких как гены зеина кукурузы, пататина картофеля или лектина сои.

Для выявления трансгенных компонентов мы использовали новый метод идентификации чужеродных ДНК с помощью олигонуклеотидного микрочипа (ГОСТ Р 52174-2003, введен в действие в 2004 г.). Принцип работы такого микрочипа заключается в том, что меченные флуоресцентным красителем фрагменты ДНК гибридизуются на микрочипе с теми ячейками, в которых иммобилизованы одноцепочечные олигонуклеотиды – фрагменты стандартных элементов трансгенных конструкций, применяемых для трансформации растений. Поэтому флуоресценция наблюдается только в тех ячейках, где произошла гибридизация. Флуоресцентно-меченные фрагменты ДНК получали путем асимметричной мультиплексной ПЦР с праймерами на те же стандартные элементы трансгенных конструкций, причем превалирующий праймер был флуоресцентно-мечен. Метод с использованием биочипа был разработан совместно ИФР и ИМБ РАН (патент № 2270254 БИ № 5 20.02.2006 г.; приоритет от 30.04.2004 г.). В качестве мишеней выбраны консервативные участки ДНК 35S CaMV и *nos* промоторов, *nos* терминатора, маркерных генов *nptII*, *gus*, и *bar*, так как они используются для получения трансгенных растений наиболее часто. В качестве внутреннего контроля прохождения реакции

служил консервативный участок гена большой субъединицы рибулозобисфосфаткарбоксилазы (*RbsL*). Подготовленную с помощью ПЦР флуоресцентную пробу наносили на микрочип, где происходила гибридизация. Для регистрации результатов гибридизации использовали аппаратно-программный комплекс «Чипдетектор» (ИМБ РАН). Специальная программа Imageware рассчитывала интенсивность сигнала в ячейках микрочипа и автоматически определяла наличие или отсутствие генетически модифицированных источников в пробе.

Используя данный подход, нами были получены и проанализированы препараты ДНК из большого набора различных продуктов, в том числе детского питания, мясных и хлебобулочных изделий, картофеля, кукурузы, мороженого и других. Положительным и отрицательным контролями служили заведомо трансгенная и заведомо нетрансгенная ДНК, соответственно. В результате в отдельных продуктах, присутствующих на продуктовом рынке г. Москва, удалось достоверно обнаружить наличие генетически модифицированных источников (трансгенов). Подтверждение наличия трансгенов в испытуемых образцах и количественный анализ их содержания проводили с применением ПЦР реального времени (RT PCR).

Работа поддержана программой фундаментальных исследований Президиума РАН «Биоразнообразие и динамика генофондов».

ОСОБЕННОСТИ СИНТЕЗА ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ КАРТОФЕЛЯ

Some particularities of phenolic compound synthesis in transgenic potato plants

Т.О. Гладышко, Е.В. Рыдлева¹, М.Ю. Чередниченко, Н.О. Юрьева,
Е.А. Живухина¹, Н.В. Загоскина

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва
E-mail: phenolic@ippras.ru

¹ Московский государственный педагогический университет

Одной из характерных особенностей высших растений является способность к синтезу разнообразных вторичных соединений. К числу наиболее распространенных их представителей относятся фенольные соединения (ФС), образующиеся практически во всех растительных клетках. В настоящее время достигнуты значительные успехи в выяснении роли этих веществ в защите клеток от многих стрессовых воздействий. Показано, что ФС препятствуют

проникновению патогенных микроорганизмов, а также ингибируют их рост и развитие и, как следствие, образование токсичных для клеток метаболитов.

Способность к синтезу ФС видо- и сортоспецифична. Так, например, растения чая относятся к видам с высокой способностью к накоплению ФС (Запрометов, 1964). При этом полиплоидные их формы обладали более высокой биосинтетической способностью, чем диплоидные (Загоскина и др., 1994). Различные генотипы картофеля также отличались по содержанию фенольных соединений (Власюк, 1979). Все это свидетельствует о зависимости биосинтеза фенольных соединений от генетических характеристик клеток. И в этом плане важно изучать трансгенные растения, несущие определенные генетические конструкции, что и явилось целью нашей работы.

В работе использовали несколько сортов картофеля. Сорта Дезире и Десница были трансформированы генами *gs*, кодирующими вещества, придающие им неспецифическую устойчивость к патогенам. Сорт Юбилей Жукова трансформирован геном *ZsguA*, отвечающим за устойчивость к колорадскому жуку. Растения выращивали в стерильных условиях на оптимизированной питательной среде Мурасиге-Скуга. После четырех недель культивирования их использовали для анализа ФС, которые извлекали экстракцией 96 %-ным этанолом. В этанольных экстрактах спектрофотометрическим методом определяли содержание суммы растворимых фенольных соединений с реактивом Фолина-Дениса и содержание флавонолов с 1 %-ным водным раствором хлористого алюминия (Запрометов, 1974).

Определение содержания ФС показало, что в случае контрольных растений сорта Десница и Дезире обладали более высокой и почти одинаковой биосинтетической способностью, а у сорта Юбилей Жукова она была в два раза ниже. Это проявлялось как в суммарном количестве растворимых фенольных соединений, так и в количестве флавонолов.

Введение гена *gs* приводило к снижению уровня ФС в растениях картофеля (особенно у сорта Дезире). При этом суммарное их содержание в трансформантах было в три раза ниже, чем в контроле, а содержание флавонолов – почти в 10 раз. Введение гена *ZsguA*, хотя и сопровождалось снижением биосинтетической способности растений, но в значительно меньшей степени (на 40 % как в случае суммы ФС, так и флавонолов).

Следовательно, введение в растения картофеля генов *gs*, кодирующих вещества, придающие им неспецифическую устойчивость к патогенам, приводило к значительному снижению их способности к синтезу фенольных соединений, что не отмечалось при вве-

дении гена *ZsguA*. Это еще раз подчеркивает необходимость «индивидуального» подхода к изучению растений-трансформатов, в том числе и картофеля, с целью последующей разработки стратегии использования получаемых из них ген-модифицированных продуктов.

**ВЛИЯНИЕ ГЕНОВ *rolB*, *rolC* И ГЕНА ДРОЖЖЕВОЙ ИНВЕРТАЗЫ
НА УГЛЕВОДНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ
В ПРОЦЕССЕ КЛУБНЕОБРАЗОВАНИЯ У КАРТОФЕЛЯ**

**Effect of *rolB*, *rolC*, and yeast invertase genes
on carbohydrate metabolism during tuberization of potato**

Е.В. Гришунина, Л.И. Сергеева, Н.П. Аксенова, Т.Н. Константинова,
С.А. Голяновская, Г.А. Романов
Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва
E-mail: gar@ippras.ru

Изучали влияние экспрессии генов *rolB* и *rolC* из агробактерии *A. rhizogenes* и гена дрожжевой инвертазы под контролем клубнеспецифичного промотора пататина класса I (ВЗЗ-промотор) на содержание цитокининов и на отдельные этапы углеводного метаболизма развивающихся клубней картофеля. Контролями служили нетрансформированные растения картофеля и растения с репортерным геном *GUS*, соединенным с конститутивным промотором 35S CaMV. Растения выращивали *in vitro* на агаризованной среде MS, содержащей 2 % сахарозы, при 20 °C и 16-часовой длине дня. Затем одноузловые черенки всех вариантов культивировали в полной темноте при 20 °C на среде MS без гормонов с 8 % -ной концентрацией сахарозы. На пятый-седьмой день в пазухах черенков формировались микроклубни. Гены *rolB* и особенно *rolC* оказали существенное влияние на процесс клубнеобразования, а также на морфологические, анатомические и цитологические характеристики микроклубней трансформированного картофеля, культивируемого *in vitro*.

В полученных клубнях определяли содержание различных форм цитокининов и их производных. Экстракцию и очистку цитокининов проводили по методике Reding et al., 1996. Для разделения и определения содержания цитокининов использовали метод жидкостной хроматографии в комбинации с масс-спектрометрическим определением (Zubko et al., 2002). В *rolC*-клубнях содержание рибозидов (ZR и IPR) было повышено по сравнению с их содержанием в клубнях других генотипов. При этом достоверных

изменений содержания свободных оснований цитокининов (Z, IP) не выявлено. Содержание IP7G, IP9G увеличено в микроклубнях *rolB*- и *rolC*-трансформантов.

Для определения активности инвертазы, сахарозосинтазы и АДФ-глюкозопирофосфорилазы использовали два подхода: гистохимическое определение активности ферментов *in situ* и определение активности ферментов в экстрактах. В микроклубнях растений, трансформированных генами дрожжевой инвертазы и/или *rolC*, обнаружена высокая активность инвертазы, тогда как в клубнях контрольных вариантов и *rolB*-растений инвертаза практически не определялась. Обнаружена высокая активность сахарозосинтазы и АДФ-глюкозопирофосфорилазы во всех изученных вариантах.

Определение содержания сахаров в микроклубнях проводили с помощью жидкостной хроматографии высокого давления в сочетании с импульсной амперометрической детекцией. Содержание глюкозы у всех вариантов было значительно ниже содержания фруктозы и сахарозы, причем различия по количеству глюкозы и/или фруктозы в большинстве случаев были недостоверными. Основные различия между вариантами отмечены по содержанию сахарозы: в клубнях растений с генами *rolC* и *rolB* содержание сахарозы больше, чем в клубнях обоих контролей. Напротив, в микроклубнях растений с геном дрожжевой инвертазы обнаружено сахарозы меньше, чем в клубнях контрольных растений.

Для анализа содержания крахмала использовали метод жидкостной хроматографии высокого давления, измеряя количество глюкозы, образующейся в результате гидролиза крахмала. У *rolB*-растений наблюдалось повышение содержания крахмала, а у *rolC*-растений – снижение, хотя отличия от контролей были на грани достоверности. При сравнении трансгенных линий оказалось, что содержание крахмала в клубнях *rolB*-трансформантов выше по сравнению с микроклубнями *rolC*- и инвертазных трансформантов.

В целом полученные данные показывают, что клубнеспецифическая экспрессия трансгенов *rolC* и *rolB* и дрожжевой инвертазы существенно влияет на углеводный метаболизм клубней картофеля и на их цитокининовый статус (в случае *rol*-трансгенов). В клубнях *rolC*-растений наблюдалось парадоксальное сочетание активности сахарозосинтазы и (вероятно, вакуолярной) инвертазы, тогда как в норме активность инвертазы в клубне замещается на активность сахарозосинтазы. Такие изменения в сочетании с повышенным содержанием ряда цитокининов могут быть одной из причин атипичной морфологии *rolC*-клубней.

Работа поддержана грантом РФФИ.

**ПРИДАНИЕ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНОЙ ЗАЩИТЫ
ОТ ФАКТОРОВ СОЛЕВОГО СТРЕССА
РАЗЛИЧНЫМ КЛЕТОЧНЫМ КОМПАРТМЕНТАМ ПРИ ПРОРАСТАНИИ**

**Conferring of protection from salt stress factors
to various cell compartments at germination by genetic engineering**

А.А. Гулевич^{1, 2}, Е.Н. Баранова²

¹ Всероссийский институт кормов им. В.Р. Вильямса, г. Лобня

² Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной биотехнологии, г. Москва

При прорастании семена часто сталкиваются с действием различного рода неблагоприятных факторов как биотической, так и абиотической природы. Засоление почв оказывает множество негативных воздействий на растения с момента прорастания семени до времени завязывания новых семян. На уровне отдельной клетки адаптация к засолению связана с формированием ответа на осмотический, токсический и оксидативный стрессы. Ткани семени сформированы из специализированных клеток, обладающих отличиями в своей структуре; наиболее заметна разница в строении запасующих компартментов и их форме. Утилизация запасных веществ является лимитирующим фактором развития проростка. В этих процессах задействованы практически все внутриклеточные компартменты.

Воздействие солей вызывает специфические нарушения в различных органеллах и компартментах клеток, связанные с нарушением нормального протекания процессов метаболизма, характерных для различных типов клеток на ранних этапах прорастания и развития проростка. Влияние различных солей не одинаково, однако очевидно, что стратегия защиты может быть построена на комплексной программе защиты отдельных компартментов, что в итоге приведет к усилению адаптационных возможностей клетки в целом.

Генная инженерия растений позволяет создавать трансгенные растения, в которые внедрены чужеродные гены из самых разнообразных источников или у которых изменен уровень экспрессии существующих генов для усиления противодействия различным абиотическим стрессам, в том числе и засолению. Вполне возможно целенаправленно создать комплексную защиту различных компартментов клеток с учетом локализации данных клеток в специфических органах и тканях, а также со стадией развития растения. Это достигается созданием генно-инженерных конструкций, где промоторная последовательность будет отвечать за экспрессию

целевого гена в «нужное время и в нужном месте», а белок-кодирующая последовательность будет снабжена специфической сигнальной последовательностью, направляющей синтезируемый белок в заранее заданный компартмент внутри клетки.

Исходя из отмеченных нами изменений ультраструктуры, оптимальная стратегия защиты пластид от негативных факторов засоления должна учитывать необходимость формирования устойчивости как к токсическому, так и к осмотическому фактору засоления, т.е. эффективным может быть трансформация растений генами, кодирующими белки, способствующие стабилизации мембран (например, десатураза жирных кислот из синезеленой водоросли *Synechococcus*), а также белки, нейтрализующие активные формы кислорода, появляющиеся при оксидативном стрессе (например, супероксиддисмутаза из *Arabidopsis thaliana*), или ферменты синтеза осмолитов (например, холиноксидаза из бактерии *Arthrobacter globiformis*). Всем данным генам должна предшествовать сигнальная последовательность, направляющая кодируемый белок в пластиду (например, лидерная последовательность гена рибулозобисфосфаткарбоксилазы (Rubisco) гороха).

Для целенаправленной защиты митохондрий можно использовать такую же конструкцию с геном супероксиддисмутазы, которая будет отличаться лишь тем, что вместо лидерной последовательности гена, связанного с фотосинтезом, будет стоять лидерная последовательность белка, функционирующего внутри митохондрий (например, той же супероксиддисмутазы из *Arabidopsis thaliana*).

Вакуолярный компартмент сам по себе играет важную роль в сохранении стабильного гомеостаза клетки. Это достигается путем направления вредных для функционирования внутриклеточных систем сложных соединений и различных ионов, особенно избыточно поступающих в цитоплазму из внешней среды, внутрь вакуоли через посредство особых тонопластных транспортеров. Хорошие результаты продемонстрированы при использовании конструкций с генами Na^+/H^+ -антипортеров, которые специфически удаляют избыток ионов Na^+ из цитоплазмы внутрь вакуоли.

Вероятность опосредованного положительного эффекта на все компартменты клетки при ее трансформации генами белков, позволяющих уменьшить негативное влияние трех стрессов, вызываемых засолением, достаточно высока. Мы предполагаем, что трансформация растений генами синтеза осмолитов (глицинбетаина, пролина и т.п.), генами ионных транспортеров (натриевые или калиевые антипортеры) и генами, способствующими стабилизации мембран при оксидативном стрессе (супероксиддисмутаза и др.), позволят преодолеть негативное воздействие на всю совокупность внутриклеточных компартментов.

**ТРАНСФОРМАНТЫ КАРТОФЕЛЯ,
ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ ГЕН ДРОЖЖЕВОЙ ИНВЕРТАЗЫ,
КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ФОРМИРОВАНИЯ ХОЛОДОСТОЙКОСТИ**

**Potato plants expressing yeast-derived invertase
as model to study cold tolerance**

**А.Н. Дерябин, И.М. Дубинина, Е.А. Бураханова, М.С. Синькевич,
Е.П. Сабельникова, Е.Б. Сальникова, Т.И. Трунова**
Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва
E-mail: trunova@ippras.ru

Роль углеводного метаболизма в формировании устойчивости к гипотермии холодостойких растений, в отличие от морозостойких, до сих пор остается мало изученной. Это относится прежде всего к одному из ключевых ферментов углеводного обмена – инвертазе, представленной формами, локализованными в различных клеточных компартментах (апопласте, цитозоли, вакуоли). Изменение активности инвертазы в условиях гипотермии приводит к модификации качественного и количественного состава сахаров. Трудность изучения этого вопроса у холодостойких растений, в отличие от морозостойких, состоит в том, что в условиях закаливающих (низких положительных) температур содержание сахаров у них повышается в значительно меньшей мере, а воздействие отрицательной температуры приводит к проявлению многих неспецифических защитных реакций, что мешает однозначной интерпретации полученных результатов. Поэтому растения картофеля (*Solanum tuberosum* L., cv. Desiree), экспрессирующие ген дрожжевой инвертазы, находящийся под контролем пататинового промотора *B33* класса I и содержащий последовательность лидерного пептида протеиназы II для апопластной локализации фермента, явились удобной моделью в исследовании участия разных форм инвертазы и образующихся сахаров в формировании холодоустойчивости. Растения картофеля были отобраны из коллекции клонов, полученных в результате совместной работы сотрудников Института молекулярной физиологии растений им. Макса Планка (Golm, Germany) и Лаборатории роста и развития им. М.Х. Чайлахяна ИФР РАН. Растения размножали микроочеренкованием *in vitro* и выращивали при 22 °С и 16-часовом освещении лампами ЛБ-80 в течение пяти недель в пробирочной культуре на агаризованной МС-среде, содержащей 2 % сахарозы.

Исследования показали, что повышенная активность апопластной инвертазы в листьях трансформантов способствует гидроли-

зу поступающей в апопласт сахарозы, тем самым ограничивая экспорт сахарозы во флоэму. При этом происходит проникновение образующихся моноз в клетки мезофилла, их фосфорилирование с дальнейшим образованием сахарозы, что сопровождается значительным повышением содержания сахарозы в листьях.

Важная роль инвертаз и особенно ее кислой нерастворимой формы в повышении содержания сахарозы в листьях и формировании устойчивости к гипотермии была подтверждена также в опытах на МС-средах с различными концентрациями сахарозы (2, 4 и 6 %). Обнаруженная способность исследуемых генотипов картофеля адаптироваться к низкой положительной температуре (5 °С) к третьим суткам сопровождается максимальной активностью кислых инвертаз и наибольшим содержанием сахарозы в листьях, что коррелирует с устойчивостью растений к гипотермии. Таким образом, использование растений картофеля с введенным геном дрожжевой инвертазы позволило установить прямую связь между активностью инвертаз, особенно нерастворимой ее кислой формы, и устойчивостью к гипотермии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 04-04-48476).

ИЗОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ КАК ИНСТРУМЕНТ ИЗУЧЕНИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СТАТУСА ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ

The isozyme analysis as instrument of the metabolic status research of transgenic plants

И.А. Егорова, Л.А. Лутова, И.Д. Курдюков

Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург
E-mail: egorovai69@mail.ru

До сих пор изоферментные маркеры широко использовали для решения задач популяционной генетики, а также в целях генетического картирования у различных организмов. В данной работе изоферменты выступают уже не в роли генетических маркеров, но являются важными показателями в генетическом мониторинге. Целью данной работы являлось изучение спектра ряда изоферментов (генетически детерминированных множественных молекулярных форм ферментов), отвечающих за некоторые ключевые моменты метаболизма, на основе коллекции трансгенных растений видов с разной биологией размножения.

Объектами исследования были выбраны растения трех видов из двух семейств – Solanaceae (табак и картофель) и Brassicaceae (редис). Эти два семейства отличаются друг от друга не только

ботанико-структурными характеристиками, но и наличием разных систем самонесовместимости, что свидетельствует о разных эволюционных стратегиях этих растений в плане размножения и поддержания генетического разнообразия в природных популяциях. Растения табака, редиса и картофеля были взяты из уже существующего фонда генетической коллекции, поддерживаемой в нашей лаборатории для подтверждения молекулярно-генетическими методами их трансгенного статуса. Указанные растения получены с использованием различных плазмид, содержащих гены *ipt* и/или *nptII* из *Agrobacterium tumefaciens*: GV3850 Tr4 (*ipt* и *nptII*) для картофеля, pGV3850 Km^R (*nptII*) и pART27::INTER (*nptII*) для табака, pCB1346 (*ipt* и *nptII*) для редиса. Таким образом, анализируемые в эксперименте растения содержали наиболее часто (традиционно) используемые в генной инженерии растений бактериальные гены. Это должно было способствовать созданию более оптимальных условий адекватного сравнения трансгенных растений разных видов.

В задачи исследования входил также вопрос, меняется ли каким-то образом спектр изоферментов трансгенного растения в ряду последовательных половых поколений после процедуры трансформации. Для этого в эксперимент были вовлечены растения табака T₁-поколения и редиса T₃-поколения.

Все растения, несущие в составе генома чужеродную вставку, и контрольные (интактные) растения были вовлечены в заключительный этап работы – сравнение трансгенных и контрольных растений по спектрам двадцати изоферментных маркеров: аспаратаминотрансфераза (ААТ), малатдегидрогеназа (НАДФ- или НАД-зависимая) (MDH-NADP, MDH-NAD), шикиматдегидрогеназа (ShDH), алкогольдегидрогеназа (ADH), эстераза (EST), супероксиддисмутаза (SOD), β-глюкозидаза (β-GLU), кислая фосфатаза (AcPh), диафораза (DIA), изоцитратдегидрогеназа (IcDH), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (G-6-PhDH), фосфоглюкомутаза (PGM), пероксидаза (PRX), эндопептидаза (EP), лейцинаминопептидаза (LAP), фосфоглюкоизомераза (PGI), аконитаза (ACO), ароматическая алкогольдегидрогеназа (НАДФ- или НАД-зависимая) (AroADH-NADP, AroADH-NAD). Во всех рассматриваемых случаях проанализированные спектры ферментных систем у растений одного и того же вида совпадали.

Таким образом, отсутствие различий между трансгенными и контрольными растениями по зимограммам указанных выше ферментов свидетельствует об отсутствии изменений в метаболическом статусе растений, получивших чужеродную вставку. Более того, растения, являющиеся представителями видов двух семейств с разной биологией размножения (Solanaceae и Brassicaceae), совершенно одинаково – без изменений в исходном спектре изозимов

– перенесли процедуру трансформации. Из этого с большой степенью вероятности можно заключить, что механизмы горизонтального переноса генов одинаково строго не затронули ключевые моменты в метаболизме у этих растений.

Отсутствие различий в изоферментных спектрах между исходными (контрольными) и самоопыленными трансформированными растениями табака и редиса свидетельствует не только об отсутствии изменений в метаболическом статусе трансгенных растений в нескольких поколениях. Это говорит и об отсутствии влияния дозы трансгена на изоферментные спектры трансформанта, поскольку исходно все трансформированные растения являются гетерозиготами по наличию Т-ДНК вставки, а выход в гомозиготное состояние (удвоение дозы трансгена) участков генома, несущих эту вставку, происходит при самоопылении.

Полученные результаты свидетельствуют об экологической безопасности изученных модельных трансгенных растений и возможности некоторой экстраполяции данных при использовании в сельском хозяйстве трансгенных растений с заданными свойствами.

МНОГОУРОВНЕВАЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПОСЛЕДСТВИЙ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ РАСТЕНИЙ

Multilevel experimental model for gene transformation effects studying

А.Г. Еникеев, Т.В. Копытина, Е.В. Кузнецова, Л.А. Семенова, Л.В. Гаманец
Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
г. Иркутск
E-mail: enikeev@sifibr.irk.ru

Технология создания трансгенных растений включает процедуру рутинного отбора регенерантов с требуемыми характеристиками и обязательное подтверждение их свойств в нескольких семенных поколениях. Это очень трудоемкая и длительная процедура, не гарантирующая стабильности свойств полученного трансгенного растения. Дальнейшее развитие генно-инженерных технологий остро нуждается в поиске новых подходов для обеспечения стабильной экспрессии перенесенных генов и исключения возможных побочных эффектов. Отсутствие надежных критериев оценки стабильности свойств трансгенных растений исключает возможность использования генно-инженерных продуктов в первую

очередь именно в тех областях, где их возможное применение оправдано и целесообразно, например, при создании новых лекарственных препаратов. Для решения поставленной задачи нами предложена многоуровневая экспериментальная модель для изучения последствий генетической трансформации растений. Основой предлагаемой модели является анализ последствий трансгенеза на объектах разного уровня организации. Это полученная из одного исходного растения культура ткани, растение *in vitro*, растение в почве. Сопоставление результатов, полученных на отдельных звеньях модели, позволяет наиболее полно выявить последствия трансгенеза. Второй составной частью предлагаемой модели является комплексный анализ последствий трансформации на различных уровнях: фенотипическом, физиолого-биохимическом, цитогенетическом и молекулярном. В настоящее время ведется поиск наиболее чувствительных к трансгенезу звеньев в сети генных и метаболических взаимоотношений. Полученные результаты свидетельствуют о высокой эффективности предложенного подхода.

**МЕЗОСТРУКТУРА ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА
ARABIDOPSIS THALIANA ЛИНИЙ Col, Col-4 И K-310**

**Photosynthetic apparatus mesostructure
in *Arabidopsis thaliana* of Col, Col-4 and K-310 lines**

Л.А. Иванов, Д.А. Ронжина, Л.А. Иванова
Ботанический сад УрО РАН, г. Екатеринбург
E-mail: Leonid.Ivanov@botgard.uran.ru

Arabidopsis thaliana является модельным объектом в генетике, физиологии и биохимии растений. Короткий жизненный цикл, небольшой габитус, малый размер ДНК и простота выращивания делают *A. thaliana* удобной моделью для изучения различных аспектов роста и развития высших растений. В настоящее время в исследованиях используются не только исходные линии диких растений *A. thaliana*, но и многочисленные модифицированные и мутантные формы. Зачастую остается неизвестным, как генная трансформация влияет на общую физиологию растения.

Цель работы – выяснить, влияет ли генетически обусловленное изменение внешних параметров листьев на их внутреннюю структуру и фотосинтетическую способность. Для этого одновременно и в одинаковых условиях были выращены растения *A. tha-*

liana мутантной линии К-310 и диких линий Col и Col-4 (семена для выращивания любезно предоставлены В.С. Ковалем, ИЦиГ СО РАН). Линия К-310 маркирована мутациями по генам *ap1*(99), *er*(48), *gl1*(46) и *ser*(52), затрагивающим изменения чашелистиков, лепестков и внешних параметров листьев и стебля (формы, отсутствие воска и трихом). У растений, находящихся в генеративном состоянии, были изучены параметры фотосинтетических тканей листа.

Исследования показали, что растения мутантной линии не отличались от диких линий по толщине и площади листа, но имели существенные отличия в структуре мезофилла. Растения линии К-310 имели больший объем клеток мезофилла – 80 тыс. мкм³, что превышало размеры клеток диких линий на 15-25 %. Концентрация клеток в единице площади листа у всех трех линий была одинаковой и составляла 90-100 тыс./см² листа. В клетках линии К-310 также отмечено наибольшее количество хлоропластов – 43 против 29 и 35 у линий Col и Col-4 соответственно. У растений линии К-310 обнаружена более высокая концентрация хлоропластов в единице площади листа – 4 млн./см², в то время как у диких линий в 1 см² листа было не более 3 млн. хлоропластов. Объем мезофилла в листе у мутантной линии был также выше на 10 %. У растений линии К-310 внутрилиственная ассимиляционная поверхность (поверхность клеток и хлоропластов) в шесть-девять раз превосходила внешнюю поверхность листа, и это отношение было больше на 15-35 %, чем у диких линий. Более высокие значения внутрилиственной поверхности определили большую проводимость клеток мезофилла для CO₂, которая составила 0.51 см/с для линии К-310, а для линий Col-4 и Col – 0.44 см/с.

Таким образом, полученные результаты позволяют говорить о том, что мутантная линия К-310 существенно отличалась от диких линий не только по внешним морфологическим признакам, но и внутренней структуре листа и потенциальной проводимости мезофилла для CO₂. Это является хорошей основой для дальнейшего изучения влияния различных генных трансформаций растений на мезоструктуру фотосинтетического аппарата листа.

**НОВАЯ СИСТЕМА ЭКСПРЕССИИ *CRY* ГЕНОВ С ЦЕЛЬЮ СОЗДАНИЯ
БИОБЕЗОПАСНЫХ РАСТЕНИЙ, УСТОЙЧИВЫХ К НАСЕКОМЫМ****New system for *Cry* gene expression
to create biosafety insect-resistant plants**

Е. Исаенко¹, Н. Мирахоли, И.А. Абдеева, Н.А. Картель¹, Н.О. Юрьева²,
И.В. Голденкова-Павлова

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, г. Москва

E-mail: irengold@vigg.ru

¹ Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, г. Минск

² Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва

Проблемы биобезопасности трансгенных растений, в том числе экспрессирующих *cry* гены, являются актуальными. Показано, что *Cry* белки не являются токсичными для млекопитающих, птиц, амфибий, рептилий и специфично влияют на определенные группы насекомых и беспозвоночных вредителей. В то же время наиболее острым остается вопрос неконтролируемого переноса генетической информации от трансгенов в окружающую среду, в дикорастущие растения, в том числе сорные. Несмотря на многочисленные исследования, этот вопрос пока не до конца разработан. В связи с этим разработка новых подходов, позволяющих производить такие исследования быстро, точно и с минимальными затратами, является актуальной. В настоящее время для идентификации трансгенов используется целый арсенал методов. Однако в большинстве случаев эти методы требуют больших затрат времени, реагентов, а также специального оборудования, и исследователи часто используют стратегию репортерных систем. Следует подчеркнуть, что *cry3a*-ген кодирует белок, не обладающий ферментативной активностью, за счет которой можно определить как уровень его экспрессии (количественно), так и молекулярную массу белкового продукта. Ранее мы показали, что для изучения экспрессии целевых генов в клетках про- и эукариот в качестве трансляционного репортера может быть использована термостабильная лихеназа. Ранее нами показано, что гибридный ген *cry3aM-licBM2*, в котором последовательность целевого гена трансляционно слита с последовательностью репортерного гена термостабильной лихеназы, эффективно экспрессируется в клетках дрожжей и *Cry3aM* белок в составе гибридного *Cry3a-LicBM2* белка сохраняет свою биологическую активность – инсектицидное действие на личинки колорадского жука. Эти результаты позволили предположить, что гибридный ген будет эффективно экспрессироваться и в растениях картофеля с сохранением биологической активности белковых

продуктов. С целью проверки этого предположения был сконструирован экспрессионный вектор для трансформации растений. В этом векторе гибридный *cry3aM-licBM2* ген находится под контролем светоиндуцибельного промотора гена малой субъединицы РБФК/О (*rbcS*) *Arabidopsis thaliana*. Были сконструированы экспериментальные модели первичных трансформантов картофеля, экспрессирующие гибридный ген *cry3aM-licBM2*. Молекулярно-биологическими методами показано, что в растениях картофеля эффективно синтезируются рекомбинантные белки с молекулярной массой, соответствующей теоретически рассчитанной. Анализ первичных трансформантов картофеля линии *Cry3aM-LicBM2* на устойчивость по отношению к личинкам первого возраста колорадского жука показал, что первичные трансформанты растений проявляют от 35 до 81 % эффективности (токсичности), тогда как контрольные растения, обработанные раствором кристаллического белка, – 100 % токсичности. При этом выявлена положительная корреляция между процентом смертности личинок и уровнем накопления гибридных белков в первичных трансформантах. Таким образом, показано, что гибридный белок *Cry3aM-LicBM2*, который нарабатывается в первичных трансформантах картофеля, обеспечивает достаточно высокий уровень защиты растений против личинок колорадского жука.

На основании полученных результатов предложена новая система экспрессии *cry* генов в растениях. Она основана на экспрессии гибридных генов, в состав которых входит последовательность репортерного гена лихеназы, и использовании в качестве регуляторного элемента светоиндуцибельного промотора, который обеспечивает преимущественную экспрессию контролируемых генов только в зеленых тканях растения (листьях) – органах-мишенях для насекомых-вредителей. Основываясь на свойствах репортерного белка лихеназы, входящего в состав гибридных белков, представляется возможным использовать эту репортерную систему для мониторинга трансгенов в агроценозах, поскольку эта система является достаточно простой и точной и не требует больших материальных и временных затрат.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ (06-04-81009-Бел_a, 05-04-49186-a).

**ТРАНСГЕННАЯ ПШЕНИЦА
С ВЫСОКОЙ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ
И УРОЖАЕМ ЗЕРНА**

Transgenic wheat with highed photosynthesis and grain yield

О.И. Кершанская

Институт биологии и биотехнологии растений,
Национальный центр биотехнологии, г. Алматы
E-mail: gen_o.kersh@mail.ru

Генетические модификации фотосинтеза, основанные на методах генетической инженерии посредством введения генов, кодирующих ферменты C_4 метаболизма из кукурузы в пшеницу, являются первым шагом к трансформации пшеницы на повышение ее урожайности до 30 % и созданию новых форм, устойчивых к абиотическим и биотическим стрессовым факторам. Исследования в данном направлении являются началом развития метаболической инженерии и метаболомика, а также открывают широкие перспективы для использования трансгенных растений в качестве модельных систем.

Цель: исследовать преимущества биотехнологий и установить подходы к генетической модификации фотосинтеза у пшеницы для повышения ее урожайности до 30% путем введения генов кукурузы, кодирующих ферменты C_4 метаболизма фотосинтеза. Методы трансформации пшеницы посредством бомбардмента и *Agrobacterium* были оптимизированы для пяти яровых Американских и 15 яровых и озимых Казахских сортов. Разработаны схемы введения гена, кодирующего ключевой фермент C_4 метаболизма – фосфоэнолпируват карбоксилазу (ФЭПК), из кукурузы в пшеницу с использованием современных методов генетической инженерии. Обсуждаются преимущества и недостатки данных методов. Разрабатывается простой и эффективный, естественный для пшеницы метод так называемой germ-line трансформации путем пипетирования гена интереса на рыльце пестика цветков пшеницы перед оплодотворением. В методе использован уникальный для пшеницы механизм дистанционного трансфера пыльцы, содержащей большое количество флавоноидных глюкозидов, которые действуют как индусеры *vir* зоны T1 плазмид. Использование данного метода позволило получить около 5000 предположительно трансгенных семян и ряд трансгенных растений пшеницы с геном ФЭПК. Высокий уровень экспрессии C_4 -специфического гена кукурузы в трансгенной пшенице подтвержден пробами активности ФЭПК в экстрактах из листьев с последующим гель-электрофорезом, western, Southern blot и ПЦР-анализом.

Трансгенные растения пшеницы с интродуцированным геном ФЭПК демонстрировали повышение экспрессии ФЭПК активности, увеличение интенсивности фотосинтетического газообмена листьями, снижение доли фотодыхания при фотосинтетическом поглощении CO_2 . Активизация фотосинтетической функции у трансгенных растений пшеницы связана с повышением устьичной проводимости и увеличением концентрации межклеточной CO_2 , обусловленной открытием устьиц. Результатом повышения концентрации внутриклеточной CO_2 является увеличение фиксации CO_2 из атмосферы и подавление оксигеназной активности РБФК и фотодыхания. Возможно, повышенная экспрессия ФЭПК в guard клетках позволяет фиксацию большей концентрации атмосферной CO_2 в малат в вакуоле, калий движется к guard клеткам, стимулируя осмотический приток воды и повышение тургора для открытия устьиц. Таким образом, впервые доказана уникальная возможность активизации фотосинтетической функции у трансгенных растений пшеницы вследствие введения в пшеницу гена ФЭПК из C_4 кукурузы.

Перспективами введения генов ФЭПК, ПФДК, НАД-МЕ в пшеницу представляются: изменение анатомической структуры листа – появление признаков Кранц анатомии; активизация углеродного и азотного метаболизма; оптимизация репродуктивных тканей; повышение толерантности к биотическому и абиотическому стрессам (фотоокислению, низкой температуре, УФ, минеральному дефициту, старению); изменение квантового выхода фотосистемы II, фотохимической и нефотохимической диссипации энергии хлорофилла; повышение урожая зерна на 25-30 %.

ФЕРМЕНТЫ МЕТАБОЛИЗМА ТРИПТОФАНА В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ ТАБАКА

Tryptophan methabolism enzymes in transgenic tobacco plants

Т.В. Копытина, Е.В. Кузнецова, А.Г. Еникеев

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск
E-mail: kopytina@sifibr.irk.ru

Показано многими авторами, что перенос чужеродных генов в растительный геном влияет на экспрессию растительных генов, что приводит к модификации белоксинтезирующей системы, активности фотосинтетической системы, гормонального статуса и активности ключевых ферментов метаболизма растений.

Очень мало известно о влиянии Т-ДНК инсерции без целевых генов на физиолого-биохимические свойства трансгенных растений. Этот вопрос является важным для понимания основных механизмов трансгенеза, поскольку по имеющимся данным встраива-

ние Т-ДНК не подчиняется каким-либо закономерностям и носит спонтанный характер. В результате таких инсерционных мутаций могут изменяться гены, кодирующие белки, вовлеченные в ключевые процессы биосинтеза, в регуляцию и синтез токсичных для человека и животных соединений. Нарушение структуры генов, кодирующих регуляторные белки, такие как транскрипционный фактор, могут приводить к нарушению экспрессии множества других генов.

Было интересным изучить влияние трансформации растений холостым вектором на активность ключевых ферментов метаболизма триптофана – триптофансинтазы и триптофанрацемазы. В качестве модельного объекта использовались трансгенные растения *Nicotiana tabacum* L., трансформированные *Agrobacterium tumefaciens* 699, несущей вектор pCNL65 *nptII*.

Полученные на данном этапе исследования результаты показывают, что удельная активность триптофансинтазы в трансгенных растениях существенно не отличалась от таковой в контрольных растениях. Удельная активность триптофанрацемазы (нмоль/мг белка/час) проявилась несколько иначе, в трансгенных растениях была в 1.5 раза ниже, чем в контрольных растениях, что объясняется увеличением содержания белка в трансгенных растениях почти в два раза. Активность триптофанрацемазы (нмоль/г сырого веса), наоборот, была выше в трансгенных растениях в 0.5 раза.

Сделано предположение, что трансформация растений холостой Т-ДНК не влияет на скорость синтеза триптофана, но в то же самое время вызывает изменения в скорости рацемизации триптофана.

ИЗУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ СОЛЕУСТОЙЧИВЫХ РАСТЕНИЙ РАПСА, СОДЕРЖАЩИХ ГЕН ПРОЛИНДЕГИДРОГЕНАЗЫ В АНТИСМЫСЛОВОЙ ОРИЕНТАЦИИ

Investigation of transgenic rapeseed plants with antisense proline dehydrogenase gene

М.С. Кунда, Г.Н. Ралдугина, М.И. Хамахми, В.П. Холодова, Вл.В. Кузнецов
Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва
E-mail: galina@ippras.ru

Одной из актуальных задач современной биотехнологии является создание трансгенных растений рапса, устойчивых к засолению. Эту задачу можно решить путем создания трансгенных растений рапса – супераккумуляторов пролина. Пролин – совместимый осмолит, универсальное протекторное соединение, которое может действовать в качестве антиоксиданта, энергетического суб-

страта, а также регулятора экспрессии генов осмотического ответа на солевой стресс.

Путем агробактериальной трансформации нами созданы растения рапса, содержащие фрагмент гена пролиндегидрогеназы (ПДГ) в антисмысловой ориентации, что позволяет на уровне транскрипции блокировать синтез этого фермента, разрушающего пролин, и повысить тем самым уровень пролина в клетках. Трансгенность растений подтверждена методами полимеразной цепной реакции (ПЦР) и обратной транскрипции; также была проведена оценка солеустойчивости некоторых линий рапса. Солеустойчивость у ряда трансгенных линий оказалась более высокой по сравнению с нетрансформированными растениями.

Растения поддерживали в коллекции в течение двух лет, размножая методом черенкования. Было показано, что введенный в геном рапса фрагмент гена ПДГ сохранялся в коллекционных линиях рапса в течение, по крайней мере, шести субкультивирований, что подтверждено с помощью ПЦР и свидетельствовало об отсутствии среди них химерных форм; в последних при размножении методом черенкования чужеродный ген элиминируется. Несколько трансгенных линий рапса были высажены в почву и после принудительного самоопыления дали семена. При этом у растений некоторых линий наблюдали прорастание семян в стручках на растениях. Семена собраны и посеяны на среду Мурасига-Скуга в стерильных условиях и были получены растения. В результате ПЦР-анализа ДНК из этих растений, принадлежавших к трем самоопыленным линиям рапса, фрагмент гена ПДГ обнаружен в геноме только некоторых из них. При этом часть растений, в которых обнаруживался фрагмент гена ПДГ, не содержали других элементов конструкции, использовавшейся для трансформации.

ФОТОСИНТЕЗ И ФОТОИНГИБИРОВАНИЕ В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ ТАБАКА С АГРОБАКТЕРИАЛЬНЫМИ ГЕНАМИ *ipt* И *iaam*

Photosynthesis and photoinhibition in *ipt* and *iaam* transgenic tobacco plants

В.А. Мудрик¹, В.В. Алексеева², Ю.С. Голубчикова³, Б.Н. Иванов¹

¹ Институт фундаментальных проблем биологии РАН, г. Пущино

² Филиал Института биоорганической химии РАН, г. Пущино

³ Уральский государственный университет, г. Екатеринбург

E-mail: vilen_mudrik@rambler.ru

Ауксины и цитокинины – одни из ключевых гормонов растений. Эти фитогормоны обладают широким регуляторным спектром действия, затрагивающим многие физиологические функции

растений. Показано стимулирующее влияние цитокининов при неблагоприятных условиях, что свидетельствует о существенной роли цитокининов при стрессовых воздействиях на растения. Действие ауксинов на регуляцию процесса фотосинтеза носит более опосредованный характер. Использование растений с введенными агробактериальными генами *iaaM* и *ipt* открыло широкие возможности для изучения функциональной роли ауксинов и цитокининов в ростовых, физиологических и биохимических процессах.

Цель нашей работы – изучение влияния повышенного содержания эндогенных цитокининов и ауксинов на биохимические и ростовые параметры, а также на параметры флуоресценции хлорофилла *a* ФС2 листьев, CO_2 -газообмен и устойчивость к ингибированию трансгенных растений табака с агробактериальными генами *ipt* и *iaaM*, выращенных *in vivo*. Объект исследования – трансгенные растения табака (*Nicotiana tabacum* L.) сорта Самсун с генами *ipt* и *iaaM*, выращенные *in vivo*. В *ipt*-plants содержание цитокининов было больше в три раза, а в *iaaM*-plants – в два раза больше ауксинов по сравнению с растениями дикого типа. Растения выращивали в сосудах с почвой на станции искусственного климата «Биотрон».

У трансгенных растений *in vivo* уменьшились длина, вес и площадь листьев. Содержание растворимого белка и углеводов в расчете на сырой вес листьев в *iaaM*-растений снижалось на 20 %, у *ipt*-растений содержание растворимого белка увеличилось на 44 % по сравнению с диким типом, а содержание хлорофилла снизилось на 15–20. Квантовый выход снизился на 10 и 29 % для *iaaM* и *ipt*-растений соответственно по сравнению с диким типом, в то время как снижение скорости нетто-фотосинтеза (P_N) в расчете на хлорофилл было более значительным – на 42 и 66 %. Значения коэффициента фотохимического тушения qP и относительной скорости электронного транспорта (ETR) у *iaaM*-растений существенно не отличались от значений для дикого типа. У *ipt*-растений наблюдали значительное снижение qP и ETR по сравнению с диким типом. Для растений дикого типа, *iaaM* и *ipt*-растений максимальный квантовый выход был 0.815, 0.785 и 0.0.770 соответственно. У трансгенных растений нефотохимическое тушение (NPQ) было выше у *ipt*-растений. После 15 индукции флуоресценции хлорофилла NPQ трансгенных растений не выходило на стационарный уровень.

После 30-минутной обработки растений светом PFD 6000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ необратимое фотоингибирование *ipt*-plants было на уровне контрольных растений (45 %), а у *iaaM*-plants оказалось более значительным – 78 %, т.е. *iaaM*-plants плохо восстанавливались после стресса. Предположили, что это связано с образованием активных форм кислорода, оказывающих повреждающее действие на липиды.

**ПРОМОТОР ГЕНА ПАТАТИНА КЛАССА I КАРТОФЕЛЯ
СОХРАНЯЕТ СВОЙСТВА ИНДУЦИБЕЛЬНОСТИ
И ОРГАНОСПЕЦИФИЧНОСТИ ПРИ ЭКСПРЕССИИ
В ТРАНСГЕННОМ АРАБИДОПСИСЕ**

**The class I patatin gene promoter expressing in transgenic *Arabidopsis*
pertains features of inducibility and organ specificity**

Е.М. Наумкина, Ю.П. Болякина, Г.А. Романов

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва
E-mail: gar@ippras.ru

Дифференциальная экспрессия генов составляет молекулярную основу онтогенеза и органогенеза всех многоклеточных организмов, включая растения. Регуляция экспрессии генов происходит в значительной мере на уровне транскрипции, где ведущая роль принадлежит их регуляторной зоне – промотору. В этой связи исследование функциональных и структурных особенностей генных промоторов является одной из важнейших задач современной биологии. Кроме того, знание особенностей функционирования промоторов важно и для практических целей, например, таких, как создание трансгенных растений.

У картофеля (*Solanum tuberosum* L.) пататиновый промотор класса I (ВЗЗ-промотор) органоспецифичен и экспрессирует ген пататина, главным образом, в клубнях. Однако этот промотор может быть индуцирован и в других органах картофеля сахарозой или светом. Одним из современных подходов исследования функциональных особенностей промоторов является анализ их активности в условиях гетерологичной экспрессии, т.е. в трансгенных растениях. Обычно для этих целей промотор объединяют с кодирующей последовательностью какого-либо репортерного белка, заметно не влияющего на метаболизм клетки и развитие растения. При гетерологичной экспрессии, особенно у филогенетически отдаленных видов, проявляются как высококонсервативные универсальные системы регуляции генной активности, так и механизмы регуляции, свойственные отдельной группе растений или данному виду.

В настоящей работе мы исследовали активность ВЗЗ-промотора, соединенного с репортерным геном, при гетерологичной экспрессии в ВЗЗ::*GUS* трансгенных растениях арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana* L.) и сравнивали с гомологичной экспрессией той же конструкции ДНК в картофеле. Уровень активности ВЗЗ-промотора количественно определяли на основе активности β-глюкуронидазы (GUS). Тканеспецифичность и индуцибельность ВЗЗ-про-

мотора сохранялись при гетерологичной экспрессии в проростках арабидопсиса, хотя были выражены иначе по сравнению с гомологичной экспрессией в картофеле. Основным органом функционирования ВЗЗ-промотора в неиндуцированном арабидопсисе являлся корень, а при воздействии экзогенно добавленной сахарозы им становились семядоли. 10 мМ сахарозы было достаточно для повышения во много раз активности ВЗЗ-промотора в целых проростках. Степень индуцибельности пататинового промотора в проростках арабидопсиса была строго органоспецифичной и резко возрастала в ряду корень < гипокотиль < семядоли. Активность ВЗЗ-промотора в семядолях при воздействии 150-250 мМ сахарозы увеличивалась в 200-300 раз, что во много раз превышало степень индукции данного промотора в органах растений картофеля. Глюкоза и фруктоза действовали гораздо слабее, чем сахароза. Фитогормоны, влияющие на клубнеобразование у картофеля (гиббереллины, ауксины, цитокинины), не оказали заметного влияния на функционирование ВЗЗ-промотора в арабидопсисе. Активации сахарами ВЗЗ-промотора предшествовал лаг-период длительностью примерно 6 час. Наличие такого лаг-периода служит указанием на то, что пататиновый промотор не является первичной мишенью для сахарозного сигнала. Выявленные новые количественные закономерности гетерологичной экспрессии пататинового промотора класса I картофеля способствуют лучшему пониманию его базовых функциональных характеристик и позволяют точнее прогнозировать его поведение при переносе в другие виды растений.

**ВЛИЯНИЕ ТРАНСФОРМАЦИИ РАСТЕНИЙ ТАБАКА
ГЕНОМ $\Delta 9$ -АЦИЛ-ЛИПИДНОЙ ДЕСАТУРАЗЫ
НА ФОРМИРОВАНИЕ У НИХ УСТОЙЧИВОСТИ К ГИПОТЕРМИИ**

**Effect of the $\Delta 9$ -acyl-lipid desaturase gene transformation
on the formation of the hypothermia tolerance in tobacco plants**

В.Н. Попов, Н.В. Кипайкина, Д.А. Лось, Т.И. Трунова, В.Д. Цыдендамбаев
Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва
E-mail: vdt@ippras.ru

Исходя из предположения, что введение в геном растения табака (*Nicotiana tabacum* L.) дополнительного гена десатуразы приведет к повышению ненасыщенности его мембранных липидов, были получены трансгенные растения табака, трансформированные геном *desC* из синезеленой водоросли *Synechococcus vulcanus*, кодирующим $\Delta 9$ -ацил-липидную десатуразу. В результате трансформации были получены шесть линий трансгенных растений –

des1, des2, des3, des7, des8, des10. Экспрессия гена *desC* в полученных трансформантах была подтверждена молекулярными методами. Контролем служили растения табака, трансформированные пустым бинарным вектором pGA482. Растения культивировались при 22 °C и 16-часовом фотопериоде на агаризованной среде по прописи Мурасиге и Скуга, дополненной феруловой кислотой (1 мг/л), канамицином (25 мг/л) и клафораном (250 мг/л). Холодовую обработку изученных растений проводили в холодильной камере, после чего оценивали их холодостойкость и определяли абсолютное содержание и жирнокислотный состав липидов листьев. По абсолютному содержанию липидов в листьях, исследуемые растения можно разделить на две группы – с более высоким по сравнению с контролем содержанием липидов – группа 1 (линии des1, des2, des7, des10) и с относительно низким содержанием липидов – группа 2 (линии des3 и des8). Кроме того, растения линий группы 1 отличались более высоким, а растения линий группы 2 – более низким уровнем ненасыщенности (индекс ненасыщенности – 1.833-2.053 и 1.181-1.371 соответственно), чем у контрольных растений (1.555). При этом первые отличались повышенной, а вторые – пониженной концентрацией олеиновой кислоты; для стеариновой кислоты (субстрат $\Delta 9$ -ацил-липидной десатуразы) наблюдалась обратная картина.

Эти различия между группами линий сопровождались и различиями в их чувствительности к охлаждению. Результаты анализа величин индекса повреждения листьев и интенсивности протекания процессов перекисного окисления липидов показали, что растения линий группы 2 были столь же (des8) или даже более (des3) чувствительны к охлаждению, чем и контрольные, в то время как растения линий группы 1 были гораздо более устойчивы к этому неблагоприятному фактору. Самой устойчивой к охлаждению была линия des1, отличавшаяся от остальных наиболее высоким соотношением концентраций олеат/стеарат. В трансформантах именно этой линии $\Delta 9$ -ацил-липидная десатураза эффективнее превращала стеариновую кислоту в олеиновую, тем самым образуя субстрат для последующего биосинтеза ди- и триненасыщенных жирных кислот, увеличение доли которых и приводило к повышению холодоустойчивости. Что же касается трансформантов линий группы 2, то, несмотря на наличие в их клетках экспрессии гена *desC*, по каким-то неизвестным пока причинам в них нарушался биосинтез липидов, что и приводило к значительному снижению их холодоустойчивости.

Таким образом, можно заключить, что трансформация высших растений каким-либо геном может приводить как к улучшению, так и ухудшению желаемого признака у полученного трансгенного растения.

ВЕКТОРЫ ДЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ПЛАСТИД. ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ**Vectors for genetic transformation of plastids. Perspectives for using****Н.И. Рекославская, Р.К. Саляев**Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск
E-mail: rekoslavskaya@sifibr.irk.ru

Пластидная трансформация растений открывает большие возможности экспрессии и продуцирования рекомбинантных белков. Известны несколько обстоятельств, которые обеспечивают высокую биотехнологическую привлекательность трансформации пластид.

1. Высокая копияность пластидного генома: клетка содержит около 100 пластид, каждая из которых может содержать до 100 копий геномов, поэтому возможна амплификация трансгена до 10 тыс. копий в одной клетке.

2. Пластидный геном не образует структур, подобных нуклеосомам, поэтому позиционный эффект не характерен для ДНК пластид, и замолкание генов вообще не существует в пластидном геноме и не обнаруживается эффект РНК – интерференции.

3. Доступность информации о последовательностях генов в пластидах дает возможность гомологичной рекомбинации с точным адресованием трансгена с целью его стабильной интеграции.

4. Пластидная экспрессия во многих аспектах сродни прокариотическим системам и преимущественно контролируется на посттранскрипционном уровне. Поэтому различные регуляторные последовательности прокариотических генов вводят в генетические конструкции для усиления экспрессии трансгена. Например, 5'-нетранслируемая область (5'-UTR) гена 10 сильного бактериофага T7 (T7G10) обеспечивает высокую экспрессию в пластидах. Другим важным элементом является последовательность, следующая сразу же после стартового кодона (downstream box), которая обеспечивает правильную посадку на рибосомы, так как входит в состав RBS (ribosome binding site), вследствие чего обеспечивается ускорение инициации трансляции.

5. Многие пластидные гены организованы в ди- и полицистронные опероны, так как в них существуют не только антитерминаторные механизмы, но и дополнительные элементы, которые обеспечивают сквозное прохождение – «сканирование» РНК-полимеразы (leaky scanning), реинициацию транскрипции, ослабление контекста последовательности Козак и другие механизмы, обеспечивающие синтез длинных первичных транскриптов, включаю-

щих информацию нескольких генов. Поэтому возможно создание конструкций, содержащих несколько генов под одним промотором. Например, сильный промотор 16S rРНК ставят перед целевым геном, за которым следует беспромоторный маркерный репортерный *gus* или селективный *nptII* гены. Такая конструкция обеспечивает значительно более высокую экспрессию гена *gus* (или *nptII*) по сравнению с конструкцией, в которой этот же репортерный ген *gus* помещен под отдельный сильный промотор.

6. Многообразие и вариабельность стратегий природной прокариотической экспрессии нативных генетических оперонов дают большую свободу для создания экспрессивных генетических каскадов, а при их выборе постановку специфических биотехнологических задач. Примеры: а) гомологическая интеграция беспромоторного гена, подстраивающегося в конец оперона (operon extension), б) создание «расщепленных» генетических каскадов, которые после интеграции воссоединяются и транслируются как один оперон («split» plastid transformation vector). Этот тип конструкции достигается физическим разделением целевых генов и обеспечением их соответствующими фланкирующими последовательностями на отдельных плазидах, которые после гомологичной рекомбинации при интеграции создают полноценный экспрессивный оперон; в) многообещающими будут конструкции с последовательностями, содержащими так называемые «ловушки для рибосом» – IRES – вторичные структуры для «отлавливания и внутренней посадки» рибосом на акцепторные цис-регуляторные элементы в 5'UTR; г) конструкции, в которых присутствуют в 3'UTR (3'нетранслируемой области) возле сигнального поли(А) сайта цис-элементы для акцепции поли(А)связывающего белка (ПАСП – РABP), взаимодействующего с кэпом и обеспечивающего циклическую замкнутую транскрипцию вследствие закрепления РНК-полимеразы на опероне и ряд других стратегий.

7. При пластидной трансформации также наблюдают и ядерную трансформацию.

8. Вслед за трансформацией хлоропластов будут трансформированными и другие пластыды, например, хромопласты, которые очень важны для создания трансгенных растений, у которых желательна экспрессия в плодах.

9. При пластидной трансформации существуют свои особенности, например: а) необходима длительная селекция для получения гомопластомных трансгенных растений; б) высокая экспрессия генетической кассеты будет обеспечивать и экспрессивность маркерного гена, что нежелательно при получении конечного биотехнологического продукта. Поэтому в кассеты вводят разнообразные системы для освобождения от маркерных генов, напри-

мер, «пустую» плазмиду без генов, или создают конструкции, содержащие систему элиминации маркерного гена Cre-lox и другие механизмы. Таким образом, генетическая трансформация плазмид открывает новые возможности в работах по генетической инженерии растений.

ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГЕНА *ugt* В КАЧЕСТВЕ СЕЛЕКТИВНОГО ПРИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ РАСТЕНИЙ

The experience of the gene *ugt* using as a selective gene during plants genetic transformation

Н.И. Рекославская¹, Р.К. Саляев¹, Дж. Словин²

¹ Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск
E-mail: rekoslavskaya@sifibr.irk.ru

² Сельскохозяйственная научно-исследовательская служба,
Белтсвилл, Мэриленд, США

Уридиндифосфатгликозидтрансферазы (УДФГ-трансферазы) широко распространены в природе и найдены в растениях, у животных, насекомых, вирусов, дрожжей, грибов, мхов, лишайников, т.е. практически у всех представителей живой природы. В зависимости от объекта УДФГ-трансферазы проявляют субстратную специфичность и могут связывать разнообразные агликоны с сахарами. Многие белки, гормоны, антитела, нуклеиновые кислоты проявляют свои эффекторные функции только после связывания с определенными сахарами или олигосахаридами. У растений система связывания фитогормонов и синтетических регуляторов роста с сахарами выполняет функцию временной инактивации (или транспортной) с образованием комплексных соединений – конъюгатов, в которых сохраняется неизменной структура ростового вещества и при необходимости оно может быть высвобождено из конъюгата в результате гидролиза и использоваться для регуляции роста и развития. 2,4-Дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д) представляет собой регулятор роста гербицидного действия для двудольных. У однодольных (кукурузы, овса, ячменя) 2,4-Д связывается с помощью УДФГ-трансферазы в неактивный конъюгат и поэтому не проявляет токсического эффекта. Ген *ugt*, кодирующий УДФГ-трансферазу, был изолирован из библиотеки генов в фаге лямбда, созданной на основе мРНК из проростков кукурузы, и выделен методом вестерн блоттинга с помощью антител, полученных в сыворотке крови кролика после введения очищенного препарата УДФГ-трансферазы из созревающего эндосперма *Zea mays* L. кДНК гена *ugt* из кукурузы была помещена в pBluescript

под промотор сильного фага ТЗ, и клонирование производили в *E. coli* DH5α. С помощью подобранных праймеров и при использовании ПЦР последовательность гена *ugt* из кукурузы была секвенирована и ее длина составила 1755 пн. Рестрикционный анализ, саузерн и вестерн блоттинги подтвердили размер вставки гена *ugt* 1755 пн в pBluescript.

В растения семейства Пасленовых (томаты) вводили ген *ugt* из кукурузы с помощью двух- или трехродительского скрещивания с векторными плазмидами агробактерий. Полученные трансгенные растения обнаруживали ускорение роста и развития, а растения картофеля разных сортов и дикого картофеля *Solanum demissum* L. проявили к тому же и устойчивость к 2,4-Д.

В связи с этим было решено изучить возможность использования гена *ugt* в качестве селективного при отборе трансгенных растений после введения им кассет генов с конструкциями, содержащими ген *ugt*. Данная работа ставила задачей исследование возможности замены маркерного селективного гена *nptII*, кодирующего неомицинфосфотрансферазу, на ген *ugt*, так как антибиотик канамицин, обычно используемый при отборе трансгенных растений, оказывает неблагоприятное воздействие на корнеобразование, рост и по крайней мере на первых фазах развития.

С помощью двухродительского скрещивания *E. coli* DH5α с плазмидой pBluescript, несущей ген *ugt* из кукурузы, и агробактерии *A. tumefaciens* LBA4404 трансформировали 14-дневные проростки томата *Lycopersicon esculentum* Mill. сорта Money Maker в растворе 5 %-ной глюкозы, содержащей 20 мг/л ацетосирингона. Присутствие гена *ugt* в составе трансконъюганта показали с помощью соответствующих праймеров и ПЦР. Селекцию трансформированных проростков томата T₀ с геном *ugt* проводили на среде Мурасиге и Скуга (МС) в присутствии 0.1-1.0 мг/л 2,4-Д в течение трех-четырех недель. Контрольные проростки повреждались при концентрациях 0.25-0.5 мг/л 2,4-Д. Трансгенные проростки томата поколения T₀ были устойчивы к концентрациям 0.75-1.0 мг/л 2,4-Д.

Пять выживших на среде МС с 2,4-Д трансгенных растений акклиматизировали, затем перенесли в поликарбонатную теплицу и выращивали до получения урожая. Рост трансгенных растений был быстрым, в результате чего урожай плодов составил от 1.5 до 2.5 кг на растение. Из плодов томата поколения T₁ выделяли семена, которые затем проращивали на среде МС в течение 14 сут. У проростков отделяли корневую систему и экспланты помещали на среду МС, содержащую 0.75 мг/л 2,4-Д. То же самое проделывали и с контрольными проростками томата сорта Money Maker. Через семь-десять дней у проростков поколения T₁ образовывались ко-

роткие утолщенные корни в большом количестве, которые формировали щётку в основании гипокотыля. Рост трансгенных проростков был быстрее и их высота через один месяц экспозиции оказалась примерно в 1.7-2 раза больше по сравнению с контрольными. У эксплантов из контрольных проростков в основании гипокотыля образовывалось каллусоподобное разрастание и впоследствии они желтели и погибали. Корней контрольные экспланты не образовывали. Таким образом, полученные результаты позволяют рассматривать ген *ugt* как возможный селективный ген для отбора трансформированных растений.

ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *HBsAg* В КЛЕТКАХ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ И КУЛЬТУРЫ ТКАНЕЙ

Tissue-specific expression of *HBsAg* gene in transgenic plant cells and tissue culture

Е.Б. Рукавцова, Т.В. Абрамихина, Н.Я. Шульга¹, В.А. Быков¹, Я.И. Бурьянов
Филиал Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова РАН, г. Пущино
E-mail: ruk@fibkh.serpukhov.su

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт
лекарственных и ароматических растений, г. Москва

Трансгенные растения могут стать альтернативой для получения дешевых и безопасных вакцин по сравнению с их традиционными продуцентами. Растительные клетки имеют энзиматические системы посттрансляционной модификации, необходимые для сборки синтезируемых мономерных белков вакцины в иммуногенные мультимерные формы. В растениях можно осуществить полноценный синтез целевых антигенов, способных вызывать активный иммунный ответ. В настоящее время в мире создаются и исследуются трансгенные растения в качестве продуцентов вакцин против различных возбудителей болезней человека, в том числе и вакцины против вируса гепатита В. Однако коммерческие вакцинные препараты на основе трансгенных растений до сих пор не созданы. Для получения растений-продуцентов вакцины против гепатита В с тканеспецифической экспрессией гена поверхностного антигена вируса гепатита В (*HBsAg*) в целых растениях и культуре тканей может быть перспективным использование тканеспецифических промоторов, в частности агробактериальных гибридных промоторов.

Нами получены растения табака с геном *HBsAg* под контролем

гибридного промотора (Aocs)3AmasPmas с регуляторными элементами агробактериальных генов октопинсинтазы и маннопинсинтазы и этого же промотора с интроном гена алкогольдегидрогеназы кукурузы *adh1*. Присутствие интрона гена *adh1* не приводило к существенному изменению экспрессии гена *HBsAg* в растениях. Проведено сравнение уровня синтеза поверхностного антигена вируса гепатита В (HBs-антигена) в трансгенных растениях, экспрессирующих ген *HBsAg* под контролем различных промоторов. Количество HBs-антигена в растениях с геном *HBsAg* под контролем агробактериальных гибридных промоторов (Aocs)3Amas-Pmas было максимальным в корнях растений и достигало 0.01 % от общего растворимого белка. Количество HBs-антигена в растениях с геном *HBsAg* под контролем двойного промотора 35S РНК вируса мозаики цветной капусты оставалось одинаковым во всех органах растений и достигало 0.06 % от общего растворимого белка. На основе растений с геном *HBsAg* получены культуры каллусов и «косматых корней», синтезирующие HBs-антиген.

Нами показано, что использование гибридного промотора (Aocs)-3AmasPmas может быть перспективным для тканеспецифической экспрессии различных белков, важных для фармакологии и медицины, а также для получения продуцентов на основе культуры клеток трансгенных растений.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Динамика генофондов растений животных и человека», а также грантов РФФИ № 05-08-01473 и 06-04-81022.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕТЕРОЛОГИЧНОГО ГЕНА ГАММА-ИНТЕРФЕРОНА БЫКА В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ ТАБАКА (*N. TABACUM* L.)

The expression of foreign bovin gamma-interferon gene in tobacco plants (*N. tabacum* L.).

Н.В. Савельева, Л.А. Лутова, Е.Э. Дудник

Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург

E-mail: nata.saveljeva@gmail.com

Данная работа посвящена созданию безопасной биотехнологической системы, применимой для получения фармакологических соединений в промышленности и сельском хозяйстве. Наши исследования начались с создания модельной системы, на которой можно быстро и легко проследить наследование трансгена в ряду поколений и изучить экспрессию гетерологичного белка. В качестве такой системы мы использовали трансгенные растения табака

(*N. tabacum* L.), содержащие ген бычьего гамма-интерферона.

Интерфероны – это семейство эволюционно родственных белков, продуцируемых большинством эукариотических клеток в ответ на различные антигены вирусной и невирусной природы. В настоящее время известно три вида интерферонов: α , β и γ . Интерфероны α и β относятся к активным противовирусным агентам, характерным для большинства типов клеток и действующим в большей или меньшей степени против всех вирусов. Интерферон γ , в отличие интерферонов α и β , является, в основном, регулятором клеточного и гуморального иммунитета (естественного или специфического) и обладает собственными эффекторными функциями (противовирусными, цитотоксическими и противоопухолевыми). Таким образом, препараты, содержащие бычий интерферон- γ , представляют интерес для лечения и профилактики лейкемии и туберкулеза у крупного рогатого скота.

Трансгенные растения табака (*N. tabacum* L.) получены методом агробактериальной трансформации. В работе был использован штамм *Agrobacterium tumefaciens* ЕНА105 (плазмида рART 27). Ген гамма-интерферона быка, предоставленный сотрудниками лаборатории биохимической генетики СПбГУ, был встроен в область Т-ДНК под промотор 35S. В качестве растительного селективного маркера использован ген *nptII*, находящийся под контролем промотора нопаинсинтазы.

В результате эксперимента получено семь трансгенных растений табака (поколение T_0), содержащих целевой ген γ -интерферона быка. Данные растения стали родоначальниками семи независимых трансгенных линий табака. ПЦР-анализ трансгенных растений (поколения T_1 и T_2) показал стабильное наследование гена γ -интерферона быка у пяти линий. Расщепление, близкое к 3:1, наблюдавшееся среди растений поколения T_1 этих линий (полученных при самоопылении отдельных растений T_0) по признаку Km-устойчивости и по признаку наличия/отсутствия ПЦР-продукта, соответствующего гену *IFN- γ* , позволило сделать вывод о моногенном характере наследования данных признаков.

Кроме того, с помощью метода RT-ПЦР проведен качественный анализ уровня экспрессии гена γ -интерферона в трансгенных растениях данных пяти линий. Было продемонстрировано отсутствие экспрессии для одной линии трансгенных растений на протяжении двух поколений (поколения T_1 и T_2). Возможно, что в данном случае встраивание гена γ -интерферона произошло в область гетерохроматина, что явилось причиной замолкания гена *IFN- γ* у исходного трансформанта. Анализ экспрессии гена *IFN- γ* в растениях поколения T_1 следующих четырех линий показал наличие разного уровня экспрессии среди потомков каждой линии, который наследуется в поколении T_2 .

Таким образом, среди полученных трансгенных растений име-

ются растения с разным уровнем экспрессии целевого гена, что позволяет нам выбрать растения с наиболее высоким уровнем экспрессии целевого гена в качестве растений – продуцентов белка γ -интерферона.

**ПОЛУЧЕНИЕ РАСТЕНИЙ ТОМАТА, ТРАНСГЕННЫХ ПО ГЕНУ PreS2-S,
ПРОДУЦИРУЮЩЕМУ ПОВЕРХНОСТНЫЙ АНТИГЕН
ВИРУСА ГЕПАТИТА В С ЦЕЛЬЮ СОЗДАНИЯ СЪЕДОБНОЙ ВАКЦИНЫ**

**Obtaining of tomato transgenic plants with the gene PreS2-S producing
the surface antigen of hepatitis B virus with the goal
of edible vaccine creation**

**Р.К. Саляев¹, Н.И. Рекославская¹, А.С. Столбиков¹, С.Н. Щелкунов²,
Р.В. Хаммонд³**

¹ Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск
E-mail: salyaev@sifibr.irk.ru

² Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии
«Вектор», пос. Кольцово Новосибирской обл.

³ Лаборатория молекулярной фитопатологии, Белтсвилл, Мэриленд, США

Считается, что съедобные вакцины, создаваемые на основе трансгенных растений, способны сыграть большую роль в профилактике опасных и особо опасных вирусных инфекций, в том числе и гепатита В (ВГВ). HBsAg известен как протективный антиген, так как содержит детерминанты (в частности, детерминанту «а» с 124 по 147 аминокислотный остаток), присутствующие практически у всех известных изолятов ВГВ. Поэтому на основе антигенного пептида HBsAg возможно создание вакцины против ВГВ, формирующей соответственный антительный ответ в организме.

Цель настоящей работы – получение трансгенных растений томата с введенным геном *preS2-S*, содержащим последовательность HBsAg, кодирующую протективный антиген, и изучение интеграции и экспрессии гена *preS2-S* в поколении T₁ в плодах томата с целью создания съедобной вакцины против ВГВ. В работе использован штамм *Agrobacterium tumefaciens* AGLO с плазмидой pBINPLUS/ARS, содержащей *preS2-S* под промотором p35S вируса мозаики цветной капусты и сигналом терминации [p(A)sign]. Поскольку получение «съедобной» вакцины предполагалось с использованием плодов томата, также была создана конструкция, в которой ген *preS2-S* наряду с p35S помещен под плодоспецифичный промотор pE8. В пространство между RB и LB T-ДНК помещали кодирующую последовательность гена неомицинофосфотран-

сферазы (*NPTII*) под промотором *ubi3* из кукурузы для осуществления селективного отбора эксплантов на средах с канамицином. Правильность структуры созданной плазмиды проверяли рестрикционным анализом и секвенированием целевого гена.

Трансгенные растения поколений T_0 и T_1 со вставками гена *PreS2-S* характеризовались нормальным ростом и развитием, обильно цвели и дали значительное количество плодов (свыше 60 кг). Средний вес плодов находился в пределах 50-80 г. В ПЦР продуктах с ДНК из листьев растений томата с геном *PreS2-S*, прошедших селекцию на среде МС с канамицином в концентрациях 75-100 мг/л, были обнаружены амплификаты фрагмента гена размером в 200 пн. Иммуноферментный анализ антигенного белка HBsAg в плодах проводили с помощью набора, выпускаемого фирмой Вектор-Бест (Кольцово, Россия) для клинической диагностики гепатита В «Вектогеп В – HBs-антиген – стрип (комплект 3) тест-система D-0556».

Для определения оптимальной зоны отбора образца из плода с наивысшей активностью экспрессии антигенного белка HBsAg предварительно проводили ПЦР в образцах из верхней, средней и нижней частей плода массой 63 г варианта растения, прошедшего селекцию при 100 мг/л канамицина в МС среде, а также из студенистой зоны перисперма вокруг семян. В результате этой работы остановились на зоне взятия образцов в боковой части перикарпа с захватом перисперма. В образце ткани, взятой из плода растения, трансформированного плазмидой pBINPLUS/ARS, не содержащей гена *PreS2-S*, амплификации фрагмента целевого гена не выявлено.

Для иммуноферментного анализа содержания антигенного белка HBsAg в плодах растений, трансформированных геном *PreS2-S*, брали образцы из тех же участков плодов. В образцах поколений T_0 и T_1 с геном *PreS2-S* обнаружено высокое содержание антигенного белка HBsAg в количествах 8.3-15.3 нг/мг общего растворимого белка. Для подтверждения присутствия HBsAg в плодах трансгенного томата с геном *PreS2-S* использовали также тест-систему «Вектогеп В – HBs-антиген – подтверждающий тест – стрип (комплект 5) D-0558» и метод конкурентного иммуноферментного анализа, основанный на принципе нейтрализации HBsAg специфическими антителами.

Результаты проведенной работы показали, что трансгенные по гену *PreS2-S* растения томата поколения T_1 продуцировали антигенный полипептид HBsAg, входящий в состав белка *PreS2-S* оболочки вируса гепатита В.

Работа выполнена при финансовой поддержке Международного научно-технического центра (грант № 2176р).

**ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ ЭКСТРАКЛЕТОЧНЫХ РИБОНУКЛЕАЗ,
ИНДУЦИРУЕМЫХ ПОРАНИЕМ, НА МОДЕЛИ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ****Model transgenic plants to study functions
of wound-induced extracellular ribonucleases**

С.С. Сангаев¹, Е.А. Трифонова¹, С.Е. Титов¹, А.В. Романова¹,
Я.С. Колодяжная¹, М.Л. Комарова¹, М.В. Сапоцкий², В.И. Малиновский²,
А.В. Кочетов¹, В.К. Шумный¹

¹ Институт цитологии и генетики, г. Новосибирск

E-mail: sangaev@gorodok.net

² Биолого-почвенный институт ДВО РАН, г. Владивосток

Экстраклеточные рибонуклеазы растений могут выполнять различные специализированные функции. Например, S-РНКазы одновременно осуществляют функции распознавания и цитотоксического агента в межклеточном пространстве пестиков, что позволяет аллель-специфично ингибировать рост пыльцевых трубочек и, таким образом, предотвращать инбридинг. S-подобные экстраклеточные РНКазы индуцируются в ответ на различные стимулы, но не задействованы в генерации самонесовместимости. Их индукция наблюдается при нехватке неорганического фосфата, во время старения, в ответ на грибковую инфекцию и в ответ на поранение. Считается, что РНКазы, индуцируемые при недостатке фосфата и во время старения, задействованы в механизмах рециркуляции фосфата и рибонуклеиновых кислот. Показано, что РНКазы, индуцируемые в ответ на грибковую инфекцию, могут активно подавлять развитие патогена.

Как правило, вирусы проникают в растения через поранения, вызванные механическим повреждением или поеданием фитофагами. Мы предположили, что экстраклеточные рибонуклеазы, индуцируемые в ответ на поранение, являются активным компонентом противовирусной защиты растений на начальных этапах инфекции.

Цель данной работы – изучение роли индуцируемых поранением экстраклеточных рибонуклеаз в защите от вирусов на модели трансгенных растений табака. Были поставлены следующие конкретные задачи: 1) получение трансгенных растений табака, несущих ген гетерологичной экстраклеточной рибонуклеазы, индуцируемой поранением; 2) анализ и отбор трансформантов табака, характеризующихся повышенным уровнем рибонуклеазной активности; 3) сравнительный анализ устойчивости трансформантов и контрольных растений табака к вирусу табачной мозаики.

Для получения трансгенных растений, экспрессирующих гетерологичную экстраклеточную рибонуклеазу, был выбран ген *ZRNaseII Zinnia elegans*, экспрессия которого индуцируется в ответ на повреждение. С помощью обратной транскрипции была получена кДНК этого гена и через промежуточное клонирование введена в бинарный вектор pVi101 для агробактериальной трансформации растений. Окончательная генетическая конструкция включала ген неоминифосфотрансферазы II (NPT II – селективный маркер) и кДНК целевого гена под управлением сильного конститутивного промотора 35S РНК вируса мозаики цветной капусты. Были получены растения-трансформанты, у которых с помощью NPT-теста показана экспрессия маркерного гена. Измерение рибонуклеазной активности в грубых экстрактах из листьев показало, что у всех трансформантов она выше, чем у нетрансгенного контроля. Эти результаты также были подтверждены с помощью форетического анализа спектра белков с рибонуклеазной активностью в тканевых экстрактах трансгенных и контрольных растений табака. Были отобраны растения с разным уровнем рибонуклеазной активности по сравнению с контролем (в 3-14 раз выше контроля).

Проведен предварительный анализ растений, несущих ген *ZRNaseII Zinnia elegans* и характеризующихся повышенным уровнем рибонуклеазной активности, на устойчивость к вирусу табачной мозаики. Обнаружено, что полученные трансформанты обладают повышенной вирусостойкостью по сравнению с контрольными растениями. Трансгенные растения формировали симптомы поражения с большой задержкой и характеризовались низким содержанием вирусного антигена при концентрациях ВТМ в инокулюме до 10 мкг/мл.

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИЗУЧЕНИЯ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ

Cytogenetic investigation of transgenic plant

Л.А. Семенова, А.Г. Еникеев, А.В. Натяганова

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск
E-mail: lasema@sifibr.irk.ru

Трансформацию, с цитогенетической точки зрения, можно рассматривать как Т-ДНК инсерцию и посттрансформационные изменения – как возможные последствия инсерционного мутагена. Трансгенное растение претерпевает, по меньшей мере, двойной стресс: собственно процесс трансформации и культивирование *in vitro*. При трансформации вектором с селективным геном устойчивости к антибиотику дополнительным стрессом является выра-

щивание регенерантов на селективной среде. Резонно предположить, что случайное и ненаправленное встраивание в геном чужеродной ДНК сопровождается каскадом изменений, непредсказуемо затрагивающих какие-либо события в жизни трансгенного организма. Логично ожидать проявления таких изменений на самых разных уровнях организации: от фенотипического до молекулярно-генетического. И если последствия на уровне фенотипа и экспрессии гена действительно на современном этапе активно изучаются, то гораздо меньше сведений о воздействии трансгенеза на биохимическом, физиологическом и, особенно, на цитогенетическом уровне. Между тем, даже рутинный цитогенетический анализ (определение митотического индекса, хромосомных аберраций, числа и морфологии хромосом и др.) способен дать много дополнительной информации.

Так, уникальная культура ткани скорзонеры (*Schorzoneria hispanica* L.), являющаяся природным трансгеном, характеризуется измененным вторичным метаболизмом и остается цитогенетически стабильной на протяжении почти 50 лет.

Трансгенная линия гороха (*Pisum sativum* L.), полученная при агробактериальной трансформации штаммом A281 сорта «Казанец» (с усатым типом листа и детерминантным типом стебля), демонстрирует значительные фенотипические отличия, в том числе изменение формы листа и индетерминантный рост стебля, которые сохранялись у T_2 поколения. Уровень хромосомных аберраций в кончиках корешков семян T_2 был сравним с таковым у исходной линии. Показатель MI трансгенов в четыре-пять раз превышал MI исходных растений, чем можно объяснить высокие темпы роста и развития трансгенной линии. Кроме того, по предварительным данным, у трансгенных растений наблюдается большая популяция полиплоидных клеток.

Таким образом, последствия данной трансформации трудно определить как деструктивные, хотя последствия столь мощного стресса ожидалось именно таковыми.

По современным представлениям, эффект трансгенеза во многом зависит от местоположения вставки, поэтому представляет интерес определение хромосомной локализации Т-ДНК, что позволяют современные цитогенетические методы (например, FISH) и соотнесение ее с измененными фенотипическими признаками. Весьма многообещающим представляется изучение трансгенного кариотипа с помощью дифференциального окрашивания, что может дать ценную информацию о вариациях тонкой структуры хромосом.

**ВЛИЯНИЕ ВСТРОЙКИ *TMS* ГЕНА
НА РАЗВИТИЕ И КЛУБНЕОБРАЗОВАНИЕ
ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ *IN VITRO***

***Tms* gene influence on transgenic potato plant development
and tuberization *in vitro***

Г.И. Соболюкова, Н.О. Юрьева, Т.В. Баврина, Е. Крылова, Ю.Ю. Кустова
Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва
E-mail: yno@newmail.ru

В результате трансформации клубневых эксплантов картофеля сорта Дезире агробактериальной конструкцией, несущей *Tms*-ген, который контролирует один из этапов синтеза ауксина, было получено 11 трансгенных линий. Причем в одной из них целевой ген отсутствовал (содержался только *NPT*). Рост и развитие трансгенных растений оценивали *in vitro* на безгормональных средах в сравнении с их исходным сортом. Только одна линия с *Tms*-геном и одна с *NPT* продемонстрировали более раннее по сравнению с исходной формой начало ризогенеза. В дальнейшем, интенсивность роста корня уменьшалась, в особенности у линий, полученных после длительного (180 суток) инкубирования на селективных средах. У линий, полученных на 90-е сутки, угнетение роста корня было менее выражено. По высоте побега, скорости его роста, числу междоузлий значительных отклонений от исходной *in vitro* формы не было выявлено. Процесс клубнеобразования изучали с использованием культуры столонов *in vitro*. В среднем, почти все трансгенные растения продемонстрировали более низкую способность образования столонов и микроклубней (в пересчете на 1 исходный эксплант), чем исходный сорт. Средняя масса микроклубня только в двух случаях превысила исходный сорт, в остальных – она была в два-три раза ниже. Показатель средней массы микроклубня также был выше только у двух линий, в остальных случаях – на уровне исходного сорта. Основным отличием полученных трансгенных растений оказалась их способность образовывать большее количество крупных микроклубней (40-60 мм) и снижать долю мелких (2-3 мм). Полученные предварительные результаты позволяют предположить, что встройка *Tms*-гена повлияла только на распределение микроклубней по размеру. Остальные параметры требуют дальнейшего изучения.

**ПОВЫШЕННАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА,
ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕН ПАНКРЕАТИЧЕСКОЙ РИБОНУКЛЕАЗЫ БЫКА
К ВИРУСУ ТАБАЧНОЙ МОЗАИКИ**

**Enhanced resistance of transgenic tobacco plants expressing bovine
pancreatic ribonuclease against tobacco mosaic virus**

E.A. Trifonova¹, M.V. Sapotsky², M.L. Komarova¹, A.V. Kochetov¹, V.I. Malinovsky²

¹ Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk

E-mail: *et@bionet.nsc.ru*

² Institute of Biology and Soil Science, Vladivostok

Viruses are responsible for considerable losses of crops. Recently, a variety of gene engineering approaches have been employed to generate virus-resistant plants. It has been shown that plants possess many various ribonuclease (RNase) activities. It was reported that RNase activity was higher in diseased plants. It was suggested that introduction of RNase-encoding genes could be used to protect plants against various pathogens. We have transformed tobacco (*Nicotiana tabacum* SR1) with the *Bos taurus* pancreatic ribonuclease gene and selected transformants with elevated levels of RNase activity in leaf extracts. Bovine RNase A is a non-toxic enzyme efficiently degrading single-stranded RNA. The enzyme is activated only after maturation (the deletion of N-end leader peptide during secretion), while the unmaturation form of the protein is inactive.

Intron-less gene coding for pancreatic ribonuclease was isolated from bovine genomic DNA by PCR and cloned in the PC27 vector under the control of mannopin synthase 2' promoter. This promoter is active in roots and leaves, and its activity is strongly induced locally by wounding. Ten kanamycin-resistant transformants were selected. These R0 plants were additionally checked for the presence of transgene by PCR. Analysis of crude leaf extracts identified 3 transformants with a high level of ribonuclease activity (10-14 times greater than non-transgenic control), 6 transformants with a low level (2-4 times greater than control), and 1 transformant with a medium level (7 times greater than control). Leaf extracts of the transgenic plants contained additional ribonuclease activities that electrophoretically indistinguishable from that of commercial bovine ribonuclease. Notably, the apoplast fraction of transgenic leaf extracts was characterized by a higher level of RNase activity in comparison with the apoplast fraction of non-transgenic leaf extracts (24 times greater than control for line 8): thus, bovine pancreatic ribonuclease was secreted from plant cells.

According to a segregation analysis of *nptII* marker, line 7 contained single T-DNA insertion (it was also verified by Southern blot hybridization with bovine pancreatic RNase gene used as a probe). This line was selected for further investigations and selfed to obtain R1 and R2 offsprings. Seeds from R1 plants 7-2, 7-3, 7-8 were found to be homozygous for kanamycin resistance. These R2 plants were checked for RNase activity levels (7.6 ± 0.07 for 7-2 plants, 8.0 ± 0.05 for 7-3 plants, 8.2 ± 0.07 for 7-8 plants), and were used to analyze the transgene influence on plant resistance to TMV. Under greenhouse conditions without any nutritional limitation, the expression of the transgene had no visible effect on plant growth and development.

Two R0 transgenic lines (8 and 10), homozygous R2 plants of line 7, and control plants were inoculated with different TMV concentrations. The occurrence of disease symptoms and the accumulation of the viral antigen (coat protein) were tested. Transgenic plants demonstrated either absence of disease symptoms or a significant delay in their appearance, depending on the virus concentration in the inocula and level of ribonuclease activity.

We found that the accumulation of viral antigen was significantly retarded in the inoculated leaves of the transgenic plants in comparison with the control plants ($p < 0.05$). Moreover, quantitative viral antigen accumulation negatively correlated with the level of ribonuclease activity. Similar results were obtained by the comparison of infectious virus contents in leaves of the transgenic and the control plants. In general, if the virus concentration in the inoculum was low or medium (0.01 - $0.1 \mu\text{g/ml}$), transgenic plants were characterized by the absence or considerable delay of virus accumulation and appearance of disease symptoms in comparison with the control plants. At higher TMV concentrations in inoculum ($10 \mu\text{g/ml}$), the differences between the control and transgenic plants were negligible in the later stages of infection (14-28 DAI).

Currently, the mechanisms of extracellular RNase antiviral effects are poorly known. It may be hypothesized that apoplastic RNases can degrade viral genomic RNAs during some stage of the infection process. The alternative hypothesis might be that ribonuclease molecules enter into plant cells together with viral RNA during inoculation process. In this case, ribonucleases could kill the cells before the viral replication occurs. If the initial quantity of transfected virus particles were large enough, TMV could overcome the nuclease "barrier" and penetrate into plant cells. To the best of our knowledge, this is the first example of the antiviral activity of the transgene-encoded extracellular RNase in plants. This work also supports earlier reports of the antiviral effect of exogenous ribonuclease application in extracellular space of plant leaves.

**ТРАНСФОРМАЦИЯ ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ РЕДИСА
(*RAPHANUS SATIVUS* L.) ОНКОГЕНАМИ Т-ДНК *AGROBACTERIUM
TUMEFACIENS* И *AGROBACTERIUM RHIZOGENES*:
СВЯЗЬ ОПУХОЛЕОБРАЗОВАНИЯ, ФИТОГОРМОНАЛЬНОГО БАЛАНСА
И ОСОБЕННОСТЕЙ РЕГЕНЕРАЦИИ С УРОВНЕМ ЭКСПРЕССИИ
ПЕРЕНЕСЕННЫХ ГЕНОВ**

**Transformation of radish (*Raphanus sativus* L.) inbred lines
by oncogenes from *Agrobacterium tumefaciens*
and *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA: tumor formation,
phytohormonal balance and regeneration peculiarities
of transgenic plants depending on the transgenes expression levels**

**Н.В. Фролова, А.В. Ганзен, М.А. Власенко, В.А. Монова, Е.Л. Ильина,
И.Е. Додуева, Л.А. Лутова**
Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург
E-mail: *Wildtype@yandex.ru*

Для изучения роли генов Т-ДНК *Agrobacterium tumefaciens* и *Agrobacterium rhizogenes* в опухолеобразовании у растений мы исследовали их влияние на опухолеобразование у инбредных линий редиса (*Raphanus sativus* var. *Radicula* Pers.). Среди высокоинбредных линий генетической коллекции редиса, которая поддерживается на кафедре генетики СПбГУ более 40 лет, существуют линии со спонтанным опухолеобразованием, которые используются в качестве модели для изучения механизмов системного контроля деления и дифференцировки клеток у растений. Мы трансформировали опухолеобразующие и безопухолевые линии редиса генами *ipt* *Agrobacterium tumefaciens*, а также *rolC* и *rolB* *Agrobacterium rhizogenes*. Значительная часть трансгенных растений демонстрировала различные фенотипические изменения, наиболее интересным из которых были изменения опухолевого фенотипа: опухолеобразование у безопухолевых линий и отсутствие опухолей у линий со 100 %-ным опухолеобразованием. Кроме того, для трансгенных растений редиса, несущих онкогены Т-ДНК агробактерий, было характерно изменение реакции эксплантов на цитокинины и ауксины *in vitro* и особенностей регенерации. Мы показали, что у трансгенных растений редиса изменено содержание эндогенных цитокининов и ауксинов в тканях: например, у растений, несущих ген *ipt*, наблюдался повышенный уровень свободного зеатина. Наиболее значительное изменение фитогормонального баланса по сравнению с родительскими линиями наблюдалось у трансгенных растений с измененным опухолевым фенотипом. С

помощью ОТ-ПЦР мы показали, что трансгенные растения редиса различаются по уровню экспрессии перенесенных генов, что можно объяснить вставками генов в разные районы генома, а также транскрипционным сайленсингом. Было показано, что опухолеобразующие трансгенные растения редиса характеризуются повышенным уровнем экспрессии генов Т-ДНК по сравнению с безопухолевыми. Также была обнаружена взаимосвязь между уровнем экспрессии генов Т-ДНК и особенностями регенерации *in vitro*: например, трансгенные растения, несущие гены *ipt* и *rolC*, отличаются повышенной чувствительностью к экзогенным цитокинам и интенсивным опухолеобразованием у молодых растений в ответ на цитокинины.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 05-04-48583, CRDF ST-012-0 и CRDF BP2M12.

НАСЛЕДОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ ТРАНСГЕНА *nptII* *IN VIVO* И *IN VITRO* У КУКУРУЗЫ

In vivo and *in vitro* Inheritance and Expression of the *nptII* Transgene in Maize

Е.В. Шапар, Е.С. Осипова, С.А. Данилова, Ю.И. Долгих
Институт физиологии растений им К.А. Тимирязева РАН, г. Москва
E-mail: gsc@ippras.ru

С момента успешного получения первых трансгенных растений прошло уже более 20 лет. В настоящее время разработано большое количество методов генетической трансформации растений, а сама трансформация давно уже стала рутинной процедурой в научных и коммерческих лабораториях по всему миру. Генетическая трансформация нашла широкое применение в создании новых форм сельскохозяйственно-ценных растений, обладающих выигрышными признаками в сравнении с исходными сортами, а также в фундаментальных исследованиях молекулярной биологии. Трансгенные организмы представляют собой уникальные модельные системы, на которых можно проследить как механизмы регуляции экспрессии генов, так и фенотипическое проявление отдельно взятых собственных или чужеродных генов. Несмотря на успешную интеграцию и стабильное наследование, экспрессия чужеродных генов в растениях часто оказывается нестабильной. Это зависит от природы гена (кодонных триплетов), количества копий вставки, гомологии последовательности собственным генам и от места вставки (эффект положения). Непредсказуемость уровня экспрессии трансгена усугубляется нежелательным влиянием

на геном культивирования растительных клеток *in vitro*, которое заключается в соматической изменчивости и накоплении необратимых генетических изменений. Это важный момент, так как на современном этапе развития генетической трансформации растения-трансформанты регенерируются из эксплантов *in vitro*. В связи с этим были поставлены следующие задачи:

- изучить характер наследования трансгена *in vitro* и *in vivo*;
- изучить характер экспрессии введенного гена у культивируемых объектов *in vitro* и у растений *in vivo*;
- сравнить характер наследования и экспрессии перенесенных генов *in vivo* и *in vitro*.

Анализ наследования и экспрессии проводился на примере гена *nptII*, обеспечивающего устойчивость растений к антибиотику канамицину.

Семенное потомство (Т2) от шести растений первого поколения после трансформации было введено в культуру *in vitro*. Каллусные клоны, производные от каждого семени, культивировали отдельно друг от друга на среде Мурасиге-Скуга с нитратом серебра для поддержания морфогенной способности каллуса. Через четыре месяца после введения зародышей в культуру *in vitro* был взят материал для ПЦР-анализа на наличие введенного гена. Всего проанализировано 306 клонов. ПЦР-анализ каллусных клонов показал, что ген наследуется *in vitro* согласно менделевскому закону моногибридного скрещивания.

Экспрессию гена *nptII* оценивали по чувствительности регенерантов, полученных из каллусных клонов, к антибиотику. На протяжении двух лет получаемые регенеранты тестировались на устойчивость к канамицину. От каждого клона было получено от 1 до 15 регенерантов (всего 1484 регенеранта). Устойчивые регенеранты оставались зелеными, неустойчивые становились белыми. Подавляющее большинство каллусных клонов одновременно давало белые и зеленые регенеранты и небольшое число только белые и только зеленые. ПЦР-анализ белых регенерантов, полученных из трансгенных клонов, показал, что в подавляющем числе случаев они содержали ген *nptII*, что свидетельствует о замолкании гена. Средняя частота замолкания гена *nptII in vitro*, рассчитанная как отношение числа трансгенных клонов, дающих белые регенеранты, к общему числу трансгенных клонов, составила 78 %.

Для сопоставления характеров наследования и экспрессии трансгена *in vivo* семена нескольких линий кукурузы (всего 141 растение) проращивались на канамицине, и наличие гена определяли методом ПЦР. У растений *in vivo* ген стабильно наследовался согласно менделевскому закону моногибридного скрещивания на протяжении трех поколений. Многие из трансгенных растений

оказывались чувствительными к канамицину и белели, что свидетельствует о замолкании гена *nptII in vivo*, частота которого рассчитывалась как отношение числа белых трансгенных растений к общему числу трансгенных растений, выраженное в процентах. Частота замолкания трансгена у растений *in vivo* увеличивалась в последующих поколениях, и в T2, соответствующем поколению, введенному в культуру *in vitro*, она составила 65 %. Сравнивая характер наследования и экспрессии трансгена *nptII in vivo* и *in vitro*, можно сделать выводы:

1. Ген *nptII* наследуется согласно закону моногибридного скрещивания *in vivo* и *in vitro*.

2. *In vivo* и *in vitro* наблюдается замолкание трансгена *nptII*. Частота замолкания трансгена *in vivo* увеличивается в последующих поколениях.

3. Частота замолкания гена *nptII in vitro* выше, чем *in vivo*.

РАЗРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МОДЕЛЕЙ С ЦЕЛЬЮ СОЗДАНИЯ УСТОЙЧИВЫХ ФОРМ РАСТЕНИЙ

The development of experimental models to create resistant plants

Х.Р. Шимшилашвили, Д.В. Сотченков, В.С. Фадеев, М.М. Бабыкин¹,
Р. Маали¹, Н.О. Юрьева², В.П. Пчелкин², В.Д. Цыдендамбаев²,
А.Г. Верещагин², А.Н. Дерябин², Т.И. Трунова², Д.А. Лось², А.М. Носов^{1, 2},
И.В. Голденкова-Павлова

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, г. Москва

E-mail: irengold@vigg.ru

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, г. Москва

² Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва

Для создания устойчивых форм растений используют стратегию, которая включает несколько этапов. Первоначально проводят поиск и отбор организмов, которые способны к росту и развитию в экстремальных условиях действия стрессовых факторов. Далее идентифицируют и клонируют гены, продукты которых обеспечивают такую устойчивость, с последующей экспрессией клонированных генов в модельные организмы и проверкой их на устойчивость к стрессам. Положительные результаты дают основание использовать эти гены для получения устойчивых к стрессам хозяйственно-важных культур. Основные трудности при использовании этой стратегии, в большинстве случаев, связаны с определением белкового продукта исследуемого гена или его функциональной активности, поскольку большинство продуктов клонированных генов либо не имеют ферментативной активности либо

их ферментативную активность можно определять, используя сложные методы исследования. Нами предложен новый подход для конструирования экспериментальных моделей с целью дальнейшего создания трансгенных растений, устойчивых к стрессовым факторам. Этот подход основан на конструировании гибридных генов, в которых целевой ген имеет трансляционное слияние с последовательностью репортерного гена, кодирующего термостабильную лихеназу. Данная репортерная система имеет несколько преимуществ. Прежде всего, она обеспечивает использование более простых и чувствительных методов для анализа экспрессии гибридного гена, что позволяет проводить быстрый отбор трансгенных организмов, определять уровень экспрессии гибридных генов и молекулярные массы белковых продуктов гибридных генов.

Были сконструированы гибридные гены, содержащие репортерный ген термостабильной лихеназы, и следующие целевые гены:

1) гены *sd2* и *sd2mod*, кодирующие защитные пептиды, которые обладают антибактериальной и антигрибной активностью;

2) ген *prq A*, который контролирует устойчивость к индукторам окислительного стресса и некоторым токсическим соединениям, включая гербициды;

3) гены *desC* и *desA*, которые кодируют десатуразы с различной субстратной специфичностью и участвуют в защите организмов при некоторых абиотических факторах, таких как осмотический стресс и низкие температуры.

Далее, была изучена экспрессия этих генов в клетках модельных организмов про- и эукариот.

Показано, что белки SD2 и SDmod в составе гибридных белков SD2-LicBM2 и SD2mod-LicBM2 оказывают такое же ингибирующее действие на рост грибов *Fusarium culmorum*, как нативный и модифицированный белки, а лихеназа сохраняет свои свойства – активность и термостабильность.

Показано, что экспрессия гибридного гена *prq A-lic BM3* в клетке *Synechocystis* обуславливала у них значимое повышение устойчивости к метилвиологену.

Продемонстрировано, что в составе гибридных белков DesC-LicBM2 и DesA-LicBM2 десатуразы (DesC и DesA) сохраняют способность катализировать введение двойной связи в соответствующие жирные кислоты у бактериальных трансформантов, при этом активность гибридных белков практически не отличается от активности белков в нативном состоянии. Следует отметить, что в составе гибридных белков DesC-LicBM2 и DesA-LicBM2 свои основные свойства (термостабильность и активность) сохранила лихеназа. Показано, что экспрессия в трансформантах растений кар-

тофеля нативного и гибридного гена $\Delta 12$ -десатуразы стимулирует биосинтез мембранных липидов и повышает уровень ненасыщенных ЖК. Полученные результаты свидетельствуют о том, что экспрессия $\Delta 12$ -десатуразы может приводить к повышению холодоустойчивости трансформантов картофеля.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ (06-04-81009-Бел_а, 05-04-49186-а).

**ОСОБЕННОСТИ РОСТА ПОБЕГОВ И КЛУБНЕОБРАЗОВАНИЯ *IN VITRO*
ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ,
ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕНЫ ЛИХЕНАЗЫ И СПИДРОИНА**

**Particularities of shoot growth and tuberization *in vitro*
in potato transgenic plants expressing lichenase and spideroic acid genes**

Н.О. Юрьева¹, Г.И. Соболева¹, И. Абдеева², И.В. Голденкова-Павлова²

¹ Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН, г. Москва
E-mail: yno@newmail.ru

² Институт общей генетики им. Н.И.Вавилова РАН, г. Москва

С использованием агробактериальных конструкций с разными вариантами целевого гена спидроина (белка паутины) репортерным геном лихеназы и маркерным *NPT* были получены популяции трансгенных растений картофеля сортов Жуковский Ранний и Юбилей Жукова. Анализ роста и развития трансгенных растений *in vitro* в сравнении с их исходной формой показал, что 30 % трансформантов сорта Жуковский Ранний в 1.5 раза ускорили рост корня, в то время как развитие надземного побега почти не отличалось от исходной формы. В популяции трансформантов сорта Юбилей Жукова более интенсивный рост корня (по сравнению с их исходной формой) наблюдали у 28 % линий, более интенсивное развитие побега – у 52 %, причем за счет увеличения числа междоузлий – 16 % линий. Способность завязывать клубни этими трансгенными растениями изучали в культуре столонов *in vitro*. В популяции трансгенных растений с. Жуковский Ранний наблюдали уменьшение числа индуцируемых столонов в расчете на исходный эксплант, число завязавшихся микроклубней на исходный эксплант было схожим с таковым у исходного сорта. В случае использования конструкции с 17 копиями гена спидроина, наблюдали ускорение завязывания и созревания микроклубней. Способность образовывать столоны у трансгенных растений сорта Юбилей Жукова практически не отличалась от исходной формы. Число клубней на исходный эксплант было ниже, чем у сорта, за

исключением случаев, где была использована конструкция с корнеспецифическим промотором. Скорость завязывания микроклубней и их созревание у 30 % изученных форм были почти в два раза выше, чем у исходного сорта. Результаты проведенных опытов показали, что встройка генов спидроина и лихеназы не оказала отрицательного влияния на основные параметры роста и развития растения картофеля.