

**ФОМЕНКО Т.И., КУЗОВКОВА (ЛЕНЕЦ) А.А., БЕРДИЧЕВЕЦ Л.Г.,
РЕШЕТНИКОВ В.Н.**

ГНУ “Центральный ботанический сад НАН Беларуси”,
Беларусь, 220012, Минск, ул. Сурганова, 2В, e-mail: fioraia@nm.ru

ЭФФЕКТ РАЗНОУРОВНЕВОЙ ЭКСПРЕССИИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ β-1,4-ГЛЮКАНАЗЫ В ЛИСТОВЫХ ТКАНЯХ *NICOTIANA TABACUM* НА КАЛЛУСОГЕННУЮ АКТИВНОСТЬ И МОРФОГЕННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ

Благодаря использованию растений-мутантов и трансгенных растений, в последние 20 лет значительно продвинулось понимание механизмов различных физиологических процессов растений, например, фотосинтеза и индуцированной резистентности к патогенам [1]. Вместе с тем, на трансгенных растениях удобно исследовать и проблему влияния чужеродного гена как на генотип и фенотип растения в целом, так и на изменение экспрессии отдельных растительных генов. Подобные работы единичны и поэтому весьма актуальны. Трансгенные растения *Nicotiana tabacum*, экспрессирующие бактериальный ген *cel7*, явились удобной моделью не только для изучения механизмов устойчивости растений к грибам [2], но и влияния на трансген гетерологичного окружения. Целью наших исследований был анализ экспрессии бактериальной β-1,4-глюканазы в листовых тканях табака, а также оценка ее влияния на фитогормональный статус растения и, как следствие, на их каллусогенную активность и морфогенный потенциал. Каллусная ткань растений представляет собой совокупность недифференцированных клеток, которые в определенных условиях могут дать начало клонам дифференцированных клеток. Это означает, что клетки каллусной ткани являются носителями определенных эпигенетических изменений в геноме, отличных от таковых в дифференцированных клетках, и экспрессия трансгена в таких условиях может модифицироваться.

Материалы и методы

Объектами исследований являлись 3 линии трансгенных растений *Nicotiana tabacum*, экспрессирующие бактериальный модифицированный ген *cel7* из анаэробной грамположительной термофильной бактерии *Clostridium thermocellum*. Ген кодирует фермент β-1,4-эндоглюканазу. В растениях ре2 ген *cel7* контролируется слабым конститутивным промотором Tr2' гена нопаинсинтазы и сильным конститутивным промотором 35S вируса мозаики цветной капусты, а также последовательностью, кодирующей сигнальный пептид экстенсина моркови. В линии ре3 ген *cel7* обладает слабым конститутивным промотором Tr2' гена нопаинсинтазы и последовательностью, кодирующей сигнальный пептид экстенсина моркови. Растения ре4 несут ген *cel7* под слабым конститутивным промотором Tr2' гена нопаинсинтазы. Данные растения были получены к.б.н. Василевко В.Т. под руководством проф. Пирузян Э.С. на базе Института молекулярной генетики РАН (г. Москва) [2]. Растения *in vitro* выращивали на 1/2 среде Мурасиге — Скуга (МС) при температуре 22 °С, освещенности 4 тыс.лк. Световой день —

16 ч. Для анализов использовали листья 40-дневных растений. Каллусообразование из листовых эксплантов инициировали на средах МСА (1 мг/л ИУК и 0,1 мг/л БАП), МСВ (3 мг/л ИУК и 0,1 мг/л БАП) и RМКУ (1 мг/л α НУК, 1 мг/л кинетина), основу которых составляла среда МС. Активно растущие каллусы переносили на среду для индуцирования органогенеза — среда МС с 0,1 мг/л ИУК и вариациями БАП (2 мг/л — среда МС1, 1 мг/л БАП — среда МСII). Культивирование проводили в течение 4-х недель в термостате при 24,5 °С. Частоту регенерации оценивали каждую неделю. Экспрессию в растительных тканях бактериального гена *cel7* тестировали по уровню активности его белкового продукта методом выявления в полиакриламидном геле изоформ глюканаз по Schwarz et al. [3] с нашими модификациями.

Результаты и обсуждение

Наши наблюдения и проведенный анализ морфометрических параметров растений-рекомбинантов показали, что трансгенные растения отличались замедленным в сравнении с контролем ростом. Очевидно, что такие морфо-физиологические изменения были опосредованы активной экспрессией трансгена в геноме табака. Действительно, в листьях табака ре2 и ре3 обнаружены глюканазы, термостабильные при +80 °С и проявляющие максимальную активность при +60 °С, что характерно исключительно для термостабильного бактериального модифицированного фермента. При этом активность глюканазы на мг внесенного в гель белка в линии ре3 была существенно выше, чем у рекомбинантов ре2. Контрольные растения, а также линия ре4 не проявляли глюканазную активность при данных условиях тестирования даже при 20-кратном увеличении концентрации белка в пробе. Понятно, что контрольные растения табака не должны обладать бактериальной термостабильной глюканазной активностью, а растительные глюканазы при данной температуре полностью ингибируются. Одной из вероятных причин отсутствия в растениях линии ре4 активности β -1,4-глюканазы может быть замолкание трансгена. Данный феномен отмечен с конца 80-х — начала 90-х годов, при создании первых трансгенных растений. Позже было установлено, что феномен замолкания генов, хотя и может наследоваться при половом размножении и последующем развитии семени, является обратимым и может находиться под контролем факторов развития [4].

Известно [5], что продуктами гидролиза глюканаз являются олигосахарины, которые в концентрациях 10^{-6} М способны имитировать действие ауксинов, в частности, увеличивать активность целлюлаз, стимулировать растяжение клеточной стенки и удлинение растения, индуцировать ризогенез. Возможные изменения в эндогенном балансе трансгенных растений, экспрессирующих ген бактериальной β -1,4-глюканазы, нами были проанализированы с помощью физиологического теста. Листовые экспланты контрольных и 3-х линий рекомбинантов культивировали на среде МС, не содержащей гормонов. После 4 недель культивирования на листовых эксплантах всех типов растений наблюдалось образование корней. При этом, частота ризогенеза в контроле (66,7%) была в 2 раза выше, чем у линии ре2 (33,3%), и сравнима с таковой у линии ре4. В то же время линия ре3 харак-

теризовалась более интенсивной инициацией ризогенеза (на 73,3%), чем контроль. Полученные данные являются неоднозначными. Можно предположить, что у линии ре3, отличающейся самой высокой глюконазой активностью, эндогенный баланс несколько сдвинут в сторону ауксинов, и наблюдаемое усиленное корнеобразование может быть вызвано стимулирующим эффектом олигосахаридов, продуктов гидролиза бактериальной глюконазы. Линия ре2, по-видимому, обладает особым фитогормональным статусом, определяющим существенное снижение ризогенеза по сравнению с контролем и линией ре3, при том, что характеризуется довольно высокой бактериальной глюконазой активностью. Линия ре4, которая не проявляет бактериальной активности β -1,4-глюконазы, возможно, вследствие замолкания гена, имеет тот же фитогормональный фон, что и контрольные растения.

Обратимость замолкания трансгена была выявлена нами при анализе экспрессии трансгена *cel7* в дедифференцированной (каллусной) ткани, полученной из листовых дисков от растений линии ре4. В отличие от листовой ткани, в каллусах линии ре4 (при 20-кратном концентрировании белка) была обнаружена активность термостабильных бактериальных глюконаз. Следует отметить, что каллусная ткань линий ре2 и ре3 сохраняла данную активность. Что касается каллусогенной активности листовых эксплантов трансгенных растений при культивировании на разных селективных средах, то у линий ре3 и ре4 на средах RMKU и MCA она была сравнима с таковой контрольных, тогда как прирост каллусной массы на листовых дисках ре2 был достоверно ниже. Добавление в среду культивирования MCB 3 мг/л ИУК (против 1 мг/л ИУК в MCA и 1 мг/л α НУК RMKU) способствовало увеличению каллусогенной активности как в контрольном варианте, так и у линии ре3. В то же время у линий ре2 и ре4 наблюдалась более низкая, чем в контроле каллусогенная активность. Таким образом, особый фитогормональный статус рекомбинантов ре3 никак не сказался на их каллусогенной активности по отношению к контролю, даже при увеличении в 3 раза содержания ауксинов в среде. При этом линия ре2 при всех исследуемых концентрациях экзогенных ауксинов демонстрировала ингибирование инициации каллусообразования, что косвенно может говорить об очень низком содержании в клетках ре2 эндогенных ауксинов, который даже в купе с экзогенными фитогормонами был недостаточен для нормального каллусообразования. Линия ре4 с нестабильной экспрессией гена *cel7* характеризовалась такой же нестабильной каллусогенной активностью на средах с разной концентрацией ауксинов.

Интересно, что активность бактериальной глюконазы, индуцированная в трансформантах ре4 при каллусогенезе, сохранялась, но на низком уровне, и в редифференцированных клетках адвентивных побегов, образованных при переносе каллуса со среды RMKU на морфогенные среды MCI и MCI1. Адвентивные побеги ре2 и ре3 также проявляли данную активность. Что касается уровня морфогенного потенциала исследуемых трансгенных растений табака, то после недели культивирования во всех вариантах, включая контроль, наблюдалось нарастание каллусной массы без инициации побегообразования, что связано с накоплением в клетках ауксина при наращивании

кallуса. Через 2 недели культивирования на кallусных тканях контроля и трансформантов отмечена регенерация побегов, но частота регенерации была не одинаковой и зависела как от типа растения, так и от среды культивирования. Так, при культивировании кallусных тканей на среде МСI только у линии ре3 частота регенерации не отличалась от контрольного варианта и составляла 14,3%, тогда как у остальных линий трансгенных растений морфогенная активность была значительно выше (до 33,4%). Подобная зависимость наблюдалась и через 3 недели культивирования на фоне общего увеличения морфогенной активности.

Через 4 недели культивирования на среде МСI частота регенерации линии увеличилась до 95%, и у линий ре2 и ре3 она была выше, а у линии ре4 ниже, чем в контроле. Данный факт подтверждает особый фитогормональный статус трансгенных растений табака. Об этом факте говорит и изменение морфогенной активности кallусных тканей трансформантов при увеличении в среде культивирования концентрации БАП до 2 мг/л. Увеличение содержания в среде экзогенного цитокинина повлияло на морфогенную активность как контрольного, так и трансгенных растений табака, экспрессирующих ген бактериальной β -1,4-глюканазы. Частота регенерации в контроле через 2 недели культивирования на среде МСII была в 1,5 раза выше, чем на среде МСI. У трансформантов наблюдали обратную зависимость. Морфогенная активность у линии ре2 в течение всего периода культивирования на среде МСII была ниже, чем на среде МСI. У линии ре4 на начальном этапе культивирования частота регенерации на среде МСII была выше, чем на среде МСI, и выше, чем в контроле, но через 4 недели культивирования наблюдалась обратная зависимость. Морфогенная активность кallусной ткани линии ре3 на среде МСII через две недели культивирования была ниже, чем на среде МСI. При дальнейшем культивировании на среде МСII частота регенерации у этой линии постепенно увеличивалась и достигала 100%, как и в контрольном варианте. Таким образом, на среде с более высоким содержанием цитокинина у всех исследуемых трансформантов отмечена общая тенденция снижения морфогенной активности кallусов.

Выводы

В ходе тестирования активности бактериального гена *cel7* в гетерологичном окружении обнаружен феномен эпигенетической регуляции экспрессии трансгена в одной из линий трансгенных растений табака, в линии ре4. Какие именно эпигенетические изменения произошли сначала в геноме листовых, а потом кallусных клеток табака, мы можем только предполагать. Возможно, репрессия гена *cel7* в растениях табака обусловлена присутствием множественных копий трансгена и гомологичных ему последовательностей в растительных генах, которые могут взаимодействовать между собой, образуя гибридную ДНК, и таким образом корепрессировать друг друга. Другой способ репрессии генов определяется хроматиновым состоянием генных локусов, в которые встраивается трансген, и их позиции в хромосоме и/или ядре. В этом огромная роль принадлежит процессам модификации гистонов. Существует и пост-транскрипционная репрессия генов [6].

Разноуровневая экспрессия бактериальной β -1,4-глюканазы в листовых тканях табака сказалась на фитогормональном статусе этих тканей и далее, как следствие, отразилась на их каллусогенной активности и морфогенном потенциале. Особым фитогормональным фоном обладают все исследуемые линии трансформантов. У линии ре3 фитогормональный баланс сдвинут в ауксиновую сторону, что объясняет усиленное корнеобразование у этих растений. При этом каллусогенная активность не отличалась от контрольной. Измененный фитогормональный статус трансформантов ре2 (вероятно, с низким содержанием эндогенных ауксинов) привел к ингибированию ризогенеза и каллусообразования. Линия ре4 с нестабильной экспрессией гена *cel7* характеризовалась такой же нестабильной каллусогенной активностью на средах с разной концентрацией ауксинов и уровнем ризогенеза, характерным для контроля. Частота регенерации адвентивных побегов на каллусных тканях трансформантов на морфогенных средах была не одинаковой и зависела как от типа растения, так и от среды культивирования. Морфогенная активность линии ре3 на среде с 1 мг/л цитокинина была сравнима с контролем, а линий ре2 и ре4 значительно выше. Увеличение содержания в среде экзогенного цитокинина повлияло на морфогенную активность растений, увеличив частоту регенерации в контроле и уменьшив — в трансгенных растениях.

Литература

1. Бурьянов Я.И. Успехи и перспективы генно-инженерной биотехнологии растений // Физиология растений.— 1999.— Т.46, №6.— С. 930–944.
2. Василевко В.Т. Модель переноса гена бактериальной полиглюкангидролазы (β -1,4-глюканаза) в растения табака как способ защиты растений от фитопатогенов / Диссерт. на соискан. уч. степ. канд. био. наук.— Минск.— 2002.— 84 с.
3. Schwarz W.H., Bronnenmeier K., Grabnitz F., Staudenbauer W.L. Activity staining of cellulases in polyacrylamide gels containing mixed linkage β -glucans // Analytical biochemistry.— 1987.— V.164.— P. 72–77.
4. Flavell R.B. Inactivation of gene expression in plants as a consequence of specific sequence duplication // PNAS USA.— 1994.— V.91.— P. 3490–3496.
5. Fry S.C. Cellulases, hemicelluloses and auxin-stimulated growth: a possible relationship // Physiol.Plantar.— 1989.— V. 75.— P. 532–536.
6. Назаренко С.А. Эпигенетическая регуляция активности генов и ее эволюция // Из книги: Эволюционная биология. Материалы II Международной конференции “Проблема вида и видообразование”.— Томск: Томский государственный университет.— 2002.— Т.2.— С. 82–93.

Резюме

Исследовано влияние гетерологичного окружения на экспрессию в растениях трансгена, кодирующего бактериальную β -1,4-глюканазу. Дана оценка каллусогенной активности и морфогенного потенциал листовых тканей табака с измененным фитогормональным статусом.

The influence of heterological environment on the expression of the transgene coding bacterial β -1,4-gluconase in plants is investigated. The estimation of callusogenic activity and morphogenic potential of tobacco leaf tissues with the changed phytohormonal status is given.

**ЧМЕЛЕВА С.И., ТЕПЛИЦКАЯ Л.М., ЮРКОВА И.Н., ПАНОВ Д.А.,
БУГАРА И.А., ОМЕЛЬЧЕНКО А.В., ТАЙКОВА В.П.**

*Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского,
Украина, 95007, Симферополь, проспект Академика Вернадского, 4,
e-mail: nanosilver@rambler.ru*

ПОЛУЧЕНИЕ И ОПТИМИЗАЦИЯ КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ И ИХ БИОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Высшие растения синтезируют широкий спектр биологически активных вторичных метаболитов. Значительную часть продуктов вторичного метаболизма, имеющих фармакологическую ценность, получают из дикорастущего лекарственного сырья или интродуцированных растений [1, 2]. Традиционный подход требует значительных земельных ресурсов и затрат на выращивание, переработку сырья, является недостаточно эффективным. Одним из приоритетных направлений в настоящее время является разработка биотехнологических основ получения клеточных культур лекарственных растений, которые могут служить в качестве сырья, содержащего фармакологически ценные вторичные метаболиты (гликозиды, фенольные соединения, алкалоиды, сантонины). Исследования по получению клеточных культур — продуцентов вторичных метаболитов проводятся во многих странах мира. В Украине такие технологии разрабатываются на уровне лабораторных и, частично, промышленных регламентов.

Целью исследований является: оптимизация условий получения клеточных культур лекарственных растений и выявление закономерностей накопления в них ценных продуктов фармакологического назначения.

Материал и методы

Материалом исследования были ткани и органы следующих видов: Гинкго двулопастный — *Ginkgo biloba* L., Тисс ягодный — *Taxus baccata* L., Олеандр обыкновенный — *Nerium oleander* L.

В качестве эксплантов были взяты сегменты вегетативных органов (листовой пластинки, черешки, побеги в зоне прикрепления листьев, изолированные семязпочки).

При выполнении работы использовали методы, общепринятые в исследованиях по культуре изолированных тканей растений [3, 4].

Для культивирования эксплантов применялись модифицированные по содержанию фитогормонов (2,4-Д, ИУК, НУК, БАП) питательные среды Мурасиге и Скуга, Гамборга. Экспланты культивировали при освещенности 4–5 тыс. люкс, температуре 20–24 °С и относительной влажности воздуха 60–70%. Частоту каллусообразования оценивали по количеству эксплантов, давших каллус, от общего числа эксплантированных. Полученный каллус субкультивировали на модифицированные питательные среды Мурасиге и Скуга (МС) и Гамборга, дополненные 2,4-Д — 2,0 и 2,5 мг/л, БАП — 0,3 и 0,4 мг/л.