

## БИОЛОГИЯ

УДК 633.52:577.21:632.162

Е. В. ГУЗЕНКО<sup>1</sup>, В. А. ЛЕМЕШ<sup>1</sup>, В. И. САКОВИЧ<sup>1</sup>, О. А. ОРЛОВСКАЯ<sup>1</sup>, Е. А. НИКОЛАЙЧИК<sup>2</sup>,  
О. К. ПРИСЯЖНЕНКО<sup>2</sup>, А. Н. ЕВТУШЕНКОВ<sup>2</sup>, академик Л. В. ХОТЫЛЕВА<sup>1</sup>

**АГРОБАКТЕРИАЛЬНАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ ЛЬНА-ДОЛГУНЦА  
ГЕНЕТИЧЕСКОЙ КОНСТРУКЦИЕЙ С ГЕНОМ *aroA*,  
НЕСУЩИМ УСТОЙЧИВОСТЬ К ГЕРБИЦИДУ ГЛИФОСАТУ**

<sup>1</sup>Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск

<sup>2</sup>Белорусский государственный университет, Минск

Поступило 08.09.2010

**Введение.** Почвенные и климатические условия Беларуси в целом благоприятны для выращивания льна-долгунца. Однако в последние годы в республике сложилась тревожная ситуация с засоренностью пашни, которая по многим культурам значительно превышает пороги вредности [1]. Лен-долгунец слабо конкурирует с сорняками как в первые фазы роста и развития, так и в фазе зеленой спелости, когда начинают опадать нижние листья и затененность почвы уменьшается. В таких условиях сорные растения бурно развиваются. Высокая засоренность приводит к дефициту света, влаги и питательных веществ, распространению болезней и вредителей, что значительно снижает урожай и ухудшает его качество. Так, поражение льна-долгунца льняной повиликой *Cuscuta epilinum* Wehс., широко распространенной в основных зонах льноводства, отрицательно сказывается на массе растений, длине и толщине стебля, содержании длинного волокна. При возрастании сорняков с 5 до 500 шт/м<sup>2</sup> урожайность льна уменьшается на 53 % [2].

В Беларуси производится и используется глифосатсодержащий гербицид «Белфосат». Однако опрыскивание растворами гербицидов негативно влияет на состояние посевов льна-долгунца. Увеличение листовой поверхности льна, угла наклона листьев по отношению к стеблю, уменьшение воскового слоя на них приводит к проникновению в растения большого количества раствора гербицида, следствием чего является искривление стеблей.

Обеспечение эффективной и экономически выгодной защиты сельскохозяйственных культур и увеличение их урожайности возможно с помощью технологий получения генетически модифицированных растений, что признано в мировом сообществе. Эксперты считают, что использование трансгенных сортов позволяет значительно снизить объем вносимых пестицидов и гербицидов, а также затраты на производство продукции и вредную нагрузку на окружающую среду. Генетически измененные растения с устойчивостью к различным классам гербицидов в настоящее время являются наиболее успешным биотехнологическим продуктом. Получены трансгенные растения сельскохозяйственных культур, устойчивые к динитроанилинам, фосфоротиоамидам, фенилкарбаматам и другим классам гербицидов. Единственная трансгенная линия льна масличного CDC Triffid на основе сорта Norlin, устойчивая к гербициду сульфонилмочевине, создана и зарегистрирована в Канаде. Получение трансгенных линий льна-долгунца остается трудно решаемой задачей. Из данных литературы известно лишь о создании первичных трансформантов льна-долгунца, содержащих ген устойчивости к гербицидам группы хлорсульфурина [3].

Цель исследования – получение трансгенных растений льна-долгунца, несущих ген устойчивости к глифосату.

**Материалы и методы исследования.** В качестве исходного материала использованы 4 сорта льна-долгунца белорусской селекции: Прамень, Нива, Василек, Старт.

**Агробактериальная трансформация.** Агробактериальную трансформацию проводили с использованием высоковирулентного штамма *Agrobacterium tumefaciens*, несущего генетическую конструкцию с геном *aroA* (определяет устойчивость к глифосатсодержащим гербицидам) под контролем 35S промотора вируса мозаики цветной капусты [4].

Культуру агробактерии наращивали в 20 мл жидкой среды LB, дополненной канамицином в концентрации 100 мг/л на качалке (200 об/мин) в течение 24 ч при 28 °С в темноте. Затем агробактериальную суспензию разбавляли в 3 раза жидкой безгормональной средой MS и инкубировали в тех же условиях в течение 2–3 ч. Полученную суспензию применяли для инфицирования гипокотильных эксплантов длиной 3–5 мм, которые прошли период предкультивации в течение 2 сут на агаризованной среде (MS5519, BAP 1 мг/л, NAA 0,05 мг/л, pH 5,8). Экспланты переносили в подготовленную бактериальную суспензию и выдерживали 1 ч, периодически перемешивая. Сокультивирование проводили в темноте в течение суток в условиях термальной комнаты (MS5519, BAP 1 мг/л, NAA 0,05 мг/л, pH 5,8). После этого экспланты отмывали от бактерий жидкой MS средой, подсушивали на фильтровальной бумаге и помещали на селективную среду (MS5519, BAP 1 мг/л, NAA 0,05 мг/л, канамицин 100 мг/л, цефотаксим 500 мг/л). После трех недель культивирования на селективной среде экспланты переносили на среду для морфогенеза и регенерации (MS5519, BAP 1 мг/л, NAA 0,05 мг/л, pH 5,8).

**Молекулярно-генетический анализ.** Для выделения тотальной ДНК из предположительно трансгенных побегов использовали комплект реагентов «ДНК-сорб-С» (Россия). Целевой ген *aroA* в используемой нами конструкции находится под контролем 35S промотора вируса мозаики цветной капусты, который можно идентифицировать с помощью праймеров к последовательности данного промотора. Для этой цели использована тест-система «АмплиСенс<sup>®</sup> ПЛАНТ-СКРИН». Амплификацию и последующий анализ первичных трансформантов проводили согласно инструкции к этой системе.

Для подтверждения интеграции маркерного гена в геном полученных регенерантов проводили ПЦР с праймерами к последовательности гена *nptII* (5'-CGACGTTGTCACCTGAAGCG-3' и 5'-AAGCAC-GAGGAAGCGGTCAG-3'). Размер амплифицируемого фрагмента 489 пн. Реакция проходила в амплификаторе BioRad при следующих условиях: шаг 1 – 2 мин при 94 °С; шаг 2 – 29 циклов, 30 сек при 94 °С, 1 мин при 56 °С и 1 мин при 72 °С; шаг 3 – 5 мин при 72 °С. Продукты ПЦР-реакции разделяли электрофорезом в 1,8 %-ном агарозном геле с добавлением этидиум бромид и документировали с помощью системы BioRad GelDoc2000. Размеры амплифицированных фрагментов определяли, используя в качестве маркера GeneRuler<sup>™</sup>100 bp (1000 bp) Plus DNA ladder (Fermentas).

**Результаты и их обсуждение.** Известно, что важной предпосылкой для успешной трансформации определенного вида растений является наличие высокоэффективной системы регенерации побегов в культуре *in vitro* [5]. На основании данных, полученных нами ранее о морфогенетическом потенциале и регенерационной способности сортов льна-долгунца, районированных в Беларуси, отобраны 4 сорта: Прамень, Нива, Василек, Старт, обладающие высоким регенерационным потенциалом в используемых условиях культивирования [6].

В качестве эксплантов для трансформации выбраны сегменты гипокотилей пятидневных проростков льна-долгунца длиной 3–5 мм, которые помещали на агаризованную среду MS–БН и предкультивировали в течение 48 ч. Наши наблюдения показали, что данный этап является обязательным при проведении агробактериальной трансформации льна-долгунца. В противном случае количество выживших эксплантов после проведения трансформации резко снижается, а в некоторых экспериментах погибают все экспланты.

Отбор трансформантов был основан на толерантности трансформированных клеток и тканей к селективным агентам за счет экспрессии в них гена *nptII*. Оптимальная концентрация селективного агента должна минимизировать процент регенерации нетрансформированных растений и максимально ограничивать его негативное влияние на органогенез. Чаще всего концентрация канамицина при селекции трансформированных гипокотилей льна-долгунца составляет 100 мг/л [7]. В наших экспериментах большинство гипокотильных сегментов, инокулированных бактериальной суспензией и помещенных на селективную среду ( $Km_{100}$ ), замедляли рост, экспланты желтели и засыхали. Однако у части эксплантов на срезах формировался и активно рос зеленый

каллус плотной консистенции, что позволило предполагать получение трансформированного каллуса. Аналогичным способом через стадию формирования каллуса проводили регенерацию трансформированных побегов как масличного льна [8], так и льна-долгунца [7].

Число выживших и образовавших каллус эксплантов варьировало от 5,6 до 22,8 % в зависимости от генотипа. Наибольшая морфогенетическая активность отмечена у сорта Прамень (таблица). После трех недель культивирования выжившие в селективных условиях экспланты переносили на среду МС–БН для регенерации побегов (таблица). Следует отметить, что каллусогенез не всегда сопровождался формированием почек и побегов. Так, в данных условиях культивирования не удалось получить побеги у каллусов сорта Нива, а каллусы сорта Василек сформировали всего два побега. Наибольшее число регенерантов получено у сорта Старт (таблица). Возможно, различие в морфогенетической реакции генотипов в ответ на стрессовые ситуации детерминировано балансом эндогенных гормонов.

#### Эффективность агробактериальной трансформации гипокотильных эксплантов льна-долгунца

Сорт	Число высаженных эксплантов, шт.	Число эксплантов, образовавших каллус, шт.	Выживаемость эксплантов, %	Число сформировавшихся побегов, шт.
Прамень	720	164	22,8	22
Нива	156	12	7,7	0
Василек	780	44	5,6	2
Старт	1320	178	13,5	28

При создании трансгенных растений весьма важным является выбор промотора для обеспечения достаточного уровня экспрессии чужеродного гена. В настоящее время для этих целей широко используется «сильный» конститутивный 35S промотор, выделенный из вируса мозаики цветной капусты. Этот промотор имеет в 110 раз большую эффективность, чем применявшийся ранее промотор нопалинсинтазы из Т-ДНК агробактерий. В использованной нами генетической конструкции целевой ген *aroA* также находится под контролем 35S промотора. Амплификация с праймерами к последовательности данного промотора четко определила трансгенный статус у 25 из 27 проанализированных нами первичных трансформантов. На рис. 1 приведена электрофореграмма результатов амплификации ДНК десяти первичных трансформантов. Образец 5 был исключен из дальнейшего анализа, так как ампликон соответствующего размера не был обнаружен.

Рост на селективной среде не является абсолютным подтверждением успешной вставки и работы соответствующего гена [8]. Поэтому был проведен молекулярно-генетический анализ с использованием праймеров к последовательности *nptII* гена. Электрофореграмма продуктов амплификации части образцов представлена на рис. 2.

Молекулярный анализ первичных трансформантов обнаружил встройки *nptII* гена у четырех образцов (1, 3, 6, 7). Как видно на рис. 1, 2, однозначного мнения о трансгенности образца 10 нет, так как ПЦР-анализ выявил лишь минорные фрагменты. В образцах 2, 4, 8, 9 встройки *nptII* гена

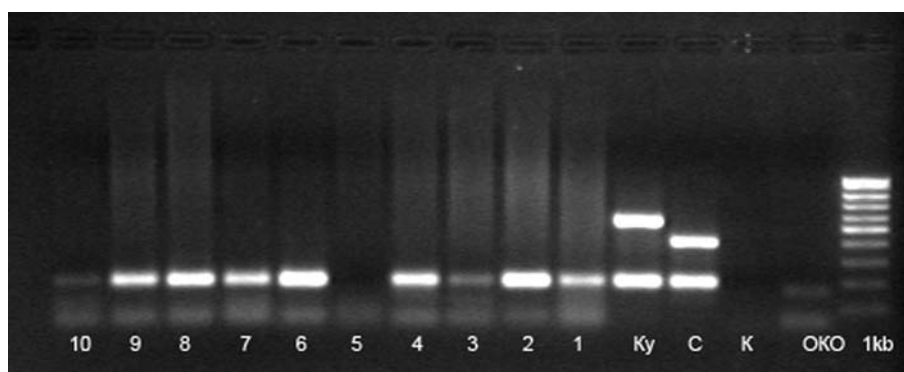


Рис. 1. Электрофореграмма амплификации с праймерами к 35S промотору: 1–10 – ДНК индивидуальных растений льна; Ку – ДНК трансгенной кукурузы MON 810; С – ДНК трансгенной сои 40-3-2; К – отрицательный контроль ПЦР; ОКО – отрицательный контроль выделения ДНК

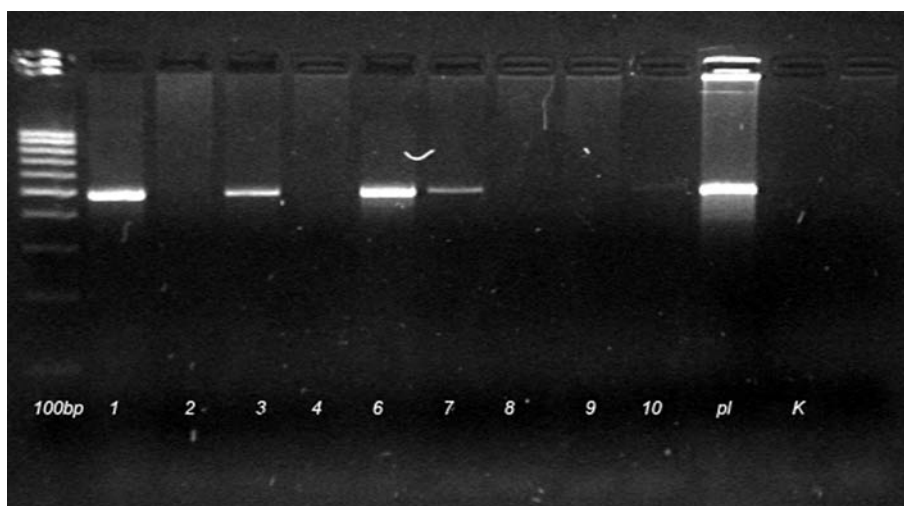


Рис. 2. Электрофореграмма амплификации с праймерами к гену *nptII*: 1–10 – ДНК индивидуальных растений льна; pl – плазмидная ДНК; К – отрицательный контроль

не обнаружено. Отбор ложных трансформантов, способных расти на средах с антибиотиком, мог произойти в связи с тем, что селективное давление в большинстве случаев негативно сказывается на регенерационной способности, поэтому приходится использовать невысокую концентрацию антибиотика, либо не использовать его совсем на определенных стадиях культивирования.

Таким образом, получены первичные трансформанты льна-долгунца, несущие ген *aroA* методом *Agrobacterium tumefaciens*-опосредованной генетической трансформации. Доказательством трансгенности 21 из 27 полученных регенерантов является перенос в растения селективного маркерного гена *nptII*, присутствие которого доказано как ростом каллусов и растений на среде с канамицином ( $Km_{100}$ ), так и молекулярно-генетическим анализом.

Показано, что эффективность инокуляции и последующая регенерация побегов льна-долгунца зависят от генотипа. Этап предкультивации гипокотильных эксплантов является обязательным при проведении агробактериальной трансформации льна-долгунца. В противном случае количество выживших эксплантов после проведения трансформации резко снижается. Также показано, что молекулярно-генетический анализ первичных трансформантов необходимо проводить комплексно, что позволит исключить ложноположительные результаты.

### Литература

1. Фирма «Август» [Электронный ресурс]. – Режим доступа: [www.firm-august.ru/newspaper](http://www.firm-august.ru/newspaper).
2. Воробьев С. А. и др. Земледелие. М., 1991.
3. Чиркизова О. Ф., Поляков А. В. // Сельхоз. биология. 1996. № 3. С. 117–121.
4. Картель Н. А., Кильчевский А. В. // Биотехнология в растениеводстве. Минск, 2005.
5. Slater A., Scott N. W., Fowler M. R. // Plant Biotechnology. The genetic manipulation of plants. Oxford, 2003.
6. Лемеш В. А., Богданова М. В., Гузенко Е. В., Хотылева Л. В. // Докл. НАН Беларуси. 2006. Т. 50, № 6. С. 89–91.
7. Поляков А. В., Чиркизова О. Ф., Каляева М. А. // Физиол. растений. 1998. Т. 45, № 6. С. 882–887.
8. Basiran N., Armitage P., Scott R. J., Draper G. // Plant Cell Rep. 1987. Vol. 6. P. 396–399.
9. Емец А. И., Баер О. А., Радчук В. В., Блюм Я. Б. // Генетика растений. 2009. Т. 45, № 10. С. 1377–1385.

GUZENKO E. V., LEMESH V. A., SAKOVICH V. I., ORLOVSKAYA O. A., NIKOLAICHIK E. A., PRISYAZHNENKO O. K., YEVTUSHENKOV A. N., KHOTYLEVA L. V.

E.Guzenko@igc.bas-net.by

### AGROBACTERIUM TRANSFORMATION OF LONG-FIBERED FLAX OF GENETIC CONSTRUCTION WITH THE *aroA* GENE PROVIDING RESISTANCE TO HERBICIDE GLYPHOSATE

### Summary

The article presents the results of fiber flax transformation by *Agrobacterium tumefaciens* plasmid containing the *aroA* gene, providing resistance to herbicide glyphosate, and the selective marker *nptII* gene, providing resistance to kanamicin. Transformant breeding was carried out on media containing kanamicin at a concentration of 100 mg/l. The precultivation stage was revealed to be required in conducting agrobacterial transformation of fiber flax. The transgenic origin of the obtained regenerants was verified by PCR using specific primers for both 35S promoter and *nptII* gene.