

0721711-1

На правах рукописи

КАЛЯЕВА Марина Александровна

**РАЗРАБОТКА ЭФФЕКТИВНОЙ СИСТЕМЫ
ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ
ЛЬНА-ДОЛГУНЦА (*Linum usitatissimum* L.) И
ДИКОРАСТУЩИХ ВИДОВ РОДА *Linum***

**Специальность 03.00.12 - физиология и
биохимия растений**

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Пушино - 2001

Работа выполнена в лаборатории биотехнологии растений Филiales
Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А.
Овчинникова РАН

Научный руководитель: доктор биологических наук,
профессор Я.И. Бурьянов

Официальные оппоненты:

НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА
КФУ



доктор биологических наук,
профессор А.К. Романова
кандидат биологических наук
В.В. Кочетков

Ведущая организация: Институт физиологии растений
им. К.А. Тимирязева РАН,
г. Москва

Защита диссертации состоится "13" июня 2001 г.
в 10 час. на заседании диссертационного совета Д 002.066.01
по присуждению ученой степени кандидата биологических наук при
Институте Фундаментальных Проблем Биологии РАН
по адресу: 142290, г. Пущино, Московской обл.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института
Фундаментальных Проблем Биологии РАН.

Автореферат разослан 12 " июня 2001 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Г.Н. Назарова'.

Г.Н. Назарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Перспективными современными методами являются генетическая и клеточная инженерия, позволяющие вводить в геном растения гетерологичные гены, выделенные из представителей других таксонов животного и растительных царств или синтезированные химическим путем. Эти методы, в частности, делают возможным создание растений льна-долгунца, устойчивых к гербицидам, насекомым-вредителям и болезням, вызывающим существенную потерю урожая и снижающим качество семян и волокна.

Известны единичные работы по разработке регенерации льна-долгунца четырех отечественных сортов с подбором питательных сред для эффективной регенерации побегов из эксплантов различного типа (Поляков с соавт., 1991). Получены трансгенные каллусы и побеги льна-долгунца, содержащие маркерный ген *nptII* (Чикризова, 1997) и растения-трансформанты, устойчивые к гербицидам группы хлорсульфурина (Чикризова и Поляков, 1996). Однако существующие методы дают низкую частоту трансформации (не более 5%). Для увеличения частоты трансформации льна-долгунца необходимо определить оптимальные условия регенерации и агробактериальной трансформации побегов.

Коллекция дикорастущих видов льна, которая потенциально может служить источником генов устойчивости к болезням, в т.ч. ржавчине льна *Melampsora lini* (Ehrenb.) Lev., вредителям, засухе, засолению и защелачиванию почв, а также неизученным резервуаром генов ценных масел, в настоящее время в селекции практически не задействована из-за сложности межвидовой гибридизации (Wicks a. Hammond, 1978). Методы клеточной и генетической инженерии могут позволить преодолеть эти сложности, разнообразить и обогатить ассортимент дикорастущих видов рода *Linum*, выращиваемых в качестве декоративных растений в цветоводстве многих стран. Сведения о культивировании дикорастущих видов льна в культуре *in vitro* единичны

(Zhan et al., 1989). Работы по агробактериальной трансформации дикорастущих видов льна отсутствуют.

Цель и задачи исследований. Цель настоящей работы состояла в разработке эффективной системы агробактериальной трансформации льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.), дикорастущих видов рода *Linum* - льна крупноцветкового (*Linum grandiflorum* Desf.) и льна многолетнего (*Linum perenne* L.), а также получение растений льна-долгунца отечественных сортов, устойчивых к гербициду фосфинотрицину. В задачи исследования входило: 1) Подбор оптимальных условий, обеспечивающих повышение частоты регенерации льна-долгунца с анализом регенерационного потенциала некоторых ценных сортов отечественной селекции; 2) Разработка системы регенерации растений льна крупноцветкового и льна многолетнего из различных соматических тканей; 3) Анализ возможности использования ассоциативных мезофильных бактерий *Methylovorus mays* в оптимизации условий регенерации льна; 4) Анализ различных видов рода *Linum* на присутствие у них сигнальных соединений, индуцирующих процессинг агробактериальной Т-ДНК. Определение сортов и эксплантов льна-долгунца с высокой индуцирующей активностью; 5) Получение трансгенных растений льна-долгунца, льна крупноцветкового и льна многолетнего, содержащих маркерные гены *nptII* и *gus*; 6) Получение трансгенных растений льна-долгунца, содержащих целевой ген *bar* и устойчивых к гербициду фосфинотрицину (BASTA). Анализ возможности использования мезофильных бактерий для увеличения частоты агробактериальной трансформации льна-долгунца.

Научная новизна работы. В результате проведенных исследований разработана эффективная система регенерации льна-долгунца отечественной селекции и двух дикорастущих видов рода *Linum* - льна крупноцветкового и льна многолетнего. Показано влияние величины и возраста экспланта, а также состава питательной среды на частоту регенерации. Разработана методика трансформации мезофильными

Methylovorus mays растений, культивируемых в условиях *in vitro*. Установлено, что колонизация метиловыми бактериями повышает эффективность и частоту регенерации льна. Определены виды, экспланты и сорта с высокой индуцирующей активностью. Сделан вывод о существовании определенной зависимости между филогенетическим положением двудольных растений и их способностью индуцировать процессинг агробактериальной T-ДНК. Получены трансгенные побеги льна-долгунца и дикорастущих видов, содержащие маркерные гены *nptII* и *gus*. Впервые получены трансгенные растения льна-долгунца, содержащие целевой ген *bar* устойчивости к гербициду фосфинотрицину. Показано, что применение новой системы регенерации и методики колонизации растений метиловыми бактериями сокращает сроки культивирования и увеличивает частоту трансформации до 20%.

Практическое значение работы. Разработанная система трансформации позволяет создавать и размножать новые формы льна-долгунца - ценнейшей текстильной и масличной культуры. Полученные трансгенные растения дикорастущих видов льна могут служить материалом для различных селекционных программ. Комбинированное использование бактериальной колонизации и агробактериальной трансформации создает основу для новых технологий культивирования растений *in vitro*.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 15 печатных работ.

Апробация работы. Материалы данной работы были представлены на II и III конференциях молодых ученых (Пушино, 1997, 1998), на IV съезде Общества физиологов растений России (Москва, 1999), на III, IV, V чтениях, посвященных памяти академика Ю.А. Овчинникова (Пушино, 1997, 1998, 2000), на Школе-конференции "Горизонты физико-химической биологии" (Пушино, 2000), на II Международной конференции "Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии" (Москва, 2000), на VII Int. Conf. "In vitro Plant Cell Biology,

Biotechnology and Germplasm Preservation” (Moscow, 1997) и на Int. Sym. “Molecular Mechanisms of Stress Responses in Plants” (Moscow, 1998).

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 145 страницах машинописного текста, содержит 30 рисунков и 14 таблиц. Библиография содержит 180 источника, из них 143 зарубежной литературы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования. В исследованиях использовали 5 сортов льна-долгунца отечественной селекции, лен масличный сорт Норлин, лен многолетний и лен крупноцветковый. Исходные стерильные растения получали из семян.

Питательные среды. В работе использовали среды Мурасиге Скуга (МС) (Murashige a. Skoog, 1962), Линсмайера Скуга (ЛС) (Linsmaier a. Skoog, 1965) и среду В5 (Gamborg a. Shyluk, 1976).

Регенерация растений льна. Культивирование эксплантов проводили при интенсивности освещения 2000 люкс, температуре 25⁰С и фотопериоде 16 ч. В таблицах представлены средние арифметические и их стандартные отклонения из 5-7 опытов по 4 биологических повторностей в каждом (n=28). В работе использовали стандартные методы статистической обработки (Лакин, 1990).

Колонизация метиловыми бактериями. В работе использован штамм непигментированных метиловых бактерий *Methylovorus mays* ВКМ В - 2221 (Доронина с соавт., 2000). Выращивание бактерий проводили в течение суток при 37⁰С в среде К (Доронина, 1999) с метанолом до оптической плотности 1,5 (600 нм). Семена и растительные экспланты обрабатывали 1 сут бактериальной культурой и переносили на чашки Петри, содержащие питательные среды. Всхожесть семян оценивали через 1 нед

культивирования как процент проросших семян от общего числа семян, принятых за 100%.

Бактериальные штаммы. Для осуществления генетической трансформации экспланты льна инокулировали различными агробактериальными штаммами:

- *Agrobacterium tumefaciens* штамм A281(pTiBo542, pGA482), векторная плаزمида которого pGA482 (An. G., 1986) содержит ген неомизинфосфотрансферазы (*nptII*), экспрессируемый в растительных клетках и придающий растениям устойчивость к антибиотику канамицину (Km).

- *A. tumefaciens* штамм GV2260(p25SGUSINT), векторная плазмида которого p35SGUSINT (Vancanneyt et al., 1990) содержит маркерный ген *gus*, кодирующий β -глюкуронидазу (GUS).

- *A. tumefaciens* штамм LBA4404(pBI121), векторная плазмида которого pBI121 (Jefferson et al., 1987) содержит маркерные гены - *nptII* и *gus*.

- *A. tumefaciens* штамм GV3101(pMP90RK, pRK290), векторная плазмида которого pRK290 содержит целевой ген *bar*, экспрессируемый в растениях и придающий растениям устойчивость к гербициду фосфинотрицину (BASTA).

Бактерии выращивали в течение ночи при 28⁰С на жидкой среде LB.

Эксперименты по трансформации проводили методом кокультивирования эксплантов с суспензионной культурой агробактерии. Частоту трансформации определяли в процентах как отношение числа побегов, регенерировавших из эксплантов на селекционной среде, к общему числу культивируемых эксплантов.

Индукция процессинга агробактерий Т-ДНК эксудатами двудольных растений. В работе применяли метод "спасения плазмид" (Koukolikova-Nicola et al., 1985), основанный на использовании модифицированной Ti-плазмиды pGV3850 (Zambryski et al., 1983), содержащую между правой и левой границами бактериальный плазмидный вектор pBR322 (Маниатис с соавт., 1984). Индукция

процессинга Т-ДНК в модифицированной Ti-плазмиде pGV3850 прослеживается по вырезанию из нее низкомолекулярного фрагмента ДНК, в состав которого входит плазида pBR322. Этот процесс тестировали с помощью трансформации клеток *E. coli* тотальной агробактериальной ДНК и отбора трансформантов *E. coli* по селективному признаку плазмиды pBR322 - устойчивости к антибиотику ампицилину (50 мкг/мл). Сравнение эффективности индукции процессинга Т-ДНК эксудатами двудольных растений проводили по отношению к активности 100 мкМ ацетосирингона (As). Систематические группы растений рассматривали по классификации Тахтаджяна (Тахтаджян, 1980).

Анализ растений-трансформантов и контрольных растений проводили несколькими методами: 1) по росту в селективных условиях на средах, содержащих Km или BASTA; 2) методами молекулярной биологии: присутствие встроенных генов *nptII* и *bar* определяли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР); экспрессию встроенного гена *nptII* определяли по активности фермента неоминифосфотрансферазы II (NPT II) радиометрическим методом (Draper et al., 1988). Флюориметрическое и гистохимическое определение активности GUS выполнялось по методике Jefferson (Jefferson et al., 1987). Для ПЦР-анализа ДНК из листьев, каллусов и побегов льна выделяли упрощенным методом (Edwards et al., 1991).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Разработка системы регенерации льна-долгунца и дикорастущих видов рода *Linum* - льна многолетнего и льна крупноцветкового

1.1. Регенерация льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.)

Для разработки эффективной системы регенерации льна-долгунца отечественных сортов были рассмотрены следующие параметры: возраст и величина экспланта; соотношение ауксин/цитокинин в питательной среде, а также видовые и сортовые особенности этого растения. В

качестве экспланта были использованы, как наиболее оптимальные, сегменты гипокотыля, культивирование которых проводили на среде МС, дополненной фитогормонами 6-БАП и НУК (Поляков с соавт., 1991; Чикризова, 1997).

Для определения зависимости эффективности регенерации от возраста экспланта исследовали сегменты гипокотыля в возрасте 7, 14 и 21 сут. Каллусообразование с последующим образованием побегов наблюдали на всех эксплантах, вне зависимости от возраста (табл. 1). Наиболее высокую эффективность регенерации наблюдали у всех сортов в варианте с 14 сут эксплантами. С увеличением возраста экспланта с 14 до 21 сут эффективность регенерации уменьшалась у всех сортов льна-долгунца и исчезала к 1 месячному возрасту проростков.

Таблица 1. Зависимость регенерации растений льна-долгунца из сегментов гипокотилей от возраста экспланта*

Сорт	Эффективность регенерации, %			Количество побегов на эксплант, шт		
	Возраст экспланта, сут			Возраст экспланта, сут		
	7	14	21	7	14	21
Белинка	62.3±0.7	67.7±0.2	57.9 ± 0.3	4.4 ± 0.3	8.1±0.3	4.3 ± 0.5
Дашковский-2	19.4±0.4	29.1±0.6	21.5 ± 0.3	2.7 ± 0.1	3.4±0.2	2.2 ± 0.1
Алексим	18.5±0.2	36.6±0.5	30.5 ± 0.6	4.4 ± 0.1	4.9±0.2	4.7 ± 0.1
Л-29	57.1±0.4	75.9±0.2	67.8 ± 0.5	4.7 ± 0.2	8.8±0.1	5.9 ± 0.3
Норлин**	89.6±0.6	96.7±0.3	95.5 ± 0.3	8.7 ± 0.1	9.5±0.2	8.9 ± 0.2

* Регенерацию проводили на среде МС, содержащей 1.0 мг/л 6-БАП и 0.05 мг/л НУК.

** Сорт льна масличного.

Использовали 2-3, 4-6, 7-10 мм 14 сут экспланты для определения зависимости эффективности регенерации от величины экспланта

Таблица 2. Зависимость регенерации растений льна-долгунца из сегментов гипокотилей от величины экспланта*

Сорт	Эффективность регенерации, %			Количество побегов на эксплант, шт		
	Величина экспланта, мм			Величина экспланта, мм		
	2-3	4-6	7-10	2-3	4-6	7-10
Белинка	67.7±0.2	69.1±0.3	73.2±0.1	8.1±0.3	7.5±0.5	8.0±0.2
Дашков-ский-2	29.1±0.6	62.2±0.5	69.2±0.3	3.4±0.2	5.5±0.1	5.8±0.6
Алексим	36.6±0.5	76.9±0.4	40.5±0.2	4.9±0.2	5.2±0.8	4.6±0.4
А-29	75.0±0.2	91.1±0.4	65.5±0.2	8.8±0.1	8.5±0.3	7.4±0.2
Норлин**	96.7±0.3	96.6±0.7	91.5±0.3	9.5±0.3	9.8±0.2	8.3±0.2

* Регенерацию проводили на среде МС, содержащей 1.0 мг/л БАП и 0.05 мг/л НУК.

** Сорт льна масличного.

С увеличением величины экспланта с 2-3 до 7-10 мм эффективность регенерации увеличивалась практически у всех сортов, кроме Алексим и А-29 (табл. 2), для которых оптимальными были 4-6 мм экспланты.

По литературным данным для регенерации льна масличного (Basiran et al., 1987) и некоторых сортов льна-долгунца (Чикризова, 1997) оптимальным соотношением БАП:НУК является 1:0.1, причем для некоторых сортов льна масличного эффективность регенерации возрастала при полном отсутствии НУК в питательной среде (Bretagne et al., 1994). Для определения оптимального соотношения этих фитогормонов нами были рассмотрены четыре варианта среды МС, содержащие 1.0 мг/л БАП и 0, 0.01, 0.05 и 0.1 мг/л НУК. Эффективность регенерации возрастала со снижением НУК в питательной среде с 0.1 до 0.05 мг/л у сортов Дашковский-2 и А-29. Для сортов Алексим и Белинка более эффективной для образования побегов была среда МС, содержащая 0.1 мг/л НУК. Полное отсутствие НУК приводило к снижению регенерации у всех рассматриваемых нами сортов льна-долгунца.

Анализ эффективности регенерации в зависимости от генотипа показал, что сорт А-29 обладал наибольшей морфогенетической активностью по сравнению с другими сортами (табл. 1-2). Для выявления видовых особенностей льна-долгунца нами исследован ленинградский сорт Норлин. Эффективность регенерации льна масличного была выше по сравнению с эффективностью регенерации всех других исследованных нами сортов льна-долгунца (табл. 1-2). Процесс регенерации у эксплантов льна масличного происходил быстрее на 1 нед. т.е. уже через 1,5-2 нед культивирования эксплантов начинали образовываться побеги, тогда как у эксплантов льна-долгунца за это время появлялись только почки, что возможно и объясняет низкую частоту трансформации данного вида.

1.2. Регенерация льна многолетнего и крупноцветкового

Для регенерации дикорастущих видов льна, использовали сегменты гипокотилей, семядолей и корней 7 сут проростков, а также побеги и листья 1 месячных растений, культивируемых *in vitro*. Проведенные исследования показали наличие морфогенетических различий у сегментов, взятых от разных органов. Установлено, что наиболее оптимальными эксплантом является сегмент гипокотыля. Эффективность регенерации побегов зависела от таких параметров, как возраст экспланта и состав питательной среды и, практически, не зависела от величины и места инициации экспланта. Анализ питательных сред МС, ЛС и В5 показал, что наиболее благоприятной средой для регенерации побегов из сегментов гипокотилей дикорастущих видов льна является среда МС.

2. Колонизация растений облигатными метилотрофными бактериями *Methylovorus mays*

Недавно выдвинута гипотеза о зависимости растений от ассоциативных с ними бактерий - продуцентов цитокининов (Holland, 1997). Согласно этой гипотезе, особая роль отводится использующим

метанол розовоокрашенным факультативным метиловобактериям рода *Methylobacterium*. Эти бактерии способствуют ускоренному прорастанию семян и дальнейшему эффективному росту проростков *in vivo* (Fall, 1996; Holland, 1997). Данные о влиянии метиловобактерий на функциональные свойства культивируемых *in vitro* растений отсутствуют.

В связи с этим, нами определено влияние нового штамма бесцветных аэробных метиловобактерий на морфогенез колонизированных растений рода *Linum*, культивируемых *in vitro*. *Methylovorus mayi* - облигатный метилотроф, способный использовать в качестве источника углерода и энергии только метанол (Доронина с соавт., 2000).

2.1. Колонизация семян льна метиловобактериями приводила к увеличению всхожести у всех рассмотренных нами видов льна. Семена льна многолетнего оказались наиболее чувствительными к колонизации метиловобактериями - всхожесть которых возросла практически в два раза (с 40 до 76%). Колонизация семян льна крупноцветкового и льна-долгунца (сорт Дашковский-2, БТЛ-13) позволила увеличить эту величину на 10%. Прорастание колонизированных семян происходило на 2 сут раньше для льна масличного, льна-долгунца (все сорта) и на 3-4 сут - для льна крупноцветкового и льна многолетнего.

2.2. Влияние метиловобактерий на регенерацию эксплантов

Тестирование сегментов листьев регенерантов на присутствие метиловобактерий продемонстрировало их наличие как во всех исходно колонизированных эксплантах, так и в регенерантах льна, полученных через 2 нед культивирования эксплантов. Содержание метиловобактерий на единицу листовой поверхности составило 1×10^3 - 3×10^3 колониеобразующих единиц на 1 см^2 . Эти результаты указывают на стабильную ассоциацию метилотрофных бактерий с растениями *in vitro*.

Эксперименты по изучению влияния метиловобактерий на регенерацию эксплантов льна показали, что побегообразование у колонизированных и неcolonизированных эксплантов происходило на всех использованных нами средах для регенерации, как на среде без

витаминов, так и на среде без сахара. У колонизированных эксплантов количество образующихся побегов было больше по сравнению с неколонизированными эксплантами, независимо от типа питательной среды. Эффект колонизации эксплантов метиловыми бактериями был наиболее заметен в варианте со средой без витаминов. На этой среде способность к регенерации побегов у колонизированных эксплантов как льна-долгунца, так и дикорастущих видов была выше на 10-20%, чем у неколонизированных эксплантов, а регенерация побегов на данной среде происходила на 2-3 сут раньше. Колонизированные регенеранты отличались ярко-зеленой окраской листьев и побегов. Они легче укоренялись и адаптировались к условиям *in vivo*.

Повышенная регенерационная способность обработанных метиловыми бактериями эксплантов на средах без витаминов, возможно, объясняется не только синтезом бактериями стимуляторов роста (Шепеляковская с соавт., 1999; Иванова с соавт., 2000), но также и синтезом витаминов. Способность колонизированных эксплантов расти на средах без сахара, а также ярко-зеленая окраска листьев и нормальный рост этих растений на безвитаминных средах, объясняется тем, что метиловыми бактериями, продуцируя цитокинины, стимулируют формирование и функционирование хлоропластов (Муромцев с соавт., 1987).

3. Индукция процессинга Т-ДНК экссудатами двудольных растений

Использованный нами подход позволяет регистрировать присутствие сигнальных молекул в экссудатах различных тканей двудольных и однодольных растений по одному из важнейших результатов индукции генов области *vir*, а именно по вырезанию Т-ДНК из агробактериальной Т1-плазмиды и отбирать виды, экспланты и сорта с высокой индуцирующей активностью. Проведенные нами ранее эксперименты позволили значительно расширить список однодольных растений (20 из 35 видов), синтезирующих сигнальные молекулы, индуцирующие процессинг агробактериальной Т-ДНК (Захарченко с

соавт., 1999). Данные о различной индуцирующей активности двудольных растений отсутствуют. В работе рассмотрены представители рода *Linum* и некоторые другие растения класса Двудольные.

Экссудаты листьев всех исследованных нами растений индуцировали вырезание Т-ДНК, что является доказательством присутствия в их составе сигнальных соединений, специфических для индукции транскрипции *vir*-генов и агробактериальной Ti-плазмиды (табл. 3). Результаты трансформации клеток *E.coli*, подтверждают присутствие в трансформантах плазмиды pBR322 (рис. 1).

Экссудаты сортов БТЛ-13 и А-29 проявляли большую индуцирующую активность по сравнению с другими сортами, рассмотренными нами. Эксперименты с экссудатами из различных органов растений льна показали, что их сигнальная активность зависела от типа органа и варьировала в значительном диапазоне. У рассмотренных нами представителей рода *Linum* наибольшей индуцирующей активностью характеризовались стебли растений и сегменты гипокотилей, а наименьшей - семядоли проростков и сегменты листьев.

В ходе эксперимента установлена определенная взаимосвязь между таксономическим положением растений и их индуцирующей активностью. Проанализированные нами двудольные растения табака, петунии, хризантемы и др., относящихся к подклассу Asteridae обладали большей индуцирующей активностью по сравнению с растениями, относящимся к другим подклассам. По мере таксономического удаления от подкласса Asteridae индуцирующая активность двудольных растений уменьшалась (табл. 3). Специфический процесс взаимодействия между агробактериями и покрытосеменными растениями существовал, по-видимому, еще до их разделения на двудольные и однодольные. В пользу этого предположения свидетельствуют данные об успешной агробактериальной трансформации ряда голосеменных растений (De

Таблица 3. Индукция *vir*-области T1-плазмиды pGV3850 *Agrobacterium tumefaciens* эксудатами листьев растений

Фактор индукции	Количество трансформантов <i>E. coli</i>	Трансформанты <i>E. coli</i> , % варианта с ацетосиригноном
Без индукции	0	0
Ацетосиригнон	560 ± 30	100
Класс Двудольные (Dicotyledones)		
Подкласс Dillenidae		
<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.	550 ± 20	98
Подкласс Caryophyllidae		
<i>Beta vulgaris</i> L.	350 ± 17	60
Подкласс Rosidae		
<i>Linum usitatissimum</i> L. (лен масличный) сорт Норлин	390 ± 10	70
<i>Linum usitatissimum</i> L. (лен-долгунец) сорт А-29	330 ± 15	58
сорт Белинка	280 ± 25	50
сорт БТЛ-13	350 ± 15	60
<i>Linum grandiflorum</i> Desf.	400 ± 30	71
<i>Linum perenne</i> L.	530 ± 60	94
<i>Linum flavum</i> L.	1260 ± 30	225
<i>Kalanchoe daigremontiana</i> Ham. Et Perr.	220 ± 5	39
Подкласс Asteridae		
<i>Nicotiana tabacum</i> L.	1170 ± 60	208
<i>Nicotiana glauca</i> Link. Et Otto var. <i>grandiflora</i> Comes.	980 ± 45	175
<i>Petunia hybrida</i>	920 ± 30	164
<i>Solanum tuberosum</i> L.	470 ± 15	84
<i>Chrysanthemum segetum</i> L.	1080 ± 50	190

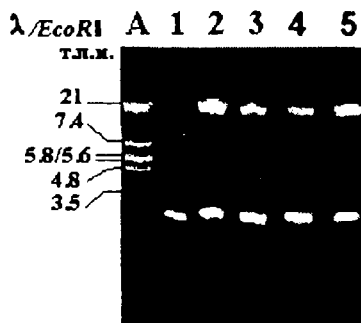


Рис. 1. Электрофорез плазмидной ДНК трансформантов *E. coli*.

A- ДНК фага λ , гидролизованная эндонуклеазой *EcoRI*; 1 - нативная ДНК плазмиды pBR322; 2-5 - плазмидные ДНК, выделенные из клонов клеток *E. coli*, трансформированных тотальной ДНК из индуцированных экссудатами двудольных растений или ацетосирингоном агробактерий C58C1(PG1V3850).

Cleene a. De Ley, 1976; Колесниченко, 1989). При отделении класса Однодольные от класса Двудольные процесс взаимодействия между агробактериями и двудольными растениями эволюционно продолжался и развивался в сторону увеличения распознавания агробактериями сигнальных соединений. Возможно этим и можно объяснить более высокую индуцирующую активность у эволюционно развитых подклассов Rosidae и Asteridae класса Двудольные по сравнению с подклассами Dilleniidae и Rammenlidae.

4. Трансформация растений льна-долгуица и дикорастущих видов рода *Linum*

4.1. Трансформация растений льна-долгуица маркерными генами

Агробактериальную трансформацию проводили на основе разработанной нами эффективной системы регенерации для льна-долгуица, используя экспланты и сорта с высокой индуцирующей активностью (табл. 3), путем кокультивирования с ночной культурой *Agrobacterium tumefaciens*. Частота трансформации зависела от используемого штамма

Так, через 7-10 сут после инокуляции сегментов гипокотилей штаммами A281(pTiBo542, pGA482) и GV2260(p35SGUSINT) наблюдали появление трансформированных зеленых каллусов, устойчивых к канамицину (100 мг/л). При последующих пересадках каллус приобретал более плотную консистенцию, без образования почек и побегов. На гипокотильных сегментах льна-долгунца, инокулированных штаммом *A. tumefaciens* LBA4404(pBI121) также образовывались зеленые каллусы. Однако уже через 2-3 нед культивирования этих каллусов на селективной среде наблюдали образование почек и побегов с 10% частотой. Полученные линии анализировали на активность NPT II. Как видно из рис. 3, из трех проанализированных образцов, инфицированных штаммом LBA4404(pBI121), положительный сигнал давали все три каллуса.

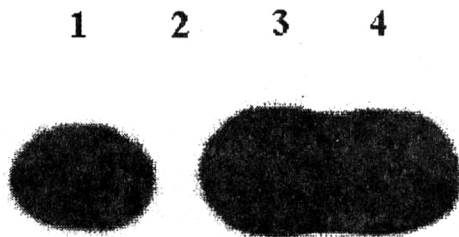


Рис. 2. Обнаружение активности NPT II в трансформированных каллусах льна-долгунца. 1- экстракт устойчивых к канамицину клеток *E.coli* (положительный контроль); 3,4 - независимые линии трансгенных каллусов льна, трансформированных *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404(pBI121); 2- нетрансформированный каллус льна. Номера соответствуют следующим линиям: 3- сорт А-29, 4 - сорт БТЛ-13.

Все взятые для анализа активности NPT II первичные трансформанты, отобранные нами на селективной среде с канамицином, также дали положительную реакцию. Встройка гена *gus* была доказана флюориметрическим и гистохимическим анализами. Использование плазмиды p35SGUSINT с геном *gus* и встроенным в него растительным

интроном (Vancaeppe et al., 1990) позволяет однозначно выделять трансформированные растения, т.к. проявление первичного транскрипта мРНК и биосинтез нормальной глюкуронидазы возможны только в трансгенных клетках растений, но не в агробактериях.

4.2. Получение трансгенных растений льна-долгунца, устойчивых к гербициду фосфинотрицину

Получение растений-трансформантов льна-долгунца, устойчивых к гербицидам весьма актуально, так как современные сорта не могут конкурировать с сорняками (Поляков с соавт., 1991).

Семена льна-долгунца сорта А-29, предварительно колонизированные штаммом *Methylovorus mays*, использовали для агробактериальной трансформации. Через 14 сут на колонизированных метиловактериями сегментах льна-долгунца, культивируемых на селективной среде, содержащей 20 мг/л гербицида BASTA, образовывался каллус, тогда как на необработанных метиловактериями эксплантах образование каллуса происходило только через 18 сут. Через 1 мес после обработки агробактериями гербицидоустойчивые растения льна-долгунца отбирали по регенерации зеленых побегов.

Анализ ДНК регенерантов методом ПЦР показал присутствие фрагмента *bar* (310 п.н.) в геноме 6 из 70 растений льна-долгунца, полученных из изначально колонизированных семян льна-долгунца и обладающих устойчивостью к фосфинотрицину (рис. 3). В контрольном варианте - 2-3 клон из 70 для этих растений, соответственно. В варианте с колонизированными метиловактериями эксплантами частота трансформации составила 20%, тогда в неколонизированных вариантах получены побеги с 10% частотой трансформации.

Колонизированные метиловактериями трансгенные растения быстрее образовывали корни, отличались более здоровым видом и легче адаптировались к условиям *in vivo*.

После переноса в почву, отобранных в условиях *in vitro*, устойчивых к гербициду растений льна-долгунца, их листья и побеги

обрабатывали 1, 3, 10 и 20 мл/л BASTA. Листья трансгенных растений выдерживали обработку 10 мл/л гербицида. Нетрансформированные растения погибали уже при обработке гербицидом в количестве 1 мл/л

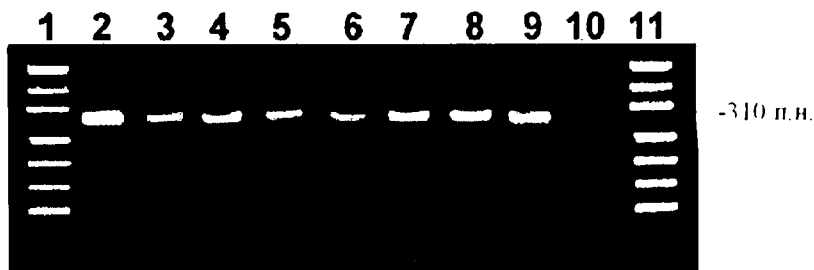


Рис. 3. Анализ продуктов ПЦР после геномной амплификации структурной части *bar*-гена (310 п.н.) у трансформированных растений льна-долгунца.

4.3. Агробактериальная трансформация льна крупноцветкового и льна многолетнего

Наибольшей регенерационной способностью обладали экспланты как льна крупноцветкового (70%), так и льна многолетнего (50%), у которых перед инокуляцией агробактериями было удалено примерно 50% эпидермиса. Глубокое прокалывание приводило к снижению частоты трансформации на 38% для льна многолетнего и на 45% для льна крупноцветкового. На гипокотильных сегментах льна крупноцветкового и льна многолетнего, инокулированных штаммами *A. tumefaciens* LBA4404(pBI121) и GV2260(p35SGUS INT), образовывались зеленые каллусы, активно растущие на селективной среде, содержащей 100 мг/л Км. Однако в отличие от льна-долгунца, наблюдали интенсивное образование почек и побегов, независимо от используемого штамма.

Для доказательства трансгенной природы регенерантов был проведен ПЦР-анализ ДНК побегов с использованием праймеров, специфичных для маркерного гена *nptII*. Результаты ПЦР-анализа представлены на рис. 4. Встройка гена *gus* была доказана

флюориметрическим и гистохимическим методами определения GUS-активности.

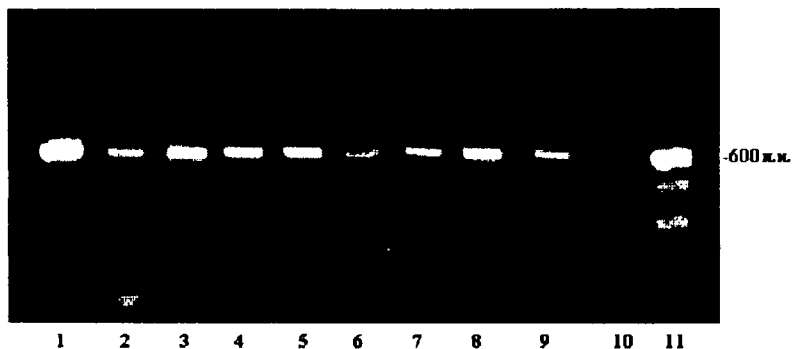


Рис. 4. ПЦР-анализ ДНК трансформированных растений с помощью специфических праймеров для *nptII*-гена. На: 1- ДНК фага λ после обработки рестриктазой *EcoRV* (маркерная ДНК); 2-4 - ДНК из трансформированных растений льна многолетнего; 5-9 - ДНК из трансформированных растений льна крупноцветкового.

ВЫВОДЫ

1. Выявлены различия в морфогенезе льна-долгунца и льна масличного. Установлены физиологические условия оптимальной регенерации льна-долгунца. Отобраны сорта льна-долгунца отечественной селекции с высокой частотой регенерации.
2. Разработана эффективная методика регенерации двух дикорастущих видов рода *Linum* – льна крупноцветкового и льна многолетнего.
3. Колонизация эксплантов льна *in vitro* ассоциативными облигатными метиловыми бактериями *Methylovorus mayus* увеличивает эффективность и частоту регенерации, значительно сокращает сроки пролиферации побегов. Колонизированные метиловыми бактериями растения отличались хорошей укореняемостью и легкой адаптацией к условиям *in vivo* по сравнению с неколонизированными растениями.
4. Установлена зависимость между присутствием у растений сигнальных соединений, индуцирующих процессинг азобактериальной Т-ДНК и их таксономическим положением

Проанализированы 5 видов рода *Linum* на присутствие у них этих сигнальных соединений.

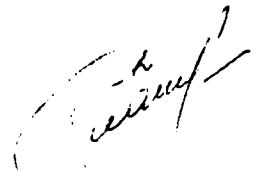
5. Разработана эффективная система агробактериальной генетической трансформации льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.) и дикорастущих видов льна *Linum perenne* L. и *Linum grandiflorum* Desf. Новая система регенерации и колонизация эксплантов метиловыми бактериями сокращает сроки получения трансгенных растений и увеличивает частоту трансформации до 20%.
6. Получены каллусы и побеги льна-долгунца и дикорастущих видов льна, содержащие маркерные гены *nptII* и *gus*. Получены трансгенные растения льна-долгунца (сорт А-29), содержащие ген *bar* и устойчивые к гербициду фосфинотрицину.

Список работ, опубликованных по материалам диссертации

1. *Kalyaeva M.A., Balokhina N.V., Zacharchenko N.S., Buryanov Ya. I.* Genetic transformation of flax (*Linum usitatissimum* L.) // VII Int. Conf. "In vitro Plant Cell Biology, Biotechnology and Germplasm Preservation". 1997. P. 262-263.
2. *Каляева М.А., Захарченко Н.С., Балохина Н.В.* Генетическая трансформация льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.) // Тезисы докладов II конференции молодых ученых города Пушкино. 1997. С. 55.
3. *Каляева М.А., Захарченко Н.С., Бурьянов Я.И.* Индуцирование процессинга агробактериальной Т-ДНК экссудатами однодольных растений // Тезисы докладов III чтений, посвященных памяти академика Ю.А. Овчинникова. Москва-Пушино. 1997. С. 26.
4. *Балохина Н.В., Каляева М.А., Бурьянов Я.И.* Особенности регенерации льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.) // Тезисы докладов III конференции молодых ученых города Пушкино. 1998. С. 137.

5. Балохина Н.В., Каляева М.А., Бурьянов Я.И. Разработка системы регенерации льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.) // Int. Symp. "Molecular Mechanisms of Stress Responses in Plants", Moscow, 1998, С. 107.
6. Каляева М.А., Захарченко Н.С., Балохина Н.В., Урманцева В.В., Бурьянов Я.И. Разработка системы регенерации и генетической трансформации льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.) и родственных видов // Тезисы докладов IV чтений, посвященных памяти академика Ю.А. Овчинникова. Москва-Пушино. 1998. С. 85.
7. Поляков А.В., Чикризова О.Ф., Каляева М.А., Захарченко Н.С., Балохина Н.В., Бурьянов Я.И. Трансформация растений льна-долгунца // Физиология растений. 1998. Т. 45. №6. С. 882-887.
8. Захарченко Н.С., Каляева М.А., Бурьянов Я.И. Индуцирование процессинга агробактериальной Т-ДНК экссудатами однодольных растений // Физиология растений. 1999. Т. 46. №2. С. 282-291.
9. Каляева М.А., Захарченко Н.С., Урманцева В.В., Бурьянов Я.И. Генетическая трансформация льна желтого (*Linum flavum* L.) // Материалы IV съезда физиологов растений России и Международной конференции "Физиология растений - наука III тысячелетия". Москва. 1999. С. 59.
10. Иванова Е.Г., Каляева М.А., Алексеева В.В. Биохимические основы взаимодействия аэробных метилотрофных бактерий с растениями // Тезисы докладов Школы-конференции "Горизонты физико-химической биологии". Пушино. 2000. Т.1. С. 199.
11. Каляева М.А., Захарченко Н.С., Бурьянов Я.И. Способность однодольных растений индуцировать процессинг агробактериальной Т-ДНК // Физиология и биохимия культурных растений. 2000. Т. 32. №3. С. 209-218.

12. Каляева М.А., Захарченко Н.С., Бурьянов Я.И. Особенности регенерации льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.) // Биотехнология. 2000. №6. С. 34-40.
13. Захарченко Н.С., Каляева М.А., Иванова Е.Г., Бурьянов Я.И. Стимулирующее влияние метилотрофных бактерий на трансформацию растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) и льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.) // Тезисы докладов II Международной конференции "Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии". Москва. 2000. С. 191-193.
14. Захарченко Н.С., Каляева М.А., Доронина Н.В., Рукавцова Е.Б., Алексеева В.В., Иванова Е.Г., Троценко Ю.А., Бурьянов Я.И. Изучение эффектов колонизации растений метилотрофными бактериями // Тезисы докладов V чтений, посвященных памяти академика Ю.А. Овчинникова. Москва-Пушино. 2000. С. 93.
15. Каляева М.А., Захарченко Н.С., Доронина Н.В., Рукавцова Е.Б., Иванова Е.Г., Алексеева В.В., Троценко Ю.А., Бурьянов Я.И. Стимуляция роста и морфогенеза растений *in vitro* ассоциативными метилотрофными бактериями // Физиология растений. 2001. Т.48. №4. С. 595-599.



200

Научное издание

Автореферат М.А.Каляевой

Налоговая льгота – общероссийский классификатор продукции
ОК-005-93, том 2; 953000 – книги и брошюры

10.05.2001 г. Заказ 9119Р. Тираж 100 экз. Усл. печ. л. 1,25.

Отпечатано с оригинала-макета в Отделе научно-технической информации
Пушкинского научного центра РАН

142290 г.Пушино Московской обл., проспект Науки, 3. ОНТИ ПНЦ РАН