

**ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ЛЬНА-ДОЛГУНЦА,  
НЕСУЩИХ ХИМЕРНЫЙ ГЕН GFP-TUA6**  
**Е.В. Гузенко<sup>1</sup>, В.А. Лемеш<sup>1</sup>, Г.Я. Баер<sup>2</sup>, О.А. Баер<sup>2</sup>, А.И. Емец<sup>2</sup>, Я.Б. Блюм<sup>2,3</sup>,  
Н.А. Картель<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> - ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси», Минск, Беларусь

<sup>2</sup> - Институт клеточной биологии и генной инженерии НАН Украины, Киев, Украина

<sup>3</sup> - Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины, Киев, Украина

E.Guzenko@jgc.bas-net.by

Приоритет в мировом производстве текстиля отдан льняному волокну, обладающему более высокими медико-биологическими и физико-механическими свойствами, чем хлопковое. По прогнозам ведущих французских специалистов до 2010 года удельный вес льняных и льносодержащих тканей в общем объеме выпуска текстильных материалов в мире повысится до 70% [1]. В последнее время стало сложнее создавать новые сорта льна-долгунца с улучшенным качеством и высоким выходом волокна, так как в селекционных программах используется ограниченный спектр исходного материала [2], а основные методы селекции льна-долгунца, базирующиеся на традиционных приемах (подбор пар для скрещиваний, гибридизация и отбор в расщепляющихся популяциях), остаются трудоемкими и длительными.

Развитие методов культуры *in vitro* в совокупности с разработкой эффективных методов генетической трансформации может внести значительный вклад в создание современных сортов льна-долгунца и ускорить включение заданных ценных признаков в уже существующие генотипы.

Генетическую трансформацию, как *Agrobacterium tumefaciens*-опосредованную, так и прямую биобаллистическую (biolistic) широко применяют для многих видов растений (зерновые, бобовые, крестоцветные и др.) [3, 4], при этом используя в качестве селективных маркерных генов гены устойчивости к антибиотикам. Испытание и внедрение новых маркерных генов составляет потенциально значимый практический интерес [5]. Нами была проведена генетическая трансформация химерным геном тубулина, слитым с репортерным геном GFP.

Несмотря на то, что лен достаточно пластичный в биотехнологическом отношении вид, работы по агробактериальной и биобаллистической трансформации льна, а в особенности льна-долгунца, единичны [6, 7, 8, 9]. Это связано с тем, что информация о закономерностях регуляции органогенеза и эмбриогенеза у льна культурного как биологического вида в целом, так и у его различных генотипов, остается достаточно ограниченной.

В качестве исходного материала использовали семена двух сортов льна-долгунца белорусской селекции Старт и Василек.

Эксплантами служили гипокотили 5-суточных проростков длиной 3 – 5 мм. Стерилизованные семена проращивали на агаре (8 г/л) при 23<sup>0</sup> С и 16-ти часовом фотопериоде. Для индукции морфогенеза использовали среду MS 5524 дополненную фитогормонами: 1 мг/л BAP (6-Benzyl-aminopurine) и 0,05 мг/л NAA ( $\alpha$ -Naphthalene-acetic acid), приготовленную на воде, содержащей катионы Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> и анионы HCO<sub>3</sub>, SO<sub>4</sub>, Cl, pH 5,7-5,8. Гипокотили инкубировали при температуре 23<sup>0</sup> С и 16-ти часовом фотопериоде.

Агробактериальную трансформацию проводили с использованием высоковирулентного штамма *A. tumefaciens* LBA4404, несущего генетическую конструкцию GFP-TUA6 [10]. Сегменты 5-дневных проростков обрабатывали суспензией *A. tumefaciens* течение 1 часа, затем переносили на среду MS 5524 дополненную фитогормонами: 1 мг/л BAP и 0,05 мг/л NAA. Через 24 часа гипокотили помещали на селективную среду, содержащую канамицин (100мг/л) и цефотаксим (500 мг/л).

В качестве микроносителя при биобаллистической трансформации использовали вольфрамовые микрочастицы “M10”, средний размер которых составлял 0,1-2,0 мкм. Навеску 50 мг стерилизовали спиртом в течение 15 мин. Осаждение частиц проводили в центрифуге Эппендорф 5415 при 14000 об/мин в течение 6-8 мин. Частицы промывали 3 раза стерильной водой. Преципитация проводилась по методике кальций-спермидинового способа по Файнер (Finer J. et al, 1992). Для повышения выживаемости трансформируемой ткани применяли осмотическую пре- и постобработку. Экспланты культивировали на среде с повышенным осмотическим давлением в течение 4–6 часов до трансформации и 20–24 часа после трансформации. Параметры баллистической трансформации: дистанция до мишени – 12 см, давление гелия – 0,7 МПа, давление вакуума – 0,9 bar, количество ДНК-пробы на выстрел – 10 мкл, количество выстрелов на чашку – 1-2.

После трех недель культивирования на селективной среде экспланты переносили на среду для морфогенеза MS 5524 дополненную фитогормонами: 1 мг/л ВАР (6-Benzyl-aminopurine) и 0,05 мг/л NAA ( $\alpha$ -Naphthalene-acetic acid). Сформировавшиеся зеленые побеги длиной не менее 2 см пересаживали на безгормональную среду MS 5519 содержащую половинный набор макросолей и витаминов, а также агар (7 г/л) и сахарозу (10 г/л), рН 5,7-5,8. Формирование корней проходило в этих условиях без дополнительной инициации.

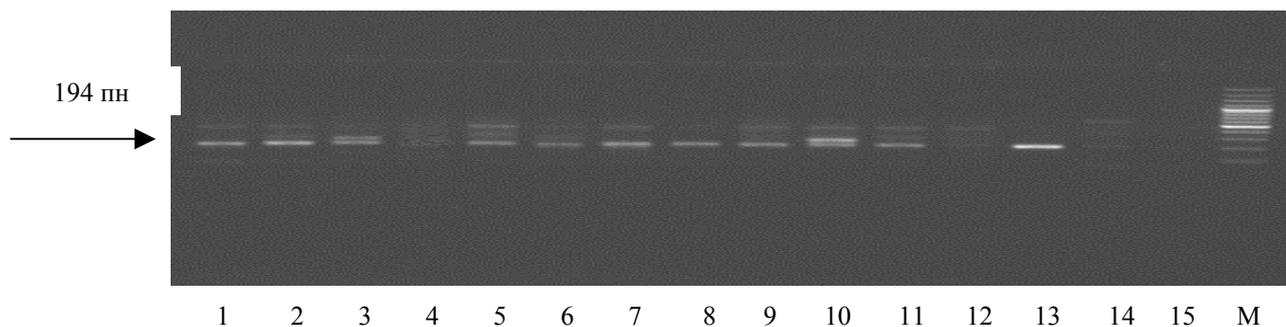
Интеграцию чужеродных генов в растительный геном определяли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для выделения тотальной ДНК из предположительно трансгенных растений использовали комплект реагентов «ДНК-сорб-С» (Россия). Для идентификации присутствия химерного гена GFP-TUA6 использовали праймеры к последовательности 35S-промотора CaMV, а именно 5'-GCTCCTACAAATGCCATCA-3' и 5'-GATAGTGGGATTTGTGCGTCA-3', амплифицирующие фрагмент величиной 194 пн. Реакцию проводили на амплификаторе BioRad с применением «горячего старта» в следующих условиях: 93<sup>0</sup>С – пауза, шаг 1 - 2 мин при 93<sup>0</sup> С; шаг 2 – 42 цикла, 10 сек при 93<sup>0</sup> С, 25 сек при 61<sup>0</sup> С и 25 сек при 72<sup>0</sup> С; шаг 3 – 1 мин при 72<sup>0</sup> С. Продукты реакции разделяли электрофорезом в 1,8% агарозном геле с добавлением этидиум бромид и документировали с помощью системы Bio-Rad GelDoc2000. Размеры амплифицированных фрагментов определяли, используя в качестве маркера GeneRuler™100 bp Plus DNA ladder (Fermentas).

В ходе экспериментов по трансформации гипокотильных сегментов двух сортов льна-долгунца Старт и Василек регенерировали 32 растения. В условиях *in vitro* трансформанты морфологически не отличались от исходных форм. Однако рост на селективной среде является лишь косвенным доказательством трансгенной природы полученных растений. Проведен молекулярно-генетический анализ с помощью ПЦР 26 трансформантов на наличие последовательности 35S-промотора CaMV в их геноме. При амплификации с использованием специфических праймеров были получены фрагменты, соответствующие позитивному контролю (плазмиды рВ1121), как после агробактериальной, так и после биобаллистической трансформации (рис. 1, 2).

Молекулярно-генетический анализ образцов сорта Старт, полученных в результате биобаллистической трансформации, выявил два нетрансгенных растения (рис. 1 образец 4, 12).

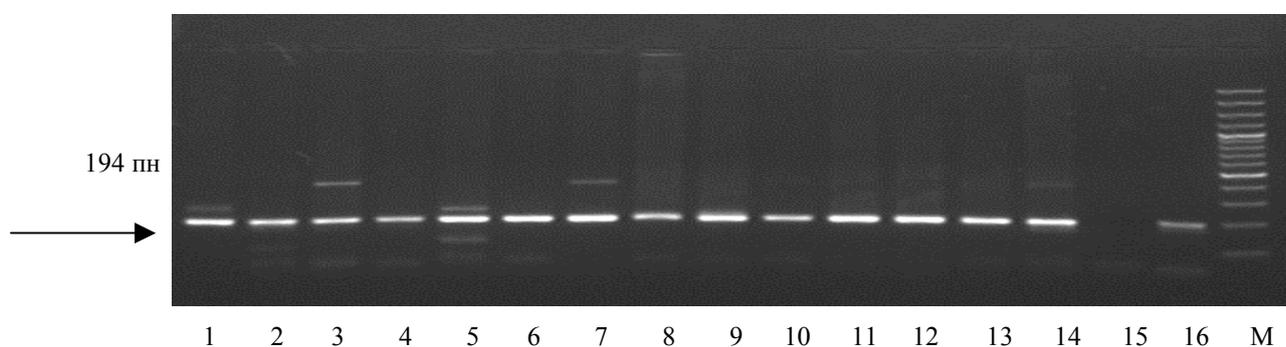
Таким образом, с помощью методов прямой и непрямой генетической трансформации нами получены трансформированные растения льна-долгунца двух сортов Старт и Василек, несущих генетическую конструкцию GFP-TUA6. Встраивание химерного гена подтверждено с помощью ПЦР.

Работа выполнена при поддержке Белорусского Республиканского Фонда фундаментальных исследований, грант Б07К-081 (2007-2008 г.г.) и Фонда фундаментальных исследований Украины, грант № 14.4/023 (2007-2008 г.г.).



**Рис. 1.** Электрофореграмма результатов ПЦР анализа тотальной ДНК льна (сорт Старт). Биобаллистическая трансформация.

1-12 – ДНК трансформантов, 13 – положительный контроль ДНК плазмиды рВІ121, 14 – отрицательный контроль ДНК нетрансформированного растения сорта Старт, 15 – отрицательный контроль ПЦР, М – маркер молекулярной массы 100 бр.



**Рис. 2.** Электрофореграмма результатов ПЦР анализа тотальной ДНК льна (сорт Василек). Агробактериальная и биобаллистическая трансформация.

1-7 – ДНК трансформантов после агробактериальной трансформации, 7-14 – ДНК трансформантов после биобаллистической трансформации, 15 – отрицательный контроль ПЦР, 16 – положительный контроль ДНК плазмиды рВІ121, М – маркер молекулярной массы 100 бр

1. Textile Report.- 2005.– № 4. – Р. 23-24.
2. *Н.А.Кругла.* Історія розвитку льонарства в Україні (друга половина ХІХ - ХХ століття). Автореф. дис. канд. іст. наук. Київ, 2002.
3. *J.C.Sanford, T.M.Klein, E.D.Wolf, N.Allen* Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process // *J.Particulate Science and Technology.* – 1987. – N 5. – Р. 27-37.
4. *А.Н.Майсурян, В.Н.Овчинникова, П.Н.Харченко, Ю.И.Долгих, А.Ю.Степанова, О.С.Мелик-Саркисов* Агробактериальная трансформация рапса по технологии без этапа регенерации растений из каллуса // Докл. Рос.Акад.сельск. наук – 2007. – № 1.– С. 5 – 7.
5. *А.И.Емец, Я.Б.Блюм* Мутантные гены тубулинов растений как маркерные селективные гены для генетической инженерии // *Цитология и генетика.* – 2007.– № 3.– С. 29-43.
6. *А.В.Поляков, О.Ф.Чикризова, М.А.Каляева, Н.С.Захарченко, Н.В.Балохина, Я.И.Бурьянов.* Трансформация растений льна-долгунца // *Физиол. растений.* – 1998.– Т. 45, № 6.– С. 882-887.
7. *Y.-F.Wang, Q.-H.Kang, Y.Liu, X.-C.Li, S.-J.Liu, Y.Xu* Study on Flax Genetic Transformation Mediated by *Agrobacterium tumefaciens* // *J. of Natural Fibers.* – 2004. – V. 1(1). – P.1-10.
8. *A.Yemets, V.Radchuk, O.Bayer, G.Bayer, A.Pakhomov, V.Baird, Ya.Blume* The development of transformation vectors based upon a modified plant  $\alpha$ -tubulin gene as the selectable marker // *Cell Biol.Int.* – 2008. – V.32. – P. 566 – 570.
9. *T.Wijayanto, A.McHughen* Genetic transformation of *Linum* by particle bombardment // *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant.* – 1999. – V.35. – P. 456 – 465.
10. *K.Ueda, T.Matsuyama, and T.Hashimoto.* Visualization of microtubules in living cells of transgenic *Arabidopsis thaliana* // *Protoplasma.* – 1999. – V. 206. – P.201-206.