

Создание древесных растений для Байкальского региона, обладающих усиленным ростом и повышенной устойчивостью к повреждающим факторам

Р. К. САЛЯЕВ, Н. И. РЕКОСЛАВСКАЯ, А. В. ЧЕПИНОГА, Е. Ф. ВЫСОЦКАЯ, Е. В. КУЗНЕЦОВА,
С. П. МАПЕЛЛИ*, В. М. ЖУКОВА**, Н. Н. САДОХИНА

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН
Иркутск

**Istituto biosintesi vegetali, C.N.R., Milan, Italy*

***Хакасский государственный университет, Абакан*

АННОТАЦИЯ

Осуществлена генетическая трансформация осины, тополя, кедра (*P. Tremula L.*, *P. Balsamifera L.*, *Pinus sibirica de Tour*) геном *ugt* выделенным из кукурузы. Ген кодирует синтез УДФГ-трансферазы – фермента осуществляющего связывание индолилуксусной кислоты с глюкозой, благодаря чему в растении создается значительный пул ИУК, меняющий ауксиновый статус.

Об успешности генетической трансформации судили по экспрессии маркерных генов GUS и NPTII, результатам саузерн-блоттинга и по активности УДФГ-трансферазы в контрольных и трансформированных растениях.

Трансгенные растения упомянутых видов обнаружили более быстрый рост, как в условиях *in vitro*, так и после пересадки в почву. Они имели более крупные листья, а растения кедра – более длинную и темную хвою.

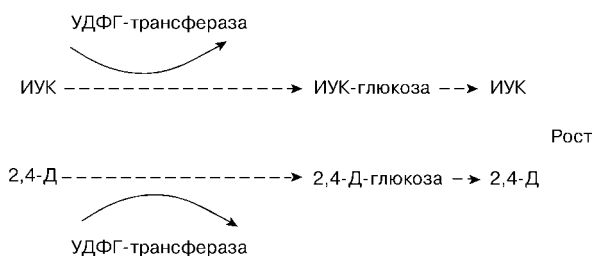
Деревообрабатывающая промышленность является интенсивным потребителем древесины, и потребности развития этой отрасли возрастают быстрее, чем растут леса. Это приводит к истощению и вырубке девственных таежных лесов, имеющих важное экологическое значение.

Для успешного экологичного развития деревообрабатывающей отрасли необходимы возобновляемые источники древесины и новые технологии выращивания древесных пород, с помощью которых будут организованы плантации с ротацией в течение 15–20 лет вокруг предприятий, перерабатывающих древесину. Такой подход свел бы к минимуму транспортные расходы и позволил бы максимально полно перерабатывать все части деревьев.

Однако для создания таких технологий необходимо использование наиболее быстрорастущих древесных пород, которые бы через 15–20–30 лет давали бы запасы древесины, пригодные для переработки. Наиболее ценные древесные породы (особенно хвойные) растут долго и достигают спелости к 80–100–120 годам. Некоторые виды растут быстрее (тополь, ива, осина, береза), но проблема ускорения их роста для создания плантаций остается актуальной.

Одним из перспективных путей решения этих проблем следует признать использование методов генной инженерии, которые в ряде случаев позволяют изменять в нужном направлении геном трансформируемых организмов.

В настоящей работе предпринимается попытка генетической трансформации древесных растений родов *Populus* и *Pinus* целевыми генами, кодирующими определенные звенья метаболизма, влияющие на рост растений. Одним из таких генов является ген *ugt*, кодирующий УДФГ-трансферазу. Схема работы гена *ugt* состоит в следующем:



Как видно из схемы, УДФГ-трансфераза катализирует связывание одного из ключевых фитогормонов – индолилуксусной кислоты (ИУК) в конъюгат с глюкозой, создавая таким образом значительный пул связанной ИУК, которая в нужный момент может быть использована для активации роста. Предполагается, что УДФГ-трансфераза таким же образом связывает и 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д) – синтетический регулятор роста и гербицид. Растения кукурузы обладают особенно высокой активностью УДФГ-трансферазы и поэтому могут быть использованы в качестве донора для выделения гена, кодирующего УДФГ-трансферазу.

В задачу работы входило:

- 1 – выделение гена *ugt* из кукурузы;
- 2 – создание бинарного вектора для трансформации растений геном *ugt* путем двух или трех родительских скрещиваний и получение культуры трансконъюганта;
- 3 – испытание созданной генетической конструкции на однолетних растениях картофеля и томата;
- 4 – разработка технологии генетической трансформации древесных растений родов *Populus* и *Pinus*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для трансформации были взяты следующие виды растений: картофель *Solanum tuberosum* L. сорт Бородинский, томат *Lycopersicon*

esculentum Mill., осина *Populus tremula* L., тополь *P. balsamifera* L. и кедр *Pinus sibirica* De-Tour.

В работе использовали следующие бактериальные штаммы: для скрещивания и создания вектора для переноса целевых генов – *Agrobacterium tumefaciens* 699 с плазмидой pCNL65, представляющий собой обезоруженный штамм, лишенный онкогенов, но сохранивший высокую вирулентность.

Ген *ugt* клонировали в *E. coli* XL1-Blue в pBluescript, также в скрещивание включали *E. coli* K802 с pRT104, несущей 35 S промотор и маркерный ген *gus-int*.

Кроме штаммов, несущих ген *ugt*, использовали такие штаммы: *A. tumefaciens* AA302, AA303, AA404, AA501, AA502, несущие гены *asbp* из арабидопсиса в сенсовой (302, 303, 501 и 502) и антисенсовой (404) ориентациях, а также маркерные гены *nptII* и *gus-int*.

Трансконъюганты получали от скрещиваний следующих бактерий:

- A. t.699* + *E. coli* XL1-Blue + *E. coli* K802; (обозначение на графиках *ugt*)
- A. t.302* + *E. coli* XL1-Blue + *E. coli* K802; (*ugt*+302)
- A. t.303* + *E. coli* XL1-Blue + *E. coli* K802; (*ugt*+303)
- A. t.404* + *E. coli* XL1-Blue + *E. coli* K802; (*ugt*+404)
- A. t.501* + *E. coli* XL1-Blue + *E. coli* K802; (*ugt*+501)
- A. t.502* + *E. coli* XL1-Blue + *E. coli* K802. (*ugt*+502)

Скрещивание проводили на нитроцеллюлозных фильтрах в течение 2–3 сут, а затем инфицировали черенки оздоровленных растений, нанося уколы в потенциально способные к интеграции и регенерации ткани спящей пазушной почки. Черенки помещали на стандартную среду Мурасиге и Скуга, содержащую индолмасляную кислоту (0,6 мг/л) и выращивали вначале 1 сут в темноте при 26 °С, затем перенесли в световую камеру при 24 °С и 3000 лк.

Для проверки трансформации использовали растения картофеля и томата, культивируемые *in vitro*. После успешной проверки на однолетних растениях трансформировали осины, тополя, полученные из свежесобранных семян, а

также кедры, выращенные из зародышей на агаровой среде.

Активность экспрессии маркерных генов и целевого гена *ugt* оценивали стандартными и ранее опубликованными методиками [1, 2]. Саузерн-блот гибридизацию выполняли по общепринятой методике [3].

Активность УДФГ-трансферазы оценивали по ранее опубликованному методу [1, 2], активность триптофансинтазы – по методу [4, 5].

Для переноса растений осины из агаровой среды в почву осуществляли их акклиматизацию, выдерживая во влажной камере в течение месяца в открытых сосудах на 0,005 % растворе гуматов. Затем растения пересаживали в почвенные сосуды и продолжали содержать в световой камере в течение двух недель. После этого их пересаживали в теплицу и через 3 нед – в открытый грунт.

Эксперименты проводили в 2- и 3-кратных повторностях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При использовании однолетних растений картофеля и томата установлена принципиальная возможность трансформации геном *ugt*, усиливающим рост и придающим устойчивость к гербициду 2,4-Д. Присутствие трансгена *ugt* из кукурузы в геномной ДНК трансформированных растений картофеля и томата было показано с помощью саузерн гибридизации при использовании в качестве зонда гена *ugt* из кукурузы, клонируемого в *E. coli* XL1-Blue. Трансгенные растения картофеля и томата при выращивании в грунте значительно опережали в росте контрольные (рис. 1, а, б, в), развитие их происходило быстрее, что выражалось в более раннем зацветании и появлении большого количества клубней у картофеля и плодов у томата. Трансгенные растения картофеля и томата были более толерантны по сравнению с контрольными к обработке высокими (до 100 мг/л) дозами 2,4-Д.

По отработанной схеме проводили трансформирование тополевых: осины и тополя, а также кедра, но основная часть работы проводилась на осине. Эффективность трансформации оценивали, помещая черенки на селективные среды, содержащие 50 мг/л канамицина



Рис. 1. Контрольные и трансгенные растения картофеля и томата.

а – контрольные растения картофеля 1-го года; б – трансгенные растения картофеля 1-го года; в – контрольные (1) и трансгенные (2) растения томата.

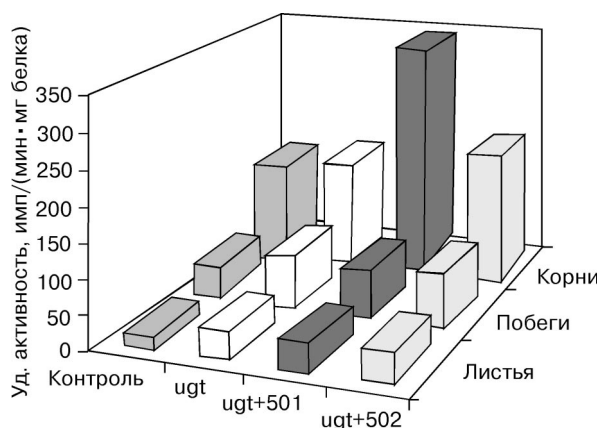


Рис. 2. Изучение активности маркерного фермента β -глюкуронидазы в различных органах осины, кодируемого маркерным геном *gus-int*. Сокращения: *ugt* – использован основной ген *ugt* для трансформации, *ugt + 501* и *ugt + 502* – вместе с геном *ugt* вводили конструкции генов *асбр* 501 и 502.

или 15 и 30 мг/л гентамицина. На среде с канамицином трансформированные черенки проявили более высокую жизнеспособность, чем контрольные. В присутствии гентамицина у трансформированных растений осины эффективнее шел ризогенез, длина корней была больше и наблюдался рост побегов.

Контрольные растения на среде с гентамицином, образовав в первые дни после высадки зачатки корешков, такими и оставались до

конца периода испытания, длившегося 4 нед. После этого оба типа растений были перенесены на среду без антибиотика. Трансформированные осины продолжили свой рост, в то время как контрольные погибли. Более высокая жизнеспособность трансформированных растений осины на среде с антибиотиками свидетельствует о присутствии эффективной экспрессии гена *prtII* и об осуществившемся трансгенезе.

Эффективность трансформации определяли по активности маркерного фермента β -глюкуронидазы, используя буферные экстракты из корней, стеблей и листьев осины (рис. 2). Самая высокая активность отмечена в трансформированных растениях с конструкцией 501: в 2,3 раза больше, чем в контроле. Относительно высокий уровень флуоресценции в корнях у контроля, вероятно, вызван наличием веществ фенольной природы у осины. В стеблях и листьях трансформированных растений активность β -глюкуронидазы была выше по сравнению с таковыми в контроле.

При использовании клонируемого гена *ugt* в *pBluescript* в качестве зонда в геномной ДНК осины были выявлены полосы гибридизации, свидетельствующие о наличии этого гена, при-

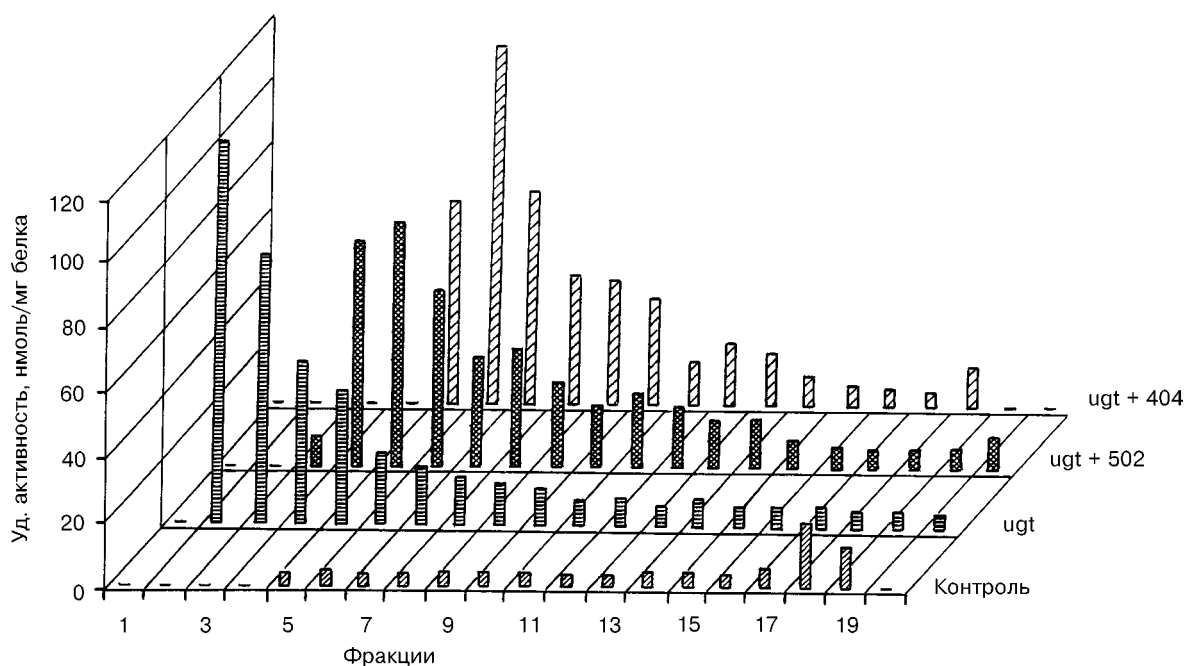


Рис. 3. Распределение удельной активности УДФГ-трансферазы по фракциям при хроматографии овании на ДЭАЭ-целлюлозе экстрактов контрольных и трансгенных растений осины. Обозначения те же.

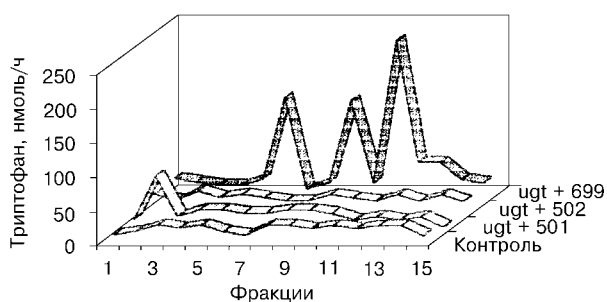


Рис. 4. Распределение удельной активности триптофансинтазы по фракциям при хроматографировании на ДЭАЭ-целлюлозе экстрактов контрольных и трансгенных растений осины. Обозначения те же.

чем интенсивность полос была значительно выше у трансгенных растений осины.

На рис. 3 представлены профили элюции УДФГ-трансферазы при определении ее активности во фракциях после элюции буферных экстрактов из растений на ДЭАЭ-целлюлозе. Можно видеть, что все три типа трансгенных растений выявляли гораздо более высокую ак-

тивность УДФГ-трансферазы по сравнению с контролем.

Существенный вклад в усиление гормонального статуса внесла агробактериальная триптофансинтаза (рис. 4), которая присутствовала в векторной ТДНК *A. tumefaciens* 699, и, возможно, ген *trp*, кодирующий триптофансинтазу, вошел в состав трансконъюганта и интегрировал в растения осины при инфицировании. Аналогично ранее было показано, что ген *trp* из *A. t.* 8628, очевидно, был причиной повышения активности триптофансинтазы, увеличения содержания триптофана и ИУК у трансформированных клеток моркови [4,5].

На рис. 5 представлены диаграмма корнеобразования у растений осины на агаровой среде (рис. 5, а) и диаграмма роста (рис. 5, б), созданные на основе морфометрического анализа растений, клонируемых на агаровой среде (а), а затем после акклиматизации перенесенных в условия открытого грунта (б) для пере-

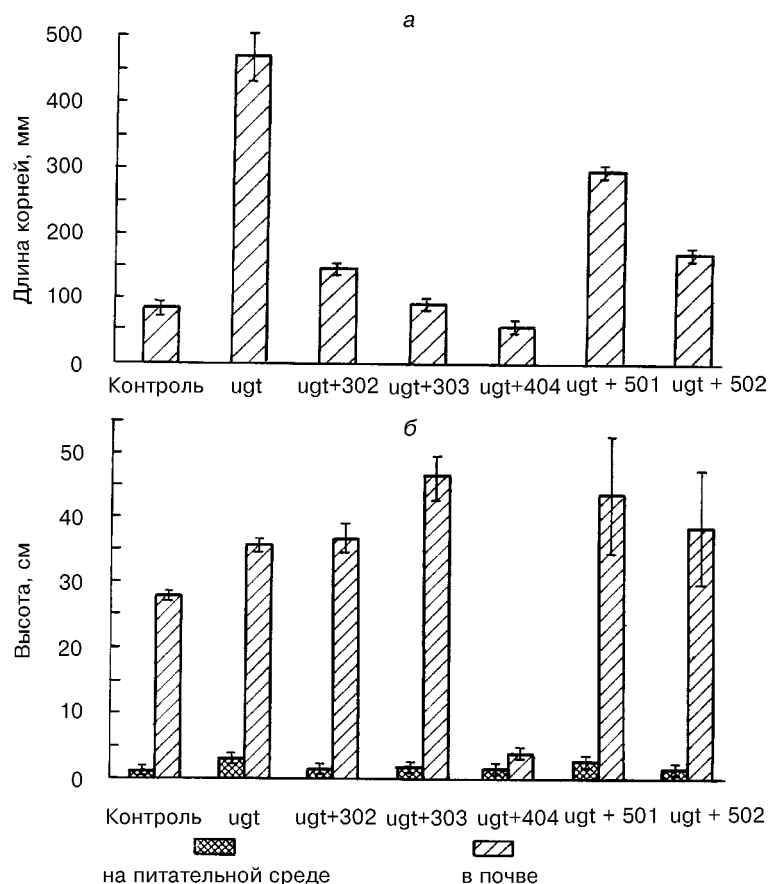


Рис. 5. Суммарная длина корней у контрольных и трансгенных растений осины, выращенных на питательной среде *in vitro* (а); высота контрольных и трансгенных растений осины при выращивании *in vitro* (низкие столбики) и в открытом грунте (высокие столбики) (б). Обозначения те же.

зимовки. В зависимости от использованной конструкции растения обнаруживали различные преимущества трансгеноза, выражаемые в усилении роста побега, увеличении количества и длины корней, увеличении числа листьев и площади листовой пластинки (данные не приведены). Наиболее эффективной оказалась конструкция с геном *ugt* при выращивании осины на агаровой среде с добавлением 0,6 мг/л индолилмасляной кислоты, у которой корнеобразование происходило в 2–3 раза эффективнее судя по количеству и длине корней (см. рис. 5, *a*). Так как ген *ugt* участвует в запасании ауксина, возможно, ускорение корнеобразования было обусловлено достаточным для этого количеством ауксина, связанного в конъюгат с глюкозой и высвобождаемого из него по мере надобности. У трансгенных растений осины с антисенсовой конструкцией 404 корнеобразование было слабее по сравнению с контролем. При переносе растений в почву (см. рис. 5, *b*) и выращивании на открытом воздухе значительное опережение роста и развития выявили конструкции 302, 303, 501 и 502, геном которых был обогащен генами *асбр* в сенсовых ориентациях. Этот же ген *асбр* в антисенсовой конструкции 404 при выращивании в открытом грунте обнаружил резкое замедление роста, хотя на агаре этот тип растений не уступал по темпам роста контрольным растениям. Ген *асбр* кодирует ацилсвязывающий белок, функциями которого являются транспорт и защита ацилкоферментов А, необходимых для синтеза жирных кислот и биогенеза мембран. Предположительно, трансген *асбр* усилил работу мембранных структур, в особенности фотосинтетического аппарата, так как визуально листья этих растений имели более насыщенный зеленый цвет.

Трансгеноз улучшил приживаемость осины при переносе из агаровой среды в сосуды с поч-

вой, так, например, в контроле при этом выживал 31 % саженцев, у конструкции с одним геном *ugt* и у конструкции 302 – 61 и 55 % соответственно. Успешной акклиматизации способствовали полив саженцев 0,005 %-м раствором гуматов и адаптация в течение 1 мес к росту на воздухе. При переносе окрепших саженцев из теплицы в условия открытого грунта приживаемость составила 100 %.

Таким образом, в создании быстрорастущих генотипов осины принимали участие как минимум три трансгена: *ugt* (основной), *тпр* и *асбр*. Очевидно, ген *ugt* является ключевым геном ауксинового метаболизма: его перенос и экспрессия определили гормональный статус и ускоренный рост трансгенных растений. Кроме *P. tremula* L. сходные черты усиления ростовой активности после инфицирования конструкцией, содержащей ген *ugt*, выявили также растения *P. balsamifera* L. и *Pinus sibirica* DeTour.

Проведенное исследование может стать основой для дальнейшей работы по созданию новых форм древесных растений с использованием целевых генов. Судя по результатам можно ожидать, что новые формы будут обладать повышенной энергией роста по сравнению с исходными.

Работа выполнена на средства гранта РФФИ 97-04-96214.

ЛИТЕРАТУРА

1. Н. И. Рекославская, В. М. Жукова, Р. К. Саляев и др., Докл. РАН, 1997, 356, 825–829.
2. В. М. Жукова, Н. И. Рекославская, Р. К. Саляев, О. В. Юрьева, Биотехнология, 1997, 5, 15–21.
3. J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2nd ed. Vol. 2. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.
4. Н. И. Рекославская, А. М. Собенин, О. М. Барыкова и др., Докл. РАН, 1994, 338, 830–832.
5. Н. И. Рекославская, Е. В. Кузнецова, Е. Ф. Высоцкая, Р. К. Саляев, Биохимия, 1997, 62, 508–515.

Creation of Arboreal Plants for the Baikal Region That Have an Enhanced Growth and an Increased Resistance to Injuring Factors

R. K. SALYAEV, N. I. REKOSLAVSKAYA, A. V. CHEPINOVA, E. F. VYSOTSKAYA,
E. V. KUZNETSOVA, S. P. MAPELLI, V. M. ZHUKOVA, N. N. SADOKHINA

A genetic transformation of aspen, poplar, cedar (*P.Tremula* L., *P.Balsamifera* L., *Pinus sibirica* de Tour) by means of the gene *ugt* isolated from maize was carried out. The gene codes for synthesis of UDPG transferase – the enzyme that provides for binding of indolylacetic acid to glucose, thanks to which a considerable pool of indolylacetic acid is formed in the plant, which changes the auxin status.