

УДК 602.6:633.853.494

ИЗУЧЕНИЕ ПЕРВЫХ СТАДИЙ РЕГЕНЕРАЦИИ ПОБЕГОВ
НА СЕМЯДОЛЬНЫХ ЭКСПЛАНТАХ РАПСА (*BRASSICA NAPUS* L.)
ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ,
СОДЕРЖАЩИХ ГЕН *GUS* С ИНТРОНОМ ИЛИ ГЕН *GFP*

ХОАНГ ТХИ ЖАНГ¹, Г.Н. РАЛДУГИНА², Е.А. КАЛАШНИКОВА¹

(* Кафедра генетики и биотехнологии
РГАУ — МСХА имени К.А. Тимирязева,

² Институт физиологии растений имени К.А. Тимирязева РАН)

С целью изучения первых стадий регенерации побегов проводили генетическую трансформацию семядольных эксплантов проростков рапса с помощью *Agrobacterium tumefaciens*, содержащих генетические конструкции с маркерными генами *gus* или *gfp*. При использовании конструкции с геном *gus* не наблюдали разницы в интенсивности окраски между различными клетками в образующихся меристемах, тогда как свечение гена *gfp* в тканях формирующихся трансформированных побегов было различно. Таким образом, было показано, что для изучения первых стадий регенерации побегов на эксплантах растений рапса лучше использовать конструкцию, содержащую ген *gfp*.

Ключевые слова: *Brassica napus*, рапс, регенерация, трансформация, *gfp*, *gus*.

Известно, что при морфогенезе, происходящем на различных растительных эксплантах в культуре *in vitro*, в некоторых случаях образуются химеры, сформированные из более чем одной близлежащих дедифференцированных клеток [6, 10, 14]. В связи с тем, что образование растений-регенерантов после агробактериальной трансформации может происходить через первичный каллус, такие трансформанты могут быть химерными, т.е. их ткани будут состоять как из трансформированных, так и из не трансформированных клеток [5, 12]. В связи с тем, что образование химер при морфогенезе достаточно велико, то при трансформации и последующей регенерации трансгенных растений шанс получить химерные побеги

также достаточно велик. При использовании для трансформации маркерных генов, дающих хорошо видимую окраску трансгенных клеток, таких как ген *gus* ((3-глюкуронидазы) [8] или *gfp*-ген зеленого флуоресцентного белка, впервые выделенного в 1979 г. Shimomura O. из медузы *Aequorea victoria* [13], можно было бы увидеть, какого типа ткани образуются при регенерации.

Целью нашей работы являлось изучение процессов регенерации побегов после трансформации генетическими конструкциями, содержащими маркерные гены *gus* или *gfp*, с целью выяснить, как происходит образование химерных побегов и какие гены лучше всего использовать для такого исследования.

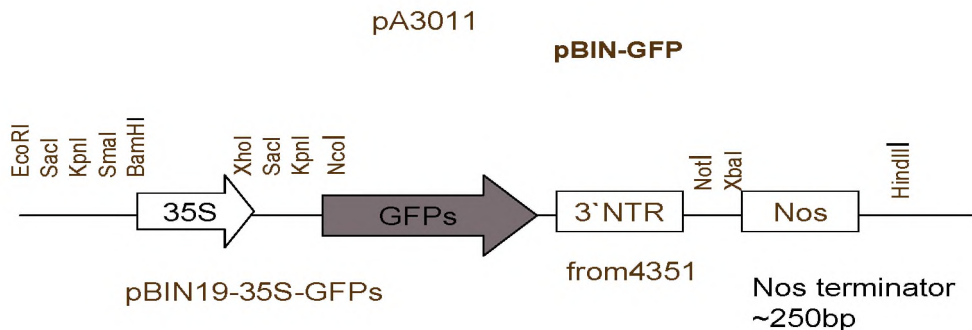
Материалы и методы

Для исследования использовали семядоли рапса (*Brassica napus* L.) сорта Вестар, которые получали путем проращивания стерильных семян на среде MS [11] без добавления растительных гормонов и витаминов. Все семена стерилизовали 70%-м спиртом и 20%-м раствором гипохлорита натрия, после чего промывали стерильной дистиллированной водой, а затем высаживали на агаризованную среду и помещали на сутки в темноту, после чего переносили в световую камеру. Через 5 сут. проростки использовали для получения эксплантов, срезая с них семядольные листья.

Для трансформации использовали генетические конструкции, содержащие ген *gus* с интроном или ген *gfp* (рис.1), содержащиеся в плазмиде pBin9, встроенной в агробактерию штамма AGL0.

Трансформацию проводили методом совместного культивирования эксплантов с агробактерией, находящейся на поверхности агаризованной среды по ранее разработанному методу [3]. Суспензию «ночной» культуры *A. tumefaciens* наносили на среду для каллусогенеза (среда MS, 3% сахара, 0,1 мг/л 2,4-Д, 4 мг/л кинетин, 2 мг/л НУК), помещали на нее 5-дневные семядольные экспланты проростков и инкубировали в течение двух суток в темноте при температуре 25°C. Затем экспланты переносили на среду для морфогенеза (среда MS, 1% сахара, 4 или 8 мг/л БАП, 0,5 или 1 мг/л НУК), дополненную антибиотиком клафораном (800 мг/л) и АБК (3 мг/л) и помещали в световую камеру. Через 3—4 нед. экспланты переносили на питательную среду для роста побегов (среда MS, 1% сахара), дополненную клафораном (500 мг/л). Сформированные побеги

а



б

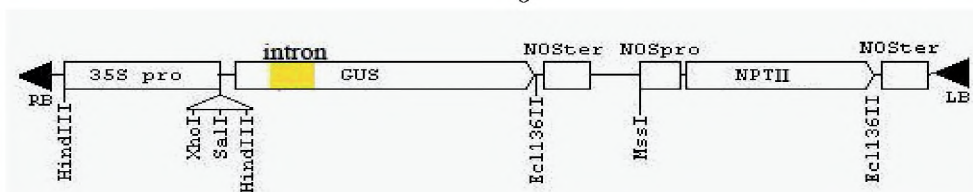


Рис. 1. Схемы генетических конструкций, использованных для трансформации семядольных эксплантов рапса: а — схема генетической конструкции, содержащей ген *gfp*; б — схема генетической конструкции, содержащей ген *gus*

отделяли от каллуса и пересаживали на среду для укоренения.

Определение экспрессии гена *gus* проводили по гистохимическому методу Jefferson [7], используя в качестве субстрата X-gluc. Продукт имел синий цвет и выпадал в осадок внутри клеток. Флуоресценцию GFP наблюдали в флуоресцентном микроскопе при освещении его ультрафиолетовым светом (440-480 нм).

Частоту регенерации рассчитывали как отношение числа каллусов, образовавших побеги, к общему числу эксплантов, помещенных на среду для каллусогенеза [4]. Результаты экспериментов статистически обрабатывали с использованием программы Excel.

Результаты и их обсуждение

При изучении способности семядольных эксплантов рапса сорта Вестар к регенерации побегов с использованием агробактерий, содержащих различные генетические конструкции, была изучена зависимость частоты регенерации от используемой конструкции при различном соотношении регуляторов роста в питательной среде. Из данных, представленных в таблице 1, видно, что регенерация при трансформации конструкцией с геном *gus* происходит при всех используемых соотношениях гормонов, тогда как применение конструкции с геном *gfp* регенерацию ингибирует.

В дальнейшей работе нами для трансформации была использована среда, содержащая 4 мг/л БАП, 0,5 мг/л НУК и 3 мг/л АБК.

При трансформации растений конструкцией, содержащей ген *gus*, через 2-3 нед. культивирования эксплантов на среде для морфогенеза на срезах черешков были видны образующиеся регенеранты. Они были отделены от экспланта и окрашены X-gluc. Макроскопическая оценка подтверждала экспрессию *gus*-генов, визуализируемую *gus*-окрашиванием в тканях побегов предполагаемых трансформантов. При этом наблюдали и синие и белые побеги. В тканях отрицательного контроля (нетрансгенных побегов) никакой *gus*-активности не наблюдали (рис. 2 А, Г). В проанализированных срезах *gus*-активность визуализировалась как синие осадки в клетках побегов (рис. 2 Б, В).

Из рисунка 2 можно видеть, что экспрессия *gus* в тканях исследованных побегов варьировала по локализации и интенсивности, окрашивание происходило по частям побегов и по жилкам, при этом там, где, по видимому, активность *gus* была больше, там цвет был более интенсивным (рис. 2 Д, Е).

После проведения трансформации 50 адвентивных почек, изолированных из дедифференцированных тканей, были обработаны X-gluc. Из них 42 шт. были полностью или частично

Т а б л и ц а 1

Зависимость регенерации побегов от содержания БАП и НУК (мг/л) в среде культивирования при трансформации различными генетическими конструкциями

Содержание БАП:НУК	Частота регенерации	
	<i>gus</i>	<i>gfp</i>
4:0,5	74,25* (69,96÷78,54) **	54,96 (50,43÷59,49)
4:1	27,50 (21,85÷33,15)	—
8:1	30,73 (24,2÷37,26)	—

П р и м е ч а н и е . * Частота регенерации рассчитана по формуле: $p = (n_1/n_2) \cdot 100\%$, где n_1 — число эксплантов с регенерацией, n_2 — общее число эксплантов; ** Доверительный интервал.

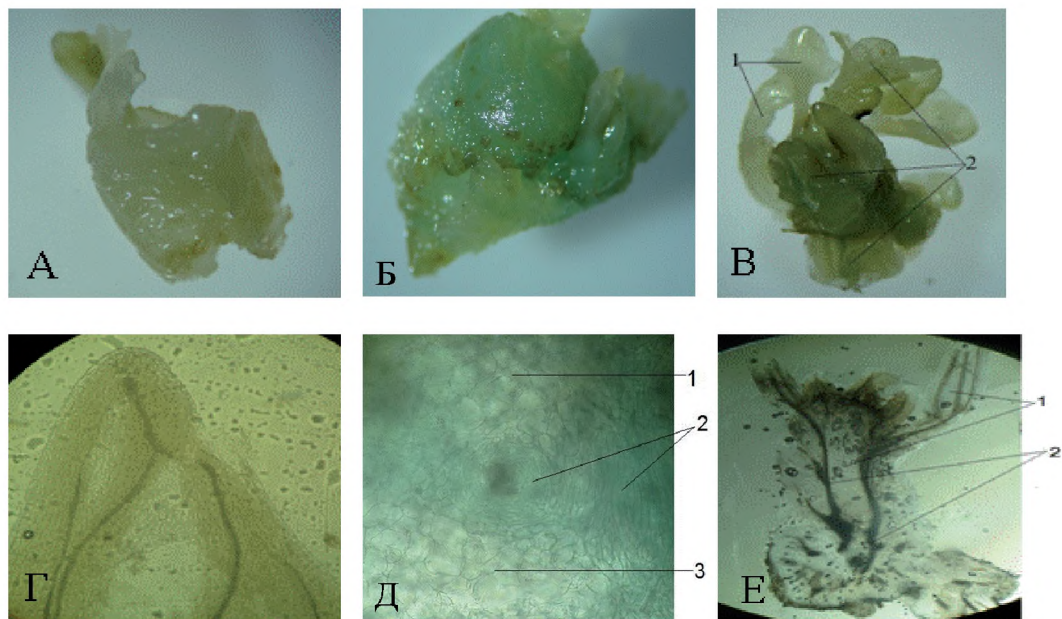


Рис. 2. Регенеранты и срезы, окрашенные X-gluc: А — нетрансформированный регенерант; Г — продольный срез нетрансформированной ткани; Б, В — трансформированный регенерант; Д — поперечный срез трансформированной почки; Е — продольный срез трансформированного регенеранта. 1,3 — неокрашенные части; 2 — окрашенные части

окрашены, т.е. 84% регенерантов содержали экспрессирующийся ген *gus*. От остальных морфогенных каллусов через 6–7 нед. были отделены сформировавшиеся побеги и высажены на среду для укоренения. На срезанных с этих побегов листьях после обработки X-gluc не наблюдали никакого окрашивания, т.е. встроенный *gus*-ген не экспрессировался.

При трансформации растений конструкцией, содержащей ген *gfp*, исследование показали, что свечение белка *gfp* наблюдалось на всех стадиях развития трансформированных растений — как на стадии первичного морфогенеза, на каллусах с формирующимися почками, так и при образовании оформленных побегов. Было показано, что у более чем 90% всех образовавшихся каллусов проявлялась яркая флюоресценция *gfp*, которая сохранялась и на стадии по-

бегообразования (рис. 3). У сформировавшихся побегов свечение *gfp* наблюдали на листьях верхнего и нижнего ярусов. При этом свечение было значительно ярче на старых листьях, чем на молодых (рис. 4).

На листьях растений-регенерантов свечение *gfp* лучше проявлялось на сосудистых тканях, трихомах и устьицах (рис. 5).

Таким образом, можно отметить, что из двух использованных для трансформации конструкций лучшие результаты были получены с геном *gfp*, хотя частота регенерации после трансформации была выше для конструкции с геном *gus*, однако экспрессия в сформировавшихся побегах в этих случаях отсутствовала. Вполне вероятно, что ген *gus* в нашем случае экспрессировался только краткое время после трансформации. Достаточно известным фактом является

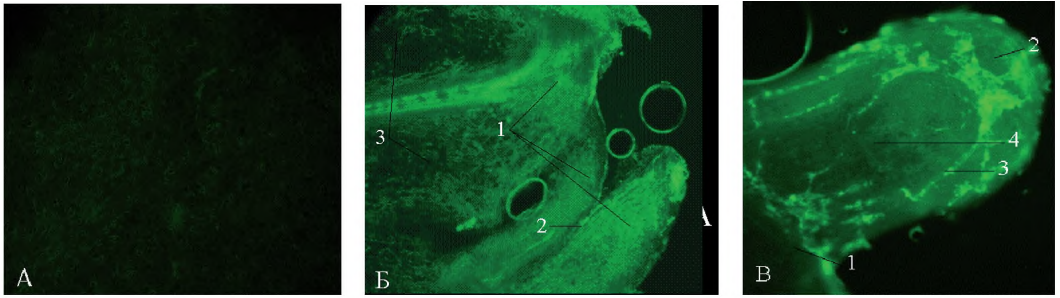


Рис. 3. Экспрессия гена *gfr* в клетках меристематических образований на первичном каллусе, образовавшемся на срезах черешков семядольных эксплантов проростков рапса (ув. $\times 500$): А — нетрансформированное растение; Б — срез меристемы: 1) примордии, 2) меристема, 3) каллусные клетки; В — срез ризоидного образования: 1) срез черешка, 2) клетки апикальной меристемы корня, 3) клетки эндодермы, 4) прокамбий

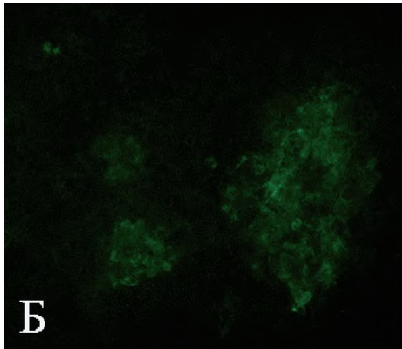
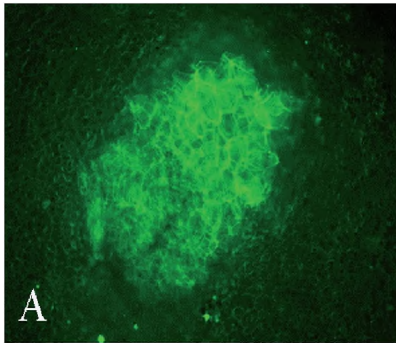


Рис. 4. Экспрессия гена *gfr* в листьях сформировавшихся трансформированных растений: А — старый лист, Б — молодой лист (ув. $\times 10$)

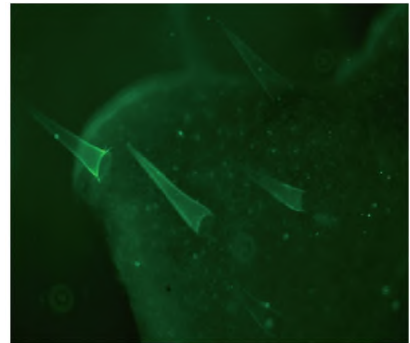


Рис. 5. Экспрессия гена *gfr* в трихомах на листьях сформировавшихся побегов

использование этого гена в основном для транзientной экспрессии, чтобы показать работу, например, каких-нибудь промоторов. Ген *gfr* экспрес-

сировался на всех стадиях развития побега, что позволяло наблюдать за развитием растительных тканей. Очень интересно, что свечение белка *gfr* в некоторых листьях наблюдали только в группах клеток, тогда как основная ткань листа не флуоресцировала. Это может свидетельствовать о генотипической химерности образующихся при регенерации растений, состоящих из трансформированных и ^трансформированных клеток [12], так как меристематическая ткань может происходить как из одной клетки, так и из нескольких клеток, образуя или мериклиналильные, или периклиналильные химеры, т.е. трансформированные клетки могут находиться

в любом из слоев образующейся меристемы, туника которой состоит, как правило, из нескольких слоев, обозначаемых L1, L2, L3 и т.д. Как правило, химерность обычно выясняется только на стадии образования семян, когда обнаруживается, что не соблюдаются менделевские правила наследования одного признака для самоопыленных растений. В некоторых случаях наследование встроенного гена наблюдали только в 2-3 растениях из 100 проверенных семян [9]. Этот феномен элиминации чужеродного гена объясняли различными способами: либо как результат мутации,

либо потерей гена вследствие рекомбинации [1, 2]. Вполне вероятно, что он может объясняться и химерностью полученных растений, так как известно, что гаметы, как правило, образуются из L2-слоя, который может состоять как из тех, так и из других клеток. Однако есть надежда, что включение в генетическую конструкцию гена зеленого флуоресцирующего белка позволит отбирать химерные растения уже на достаточно ранних стадиях развития, исключая трудоемкую работу по получению семенного потомства.

Библиографический список

1. Дейнеко Е.В., Новоселя Т.В., Загорская А.А., Филипенко Е.А., Пухначева Н.В., Шумный В.Л. Инактивирование чужеродных генов у трансгенных растений табака (обзор) // Изучение генома и генетическая трансформация растений. Новосибирск: Наука, 2001. С. 132-142.
2. Дейнеко Е.В. Изучение экспрессии гетерологичных и собственных генов у трансгенных растений (На примере *Nicotiana tabacum* L.): Дис. доп биол. наук: 03.00.15: Новосибирск, 2004. С. 198 РГБ ОД, 71:05-3/80.
3. Малышенко С.И., Тюлькина Л.Г., Зверева С.Д., Ралдугина Г.Н. Получение трансгенных растений *Brassica campestris*, экспрессирующих ген *gfp* // Физиология растений, 2003. 50. С. 309-315.
4. Смиряев А.В., Кильчевский А.В. Генетика популяций и количественных признаков. М.: КолосС, 2007. С. 215-218.
5. Соболева А.Г., Соболев В.В., Казаков И.В. Разработка метода агробактериальной трансформации ремонтантной малины на основе термостабильности лихеназы // Известия ТСХА, 2008. Вып. 3. С. 81-88.
6. Christou P. Morphological description of transgenic soybean chimeras created by the delivery, integration and expression of foreign DNA using electric discharge particle acceleration// Ann. Bot., 1990. 66. P. 379-86, 104.
7. Jefferson R.A. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system // Plant Mol Biol Rep, 1987. 5. P. 387-405.
8. Jefferson R.A., Kavanagh T.A., Bevan M.W. GUS fusions: b-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants // The EMBO Journal, 1987. 6. P. 3901-3907.
9. Kirk J.T.O., Tilney-Bassett R.A.E. Chimeras. In The Plastids: Their Chemistry, Structure, Growth and Inheritance, 1987. 49. P. 329. New York: Elsevier.
10. Marcotrigiano M., Gouin F.R. Experimentally synthesized plant chimeras 1. In vitro recovery of *Nicotiana tabacum* L. chimeras from mixed callus cultures // Ann. Bot., 1984. 54. P. 503-511.
11. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture // Physiol. Plant, 1962. 15. P. 472-493.
12. Schmulling T., Schell J. Transgenic tobacco plants regenerated from leaf disks can be periclinal chimeras // Plant Mol. Biol, 1993. 21. P. 705-708.

13. *Shimomura O.* Structure of the chromophore of Aequorea green fluorescent protein // FEBS Letters., 1979. 15. P. 220-222.

14L. *Williams E.G. and Maheswaran G.* // Annals of Botany, 1986. 57. P. 443-462.

SUMMARY

Genetic transformation of rape seedlings cotyledon ary explants using *Agrobacterium tumefaciens*, containing genetic constructions with marker genes GUS or GFP, has been done in order to investigate the first stages of twigs regeneration Using gene GUS construction there exists no difference in colouring power between various cells in forming meristems, whereas gene GFP glow in tissues of forming transformed twigs is different. Thus, GFP gene construction is recommended in order to research the first regeneration stages in rape explants.

Key words: Brassica napus, rape, regeneration, transformation, GFP, GUS.

Хоанг Тхи Жанг — асп. кафедры генетики и биотехнологии РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева. Тел. 976-40-72.

Калашникова Елена Анатольевна — д. б. н. Эл. почта: kalash040@mail.ru.

Ралдугина Галина Николаевна — к. б. н. Институт физиологии растений имени К.А. Тимирязева РАН. Тел. 977-80-22. Эл. почта: ifr@ippras.ru.