

Представлены результаты по агробактериальной трансформации растений льна-долгунца *L. usitatissimum* сорта Могилевский 2, который характеризуется высоким эмбриогенным потенциалом, геном устойчивости к динитроанилиновым гербицидам. Молекулярно-генетический анализ подтвердил наличие и экспрессию мутантного гена α -тубулина в трансгенных линиях льна.

Data on *Agrobacterium*-mediated transformation of flax *L. usitatissimum* cultivar Mogilevsky 2 with high embryogenic potential by dinitroaniline herbicide resistant gene are presented. Molecular genetic analysis confirmed presence and expression of mutant α -tubulin gene in transgenic flax line.

БАЕР Г.Я.¹, БАЕР О.А.¹, ШИША Е. Н.¹, ЛЕМЕШ В.А.², КАРТЕЛЬ Н.А.², ЕМЕЦ А.И.¹, БЛЮМ Я.Б.¹

¹*Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Украина, 03680, Киев, ул. акад. Заболотного, 148, e-mail: galinabayer@univ.kiev.ua*

²*Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Беларусь, 220072, Минск, ул. Академическая, 27*

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ МИКРОТРУБОЧЕК В КЛЕТКАХ ЛЬНА-ДОЛГУНЦА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ХИМЕРНОГО ГЕНА GFP- TUA6

Лен-долгунец является одной из древнейших технических культур, успешно выращиваемой в мире, и, в частности, в Украине. Основную ценность льна-долгунца составляет стебель, где содержится 20-30 % волокна. Известно, что из тонких стеблей льна получают волокно более высокого качества, однако такие растения, как правило, характеризуются сниженной устойчивостью к полеганию. Льняное волокно также называют лигноцеллюлозным, поскольку оно состоит в основном из целлюлозных фибрилл (70 %), а также гемицеллюлозы, пектина и лигнина. Считают, что целлюлозные микрофибриллы являются основным механическим элементом клеточной стенки и их ориентация зависит от ориентации кортикальных микротрубочек клеток (Baskin 2001; Baskin 2005). В ряде работ показано, что нарушения нативной организации микротрубочек (Whittington et al., 2001; Baskin 2004) или отложения целлюлозных микрофибрилл (Sugimoto et al., 2001; Williamson et al., 2001) после обработки химическими веществами, а также вследствие генетических мутаций, приводят к изменению нормального роста клеток и появлению аномального фенотипа у растений. С помощью методов иммунофлуоресцентной микроскопии ранее было установлено, что ориентация отложения целлюлозных фибрилл при формировании клеточной стенки всегда происходит параллельно направлению кортикальных микротрубочек в клетке (Giddings & Staehelin, 1991). Для более детального изучения роли микротрубочек в процессах формирования и отложения целлюлозных фибрилл в клеточной стенке, а также особенностей организации кортикальных микротрубочек в клетках сортов льна-долгунца, характеризующихся различной устойчивостью к полеганию, было решено провести трансформацию льна химерным геном тубулина, слитым с репортерным геном GFP (green fluorescent protein). Успешная экспрессия GFP-меченого тубулина в клетках трансформантов, детектируемая с помощью конфокальной микроскопии, позволила бы глубже изучить особенности организации микротрубочек в живых клетках этих линий.

Поэтому целью нашей работы являлась агробактериальная трансформация генотипов льна с разной устойчивостью к полеганию, районированных на территории

Украины и Беларуси, с использованием конструкции, несущей химерный ген GFP-TUA6 для прижизненной визуализации микротрубочек.

Материалы и методы

В работе использовали сегменты гипокотилей асептически выращенных растений льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.) ряда генотипов, районированных на территории Украины и Беларуси: Глазур, Могилевский 2, Светоч, Зоря 87, Рушничок, Украинский 3, Свитанок, Томский 16 (семена предоставлены Институтом лубяных культур УААН), Вита, Весна, Дашковский, Нива (предоставленные Институтом цитологии и генетики НАН Беларуси). Стерилизацию и проращивание семян осуществляли по раннее разработанной нами методике (Баер и др., 2004). Среда для регенерации растений содержала макро- и микроэлементы МС (Murashige and Skoog, 1962), 300 мг/л мезо-инозитола, 400 мг/л МЕС, 18 мг/л сахарозы, 0,8 %-ный агар, pH 5,8. Для изучения влияния фотогормонального баланса на эффективность регенерации льна использовали шесть вариантов сред, содержащих БАП (1-3 мг/л) в комбинации с НУК (0,01 и 0,05 мг/л). Культуры инкубировали при температуре 22-24°C и 16-часовом фотопериоде.

В экспериментах по трансформации использовали супервирулентный штамм *Agrobacterium tumefaciens* [LBA 4404 (pBI121)], Т-ДНК которой содержала химерный ген GFP-TUA6 под контролем 35S промотора вируса цветной мозаики капусты. В качестве селективного маркерного гена конструкция содержала *nptII* ген, который обеспечивает устойчивость к канамицину (Ueda et al., 1999). Конструкция была любезно предоставлена Dr. T. Hashimoto (Nara Institute of Science and Technology, Japan).

Трансформацию растений льна проводили, используя ночную культуру агробактерии, которую выращивали на среде LB с добавлением 100 мг/л канамицина. Бактерию выращивали при температуре +28°C при постоянном качании на орбитальном шейкере. По истечении времени наращивания культуру агробактерии очищали осаждением на центрифуге со скоростью 1000 об/мин. Супернатант удаляли, осадок перед инокуляцией разбавляли жидкой средой МС до достижения оптической плотности $OD_{600} = 0,4$. В качестве эксплантов для трансформации использовали гипокотили пятнадцатидневных проростков льна-долгунца размером 2-3 мм. Трансформацию и кокультивирование с агробактерией проводили согласно методу, описанному ранее (Дрейпер и др., 1991). Селекцию трансформантов проводили на среде для регенерации с добавлением 100 мг/л канамицина, а также цефотаксима в концентрации 200 мг/л для ингибирования развития агробактерии. Для укоренения побеги переносили на безгормональную среду МС (Murashige and Skoog, 1962).

Инкорпорацию меченого GFP тубулина в микротрубочки клеток трансгенных линий льна визуализировали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 510 META (Carl Zeiss, Германия).

Полученные трансгенные растения также анализировали с помощью ПЦР с использованием праймеров к последовательности 35S-промотора CaMV, а именно 5'-GCTCCTACAAATGCCATCA-3' и 5'-GATAGTGGGATTGTGCGTCA-3'. Растительную ДНК выделяли с помощью Plant DNA Isolation Kit (Sigma, Германия). В состав реакционной смеси для ПЦР входило 500 нг геномной ДНК, 0,1 U Taq-ДНК полимеразы (Репликон, Россия), 5× буфер (Репликон, Россия), 0,2 мМ каждого dNTP (Sigma, Германия) и праймеры в концентрации 1,0 мкМ. Реакцию проводили на амплификаторе PCR Apply Biosystem 2720 (США) при следующих условиях: первичная денатурация 4 мин при 94°C; далее 25 циклов 1 мин - 56°C, 1 мин - 94°C, 1,5 мин - 72°C, конечная элонгация 7 мин - 72°C. Полученные продукты реакции впоследствии разделяли в 1 %-ном агарозном геле.

Результаты и обсуждение

Для изучения роли микротрубочек в формировании клеточной стенки использовали генотипы льна-долгунца, которые отличались различной устойчивостью к

полеганию, а именно, сорта: Глазур, Зоря 87, Томский 16, Вита, Нива - устойчивые к полеганию, Могилевский 2, Рушничок, Свитанок, Вручий - со средней устойчивостью, сорта Светоч, Весна и Дашковский – неустойчивые к полеганию. Для создания успешной системы трансформации растений необходимо было подобрать условия для эффективной регенерации растений *in vitro*. Известно, что регенерационный потенциал культуры клеток или органов проявляет генотипическую зависимость, что достаточно сильно выражено у льна (Баер и др., 2004). Поэтому для сортов, используемых в работе, был проведен анализ по подбору оптимальных сред для введения в культуру и регенерации растений из разных типов эксплантов. Было установлено, что для всех сортов оптимальной была среда, содержащая 1-2 мг/л БАП и 0,05 мг/л НУК, тогда как повышение концентрации цитокинина до 3 мг/л существенно снижало количество регенерировавших побегов.

В качестве эксплантов для агробактериальной трансформации были использованы сегменты гипокотилей, поскольку они являются наиболее подходящим материалом для регенерации растений (Поляков и др., 1998; Dong & McHughen, 1993). Через 8-10 дней после трансформации гипокотилей льна наблюдали формирование зеленых каллусов на среде с канамицином. Спустя две недели после трансформации каллусы увеличивались в размере в 2,5-3 раза и достигали 0,5-1 см в диаметре. Несмотря на то, что большинство эксплантов продуцировали зеленый каллус на селективной среде, лишь на немногих из них наблюдали образование почек и побегов спустя три недели после трансформации. Большая часть эксплантов со временем становилась белой или бледно-зеленой и погибала, другая часть оставалась зеленой, способной к дальнейшему росту.

Поскольку рост на селективной среде является лишь опосредованным доказательством трансгенной природы полученных линий, нами был проведен молекулярно-биологический анализ отселектированных образцов с помощью ПЦР на наличие последовательности 35S-промотора CaMV. При амплификации с использованием специфических праймеров были получены фрагменты, соответствующие позитивному контролю (конструкции pVI121), тогда как при анализе ДНК контрольных растений, специфических фрагментов не наблюдали.

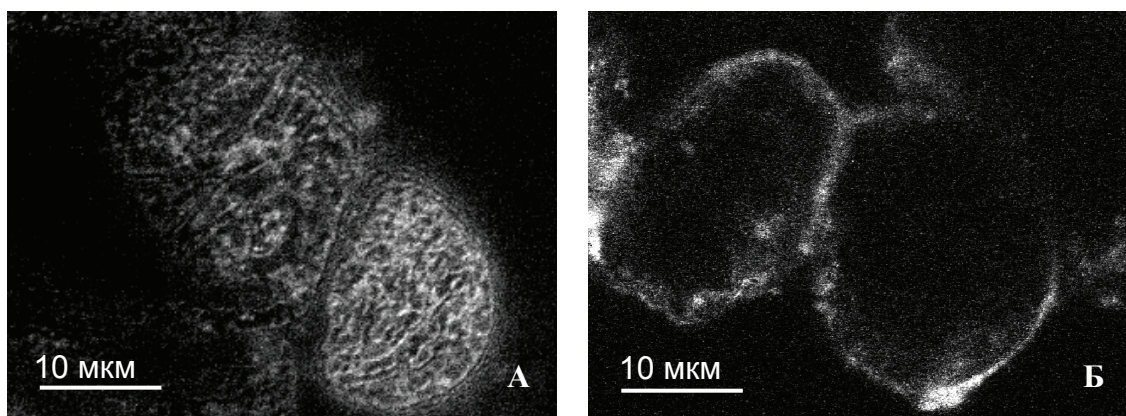


Рис.1. Визуализация микротрубочек в трансформированных клетках льна-долгунца сорта Глазур (А), Б – нетрансформированный контроль.

Визуализацию GFP-меченого тубулина в живых клетках отобрали трансгенных линий льна генотипов Глазур, Вита, Рушничок, Весна, Вручий осуществляли с помощью лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. Как изображено на Рис. 1 химерный ген GFP-TUA6 успешно экспрессировался, кополимеризировался с эндогенным тубулином и участвовал в построении кортикальный микротрубочек в клетках трансформантов льна-долгунца (Рис.1). Ранее было также показано, что GFP-TUA6 успешно инкорпорируется в микротрубочки растительных клеток без видимого влияния на их организацию и динамику (Abe & Hashimoto, 2005;

Ueda et al., 1999; Vassileva et al., 2005). Более того, было продемонстрировано, что данный химерный ген способен экспрессироваться в разных типах тканей трансгенных растений (Ishida et al., 2007; Ueda et al., 1999).

Выводы

Результаты проведенных экспериментов демонстрируют успешную трансформацию генотипов льна-долгунца, характеризующихся различной устойчивостью к пролеганию, химерным геном GFP-TUA6. Экспрессия перенесенного гена в клетках трансформантов позволяет изучать особенности организации микротрубочек в клетках, что является огромным потенциалом для установления роли данной структуры в формировании механической устойчивости к полеганию у этих растений.

Работа была выполнена при поддержке Фонда фундаментальных исследований Украины, грант № 14.4/023 (2007-2008 р.р.).

Литература

Альбертс Б., Брей Д., Льюис Дж. Молекулярная биология клетки.- Мир.-1994-Т 3.- 504 с.

Баер О.А., Баер Г.Я., Емец А.И., Блюм Я.Б. Введение в культуру *in vitro* и регенерационная способность сортов льна-долгунца с различной устойчивостью к полеганию // Физиол. биохим. культ. растений. – 2004. - Т. 36, № 1. – С. 48-54.

Дрейпер Дж., Скотт Р., Армидж Ф., Уолден Р. / Генная инженерия растений. Лабораторное руководство.– М.: Мир, 1991. – 408 с.

Поляков А.В., Чиркизова О.Ф., Каляева М.А., Захарченко Н.С., Балохина Н.В., Бурьянов Я.И. Трансформация растений льна-долгунца // Физиол. растений. – 1998. – Т. 45, № 6. – С. 882-887.

Abe T., Hashimoto T. Altered microtubule dynamics by expression of modified α -tubulin protein causes right-handed helical growth in transgenic *Arabidopsis* plants // Plant J.- V. 43.- P.191-204.

Baskin T. I., Beemster G.T., Judy-March J.E., Marda F. Disorganization of cortical microtubules stimulates tangential expansion and reduces the uniformity of cellulose microfibril alignment among cells in the root of *Arabidopsis* // Plant Physiol.- 2004.-V. 135.- P. 2279-2290.

Baskin T. I. Anisotropic expansion of the plant cell wall // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. – 2005. – V. 21.-P.203-222

Baskin T. I. On the alignment of cellulose microfibrils by cortical microtubules: a review and a model // Protoplasma.-2001. – V. 215. – P. 150-171.

Dong J.Z., McHughen A. Transgenic flax plants from *Agrobacterium tumefaciens* transformation – incidence of chimeric regenerants and inheritance of transgenic plants // Plant Sci. – 1993. – V. 91. – P. 139-148.

Giddings, T.H. and Staehelin, L.A. Microtubule-mediated control of microfibril deposition: a re-examination of the hypothesis // In The Cytoskeletal Basis of Plant Growth and Form. Edited by Lloyd, C.M. Academic Press, London. – 1991. – P. 85–99.

Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – V. 15. – P. 473-497.

Sugimoto, K., Williamson, R.E. and Wasteneys, G.O. Wall architecture in the cellulose-deficient *rsw1* mutant of *Arabidopsis thaliana*: microfibrils but not microtubules lose their transverse alignment before microfibrils become unrecognizable in the mitotic and elongation zones of roots // Protoplasma. – 2001.- V.215.- P. 172–183.

Ueda K., Matsuyama T., Hashimoto T. Visualisation of microtubules in living cells of transgenic *Arabidopsis thaliana* L. // Protoplasma.-1999.- V.206-P. 201-206.

Vassileva V.N., Kouchi H., Ridge R.W. Microtubule dynamics in living root hairs: transient slowing by lipochitin oligosaccharide nodulation signals // The Plant Cell.-2005.- 17.-P. 1777-1787

Whittington, A.T., Vugrek, O., Wei, K.J., Hasenbein, N.G., Sugimoto, K., Rashbrooke, M.C. and Wasteneys, G.O. MOR1 is essential for organizing cortical microtubules in plants // Nature. -2001. – V.411. – P. 610–613.

Williamson, R.E., Burn, J.E., Baskin, T.I., Arioli, T., Cork, A. Morphology of rsw1, a cellulose-Arabidopsis thaliana // Protoplasma. – 2001. – V. 215. – P. 116–127.

Резюме

Представлені результати по агробактеріальній трансформації різних сортів льону-довгунця з використанням конструкції, що містить химерний ген GFP-TUA6. Трансгенна природа отриманих ліній була підтверджена за допомогою ПЛР-аналізу. Показано, що GFP-мічений тубулін здатен успішно ко-полімеризуватися з ендогенним тубуліном і приймати участь у формуванні кортикальної сітки мікротрубочок в клітинах трансгенних ліній льону.

Представлены результаты по агробактериальной трансформации разных сортов льна-долгунца с использованием конструкции, несущей химерный ген GFP-TUA6. Трансгенная природа полученных линий была подтверждена с помощью ПЦР-анализа. Показано, что GFP-меченый тубулин успешно ко-полимеризуется с эндогенным тубулином и принимает участие в формировании кортикальной сетки микротрубочек в клетках трансгенных линий льна.

The results of *Agrobacterium*-mediated transformation of different flax cultivars by plasmid carrying chimeric GFP-TUA6 gene are presented in this study. Transgenic nature of obtained lines was confirmed by PCR analysis. It was shown that GFP labeled tubulin is capable to co-polymerize with endogenous cell tubulin and to participate in cortical microtubule network organization in transgenic flax cells.

ГОЛОВНЕВА Н.А.¹, ЩЕТКО В.А.¹, НАЙДЕНКО И.А.¹, ДЕНИСЕНКО В.В.¹, РЯБАЯ Н.Е.¹, КРАСОЧКО П.А.², ЛОМАКО Ю.В.²

¹Институт микробиологии НАН Беларуси, Беларусь, 220141, Минск, ул. Акад. Купревича, 2, e-mail: vental@yandex.ru

²РНИДУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелеского», Беларусь, 220003, Минск, ул. Брикета, 28, e-mail: bievmt@tut.by

ИЗУЧЕНИЕ АНТАГОНИСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ БИФИДО- И МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ В ОТНОШЕНИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ МОЛОДНЯКА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Актуальным направлением развития современной биотехнологии является разработка и применение в ветеринарной практике и медицине бактериальных препаратов-пробиотиков на основе микроорганизмов нормофлоры человека и животных, наиболее значимыми компонентами которой являются бифидо- и лактобактерии. Востребованность таких препаратов в настоящее время особенно возросла в связи с развитием множественной лекарственной резистентности и усилением факторов патогенности возбудителей различных заболеваний [1].

Антагонистическая активность нормофлоры по отношению к патогенным и условно патогенным бактериям является одним из основных критериев отбора штаммов бактерий для включения в состав пробиотических препаратов. Антимикробные взаимодействия оказывают влияние как на структуру микробиоценоза, т.е. на состав и разнообразие видов бактерий, так и на их функционирование. Изучение антагонистических свойств лакто- и бифидобактерий важно для характеристики