

УДК: 577.21:633.71:631.524.86

КОМБИНИРОВАННАЯ ЭКСПРЕССИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЭНДОХИТИНАЗЫ И РАМНОЗИЛТРАНСФЕРАЗЫ В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ

А.В.Шахбазов, Г.Г.Бричкова, Т.В.Манешина, Н.А.Картель

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (Минск, Беларусь)

В рамках исследования была создана трансформирующая система, обеспечивающая комбинированную конститутивную экспрессию различных гетерологичных генов, кодирующих эндохитиназу ChiA-Spl, рамнозилтрансферазу RhlB и фосфинотрицинацетилтрансферазу PAT в трансгенных растениях. Получены трансгенные растения табака и показана экспрессия, тип наследования и биологический эффект трансгенов, ведущий к улучшению таких качеств растения, как устойчивость к гербицидам, ингибирование роста фитопатогенов, толерантность к загрязнениям почвы.

Ключевые слова: *трансгенные растения, эндохитиназа, рамнозилтрансфераза, комбинированная экспрессия.*

Введение

Развитие генно-инженерных технологий и раскрытие молекулярной природы защитных механизмов растений обеспечили возможность разработки принципиально новых стратегий борьбы с заболеваниями растений в дополнение к существующим традиционным подходам, основанным на применении химикатов либо классических методах селекции. Применение трансгенных форм позволяет существенно повысить окупаемость сельскохозяйственного производства, резко сократить загрязнение окружающей среды гербицидами, пестицидами и другими соединениями, во многих случаях значительно повысить урожайность растений, их устойчивость к загрязнению территории. В настоящее время большинство работ в этом направлении посвящено изучению эффекта какого-либо единичного трансгена, однако есть и сообщения об успешном использовании комбинаций различных генов (Selitrennikoff, 2001). Создание трансформирующей системы, обеспечивающей улучшение качеств растения сразу по нескольким направлениям, положительно отразится на селекционной привлекательности и потенциале модифицированных форм сельскохозяйственных культур.

Вместе с тем, необходимость комплексного улучшения свойств трансформируемого растения ставит ряд задач нового уровня. Во-первых, последовательное введение нескольких трансгенов существенно усложняет процедуру трансформации, делает ее более дорогостоящей, долгой и трудоемкой. Во-вторых, для каждого трансгена необходимо создавать трансфер-вектор с индивидуальным селективным маркером с целью его отбора из ранее трансформированного материала, что излишне перегружает аппарат экспрессии растения и чревато негативными побочными эффектами, связанными с явлением замолкания трансгена. Таким образом, оптимальным подходом для модификации растения одновременно по ряду направлений является конструирование системы, позволяющей как доставить требуемый набор трансгенов в растение в единовременной процедуре трансформации, так и обеспечить эффективную экспрессию каждого из них.

Для осуществления трансформации растительных клеток необходимо создавать векторы, отвечающие ряду требований. Идеальный плазмидный вектор характеризуется минимальным количеством ДНК, репликацией под ослабленным контролем, присутствием селективных маркеров, наличием полилинкера, не прерывающего необходимую для сохранения плазмиды последовательность. Подобными свойствами обладает вектор pGreen (Hellens et al., 2000), ранее испытанный нами для переноса ряда генов в табак (Бричкова и др., 2002; Шахбазов и др., 2003), картофель (Шахбазов, 2004) и ячмень. В полилинкере этого вектора содержится большое количество уникальных сайтов рестрикции, что облегчает процедуру клонирования генов. Трансфер-вектор должен создаваться с учетом пригодности для различных методик трансформации. Основой может служить T-ДНК различных плазмид, рассчитанных на применение в составе агробактериальных векторных систем, которые в сочетании с хелперной плазмидой являются наиболее эффективными для трансформации ряда сельскохозяйственно ценных культур. Вместе с тем, векторы должны быть пригодны для других методов трансформации (ПЭГ-опосредованный перенос в протопласты, баллистическая трансформация), которые необходимы для переноса генов в растения, труднодоступные для агробактериального метода (в частности, однодольные культуры). В состав векторных T-ДНК должны быть включены кассеты экспрессии целевых генов, включающие в себя мощные универсальные промоторы для эффективной экспрессии в растительных тканях, а также достаточно надежные терминаторы. Кроме того, в T-ДНК в оптимальной по отношению к основной

кассете експресии ориентации должны находиться кассеты экспрессии селективных генов, регуляторные элементы которых отличаются от элементов кассеты экспрессии целевых генов во избежание сайленсинга трансгенов. Наличие участков LB и RB позволяет использовать вектор pGreen для агробактериальной трансформации растений. Присутствие в векторе гена *bar*, находящегося под контролем растительного промотора нопалин-синтетазы и отвечающего за устойчивость к фосфинотрицину, облегчает отбор растительных трансформантов на селективной среде, позволяет проводить скрининг последующих поколений растений на средах, содержащих селективный агент, а также осуществлять визуальный отбор трансформантов после обработки соответствующими антибиотиками или гербицидами. Одновременно с функцией селекции данный ген впоследствии может использоваться как агент устойчивости растения при обработке гербицидами на основе фосфинотрицина (Баста, биалафос, глүфосинат).

В качестве генов-кандидатов, целесообразных для создания комбинированной системы, были предложены ген эндохитиназы *chiA-Spl* как фактор повышенной устойчивости к фитопатогенам (Chernin et al., 1997), а также ген рамнозилтрансферазы *rhIB* как фактор толерантности к тяжелым металлам и нефтепродуктам. Свойства каждого из этих генов в отдельности были предварительно проверены на трансгенных растениях (Бричкова, Картель, 2003, Шахбазов, 2005).

В данной работе был использован ген эндохитиназы бактериального происхождения *chiA-Spl*, выделенный из микроорганизма *Serratia plymuthica* (Chernin et al., 1997), кодирующий фермент с молекулярной массой 61 кДа и имеющий длину 1854 п.н. Защитный эффект хитиназ основан на их способности расщеплять хитин – неветвящийся полимер β -1,4-связанных сахаров N-ацетилглюкозаминов, являющийся одним из основных компонентов клеточной стенки грибных патогенов, что вызывает нарушение ее структуры и осмотический стресс, приводящий к гибели возбудителя. Помимо грибных патогенов, хитин содержат насекомые – как в составе экзоскелета, так и в периотрофной мембране; в отношении их также показан протективный эффект трансгенов хитиназы – в частности, против тли *Aulacorthum solani*, *Lacanobia oleracea*, *Oryzaephilus mercator* и др. (Lorito et al., 1998). Исследователи, выделившие ген, показали высокую активность хитиназы в бактериальных системах экспрессии и значительную способность ингибировать рост грибных патогенов растений (Chernin et al., 1997), подтвержденную позже в системе растительной экспрессии (Шахбазов, 2005).

Ген *rhIB*, выделенный из бактерии *Pseudomonas aeruginosa*, имеет длину 1281 п.н. и кодирует каталитическую субъединицу рамнозилтрансферазы с молекулярной массой 47 кДа, ответственную за синтез биосурфактантов рамнолипидов. Рамнолипиды, продуцируемые *P.aeruginosa*, относятся к наиболее эффективным биосурфактантам, которые используются для удаления гидрофобных веществ из загрязненных почв (Mata-Sandoval et al., 1999). Они характеризуются слабым поверхностным натяжением (30-32 мН/м), интенсивной эмульсифицирующей активностью (10,4 – 15,5 У/мл фильтрата), низкой величиной критической мицеллярной концентрации (СМК) (5-65 мг/л) и высокой аффинностью по отношению к гидрофобным органическим молекулам (Van Dyke et al., 1993). Эти свойства придают рамнолипидам оптимальные качества для удаления загрязнителей из почвенной системы. На модельной культуре табака было показано, что трансгенные растения, экспрессирующие рамнозилтрансферазу, проявляют высокую степень толерантности к загрязнению почвы нефтепродуктами (Бричкова и др., 2003).

Методика исследования

Векторы и штаммы. Ген *rhIB* из *P.aeruginosa* был любезно предоставлен Александром Сорокиным (John Innes Centre, Великобритания). Для экспрессии в растениях ген был вырезан из плазмиды pGEM-7Zf при помощи ферментов XbaI и SacI и лигирован с вектором pGreen0229, несущим ген *bar* в качестве селективного маркера и агента устойчивости к гербицидам, а также терминатор *ags*. Методом лигирования в участок полученной конструкции добавляли суперпромотор pMPS-2 (PmasPmasPmas) по сайтам KpnI и EcoRI. В результате была получена конструкция pAS51, содержащая ген *rhIB* под контролем суперпромотора маннопин-синтетазы и терминатора агропин-синтетазы. Ген хитиназы из *S. plymuthica* был любезно предоставлен Леонидом Черниным (The Hebrew University of Jerusalem, Израиль). С целью создания вектора pGreen:*rhIB:chiA* для трансформации растений ген хитиназы был вырезан из плазмиды pGEM по сайтам *Bsp120I* и *Ecl136II*, встроен в плазмиду pDH51 в промотор-терминаторную кассету CaMV 35S (вируса мозаики цветной капусты) по сайту *SmaI*. Далее кассета экспрессии с геном *chiA* была вырезана по сайту *HindIII* и встроена в вектор pAS51 по сайту *EcoRI*. При процедурах молекулярного клонирования использовались реактивы Fermentas, Promega и New England Biolabs. Несовпадающие концы сайтов рестрикции достраивались полимеразой Кленова. Результирующий вектор pGreen:*rhIB:chiA* был введен методом кальциевой трансфекции в штамм *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, несущий хелперную плазмиду pSoup.

Растительный материал. Для трансформации использовались молодые листья табака *N.tabaccum* cv.Petit Havana SR1, выращенного *in vitro* при температуре 24/18°C, в условиях 16-часового светового дня и освещенности 1000-2000 лк (Potrycus et al., 1991).

Создание трансгенных растений. Трансформация растений табака проводилась методом кокультивации эксплантов с суспензией агробактерий. Также рестрицированный эндонуклеазой *ScaI* вектор pGreen:*rhIB:chiA* использовался при ПЭГ-опосредованном переносе в протопласты табака. Каллусогенез и отбор трансформантов велись на среде MS с добавлением витаминов и фитогормонов, содержащей 20 мг/л фосфинотрицина (PPT) в качестве селективного агента.

Молекулярно-генетический анализ. Из растений, устойчивых к PPT, выделяли ДНК и РНК. Наличие и экспрессию трансгенов в растениях определяли методом полимеразной цепной реакции на приборе iCycler iQ (Bio-Rad).

Анализ толерантности к загрязнению почвы. Трансформанты, укорененные *in vitro*, высаживались в почву с добавлением нефти в концентрации 8 г/кг. Морфометрические характеристики оценивались через 3-4 недели. В качестве отрицательного контроля использовался нетрансгенный табак, в качестве положительного контроля – табак, несущий только ген *rhIB*.

Биотестирование. Для изучения воздействия интродукции гена *chiA* на рост фитопатогенов использовался тест на ингибирование латерального роста колонии патогенов экстрактом растения по описанному методу (Roberts, Selitrennikoff, 1988). В качестве объекта для исследований выбран грибной патоген *Fusarium oxysporum*, слабопатогенный для табака, но патогенный для многих хозяйственно ценных культур. На основании обсчета зон роста определялись параметры прироста *Fusarium oxysporum* в процентах относительно первоначального размера колонии с целью внутреннего нормирования данных и рассчитывался ингибирующий эффект по отношению к контролю. В качестве отрицательного контроля использовался нетрансгенный табак, в качестве положительного контроля – табак, несущий только ген *chiA*.

Изучение наследования трансгена. Семена поколений T1 и T2 высаживались на селективную среду MS с добавлением 20 мг/л фосфинотрицина, после чего анализировалось соотношение проросших и укоренившихся семян к погибшим с целью установления характера расщепления.

Результаты и обсуждение

В результате работ по молекулярному клонированию был создан вектор pGreen:*rhIB:chiA*, несущий три функциональных трансгена в различных кассетах экспрессии с целью предотвращения сайленсинга трансгенов (рис. 1). В итоговую конструкцию вошли ген фосфинотрицинацетилтрансферазы *bar* в *nos*-кассете, обеспечивающий устойчивость к гербицидам на основе фосфинотрицина, ген эндохитиназы *chiA* в CaMV-кассете, как фактор устойчивости к грибным фитопатогенам, и ген рамнозилтрансферазы *rhIB* в Pmas-ags кассете с целью обеспечения толерантности к загрязнению почвы.

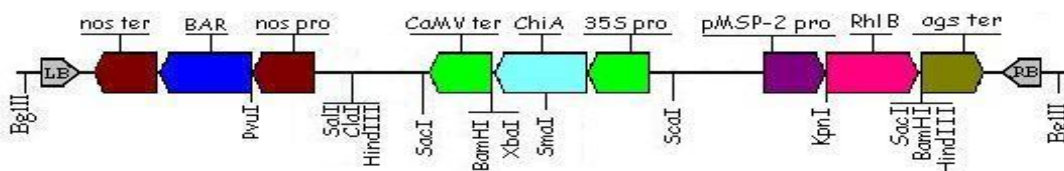


Рис. 1. Схема Т-ДНК вектора pGreen:*rhIB:chiA*

Посредством агробактериальной трансформации листовых эксплантов и ПЭГ-опосредованной трансформации протопластов был получен ряд регенерантов табака *Nicotiana tabaccum* cv.Petit Havana SR1, среди которых были отобраны 4 линии для дальнейших экспериментов. Тесты на укоренение регенерантов, проведенные на среде с содержанием 20 мг/мл фосфинотрицина, показали способность трансгенных растений, в отличие от контрольных, укореняться в присутствии селективного агента.

С целью анализа наличия и экспрессии трансгенов в геноме регенерантов из них была выделена ДНК и РНК. Синтез комплементарной ДНК с РНК осуществлялся с применением набора RevertAid (Fermentas). ПЦР-анализ ДНК и кДНК проводился с использованием трансген-специфичных праймеров, подобранных с использованием ПО Genesinger. Амплификация, проведенная на термоциклере iCycler с последующим разделением ампликонов в агарозном геле и визуализацией на системе Gel-Doc 2000, подтвердила как наличие трансгенной вставки в геноме табака, так и считывание трансгенной мРНК транскрипционным аппаратом растений.

Таким образом, в результате экспериментов по трансформации была создана коллекция трансгенных растений табака, несущих гены эндохитиназы, рамнозилтрансферазы и

фосфинотрицинацетилтрансферазы, полученных посредством единовременного введения трех функциональных генов, размещенных на векторе *pGreen:rhIB:chiA*. Эксперименты по скрещиванию трансформантов с нетрансгенными формами и последующим беккроссированием показали, что расщепление по наличию трансгенной вставки в поколениях T1 и T2 соответствует менделевской модели моногенного наследования (рис. 2).



Рис. 2. Наследование трансгенной вставки (селекция на PPT 20)

Слева – расщепление 3:1 после самоопыления трансгенного табака

Справа – высев семян нетрансгенного табака на PPT 20

В опытах по оценке толерантности полученных трансгенных растений к загрязнению почвы трансформанты, несущие вставку *pGreen:rhIB:chiA*, показали существенное преимущество по сравнению с контрольными растениями на сублетальных концентрациях сырой нефти (рис. 3). Трансгенные растения табака, содержащие только рамнозилтрансферазу, показали сопоставимую степень толерантности, что предполагает стабильное функционирование трансгена *rhIB* в испытываемой мультитрансгенной системе.



контроль *rhIB*



контроль *rhIB+chiA*

Рис. 3. Сравнительный анализ толерантности трансгенных растений к загрязнению почвы нефтью (8 г/кг)

«Контроль» – нетрансгенные растения табака, «*rhIB*» – трансгенные растения табака, содержащие только трансген рамнозилтрансферазы, «*rhIB+chiA*» – трансгенные растения табака, несущие вставку *pGreen:rhIB:chiA*

Биотестирование полученных трансгенных растений показало их способность подавлять рост колоний гриба *Fusarium oxysporum* (недельный прирост 32,4%, SD 4,08) в сравнении с контрольными растениями (недельный прирост 47,7%, SD 6,66). В то же время, трансгенные растения табака, содержащие только трансген хитиназы *chiA*, показали несколько большее ингибирование – прирост составил 27,6% (SD 4,05), что может свидетельствовать о некотором снижении эффективности данного трансгена в комбинированной системе (рис. 4).

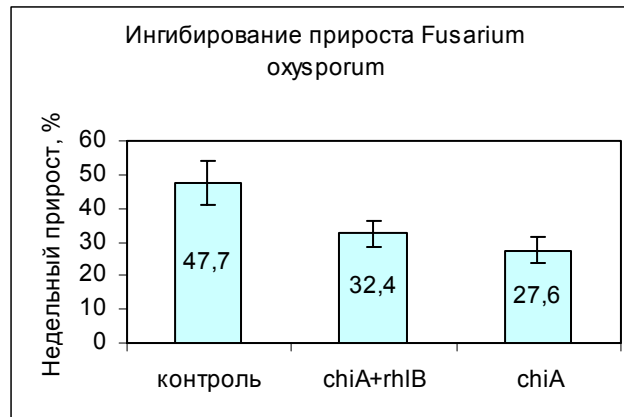


Рис. 4. Результаты биотестирования на способность экстракта трансгенных растений ингибировать рост патогена *Fusarium oxysporum*
 «Контроль» - нетрансгенные растения табака, «chiA» - трансгенные растения табака, содержащие только трансген хитиназы, «chiA+rhIB» - трансгенные растения табака, несущие вставку pGreen:rhIB:chiA

Выводы

Таким образом, в рамках данного исследования были созданы вектор, обеспечивающий комбинированную конститутивную экспрессию эндохитиназы, рамнозилтрансферазы и фосфинотрицинацетилтрансферазы в растениях, и агробактериальный штамм на его основе. Выгодной особенностью системы явилась возможность одновременной доставки трех агрономически полезных трансгенов в геном растения. Получены трансгенные растения табака и показана экспрессия и биологический эффект трансгенов, ведущий к улучшению качества растения по нескольким направлениям – устойчивости к гербицидам, ингибированию роста фитопатогенов, толерантности к загрязнениям почвы. Показано, что комбинированная система способна обеспечить экспрессию трансгенов со всех включенных в нее кассет на уровне, достижимом при индивидуальной трансформации, либо близком к нему. В частности, экспрессия гена *rhIB*, размещенного под суперпромотором pMPS-2 (PmasPmasPmas), соответствует уровню для монотрансгенной системы, тогда как хитиназа под 35S-промотором экспрессируется несколько слабее аналога (в обоих случаях данные гены экспрессировались в монотрансгенных системах под теми же промоторами) (Бричкова и др., 2003; Шахбазов, 2005). Некоторое снижение экспрессии одного из трансгенов может объясняться тем, что встраивание двух чужеродных генов нередко приводит к конкуренции продуктов этих генов (эффект интерференции) (Dhranker et al., 2002). Вместе с тем сохранение в существенной мере способности к подавлению роста фитопатогена наряду с высокой толерантностью к загрязнению почвы свидетельствует о пригодности предложенной системы для совместной доставки и экспрессии трансгенов.

Гены эндохитиназы из *Serratia plymuthica* и рамнозилтрансферазы из *Pseudomonas aeruginosa* сами по себе являются относительно новыми в плане экспрессии в трансгенных растениях, изучение их эффекта продолжается и в настоящее время. В частности, для эндохитиназы было показано ингибирование роста патогенов *Botrytis cinerea* и *Alternaria solani* (Шахбазов и др., 2006), а для рамнозилтрансферазы – способность повышать толерантность растений к загрязнению почвы тяжелыми металлами (Cs, Pb, Co, Cu, Ni) (Бричкова, Картель, 2003). Мы рассчитываем, что при комбинированной экспрессии трансгенов эти их свойства также получат подтверждение.

Созданная и изученная в рамках данного исследования система мультигенной экспрессии может быть использована в селекции для получения агрономически ценных форм сельскохозяйственных культур, обладающих повышенной устойчивостью к фитопатогенам, гербицидам и загрязнению почвы.

Список литературы

- Бричкова Г.Г., Сорокин А.П., Манешина Т.В. и др. Создание трансгенных растений *Arabidopsis thaliana* для эффективной ремедиации территорий, загрязненных углеводородами нефти // Доклады Национальной академии наук Беларуси. – 2003. – Т.47, №5. – С. 72–75.
- Бричкова Г.Г., Картель Н.А., Поликсенова В.Д. и др. Использование *Nicotiana tabacum* как модельного объекта для создания трансгенных растений, устойчивых к фитопатогенам // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2002. – №4. – С. 24–28.

- Бричкова Г.Г., Картель Н.А. Использование растений для очистки территорий, загрязненных тяжелыми металлами // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2003. – №1. – С. 100–106.
- Шахбазов А.В., Ярмолинский Д.Г., Панюш А.С., Картель Н.А. Векторная система pGreen и ее применение для трансформации белорусских сортов картофеля // Материалы Международной научной конференции «Молекулярная генетика, геномика и биотехнология». - Минск, 2004. – С. 202–203.
- Шахбазов А.В., Бричкова Г.Г., Панюш А.С. и др. Агробактериальная трансформация растений *Solanaceae* с применением баллистического никирования // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2003. – №3. – С. 38–41.
- Шахбазов А.В. Экспрессия и наследование трансгена бактериальной эндохитиназы в растениях табака // Доклады НАН Беларуси. - 2005. – Т.49, №5. – С. 86–88.
- Шахбазов А.В., Панюш А.С., Чернин Л.С., Картель Н.А. Трансформация белорусских сортов картофеля генами, кодирующими PR-протеины // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. – 2006. – №2. – С. 50–54.
- Chernin L.S., De La Fuente L., Sobolev V. et al. Molecular cloning, structural analysis and expression in *E. coli* of a chitinase gene from *Enterobacter agglomerans*. Appl. and Env. Microbiol.- 1997. – №63. - P. 834 – 839.
- Dhranker O.P., Li Y., Rosen B.P. et al. Engineering tolerance and hyperaccumulation of arsenic in plants by combining arsenate reductase and γ -glutamylcysteine synthetase expression // Nature Biotechnology. – 2002. – Vol.20. – P. 1140–1141.
- Hellens R.P., Edwards E.A., Leyland N.R. et al. pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium-mediated plant transformation // Plant Mol. Biol. – 2000. – №42 (6). – P. 819–832.
- Lorito M., Woo S., Fernandez I.G. et al. Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1998. – №95. - P. 7860–7865.
- Mata-Sandoval J.C., Karns J., Torrents A. High-performance liquid chromatography method for the characterization of rhamnolipid mixtures produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on corn oil // J. Chromatogr. A. – 1999. – Vol.864. – P. 211–220.
- Potrycus I., Muttelstein-Sheid O., Suatter C., Spangenberg G. Gene transfer to plants. EMBO advanced courses. – Zurich: Swiss Federal Institute of Technology, 1991. – 125p.
- Roberts W.K., Selitrennikoff C.P. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity // J. Gen. Microbiol. - 1988. – №134. - P.169–176.
- Selitrennikoff C.P. Antifungal proteins // Appl. and Env. Microbiol. – 2001. – №67. – P. 2883–2894.
- Van Dyke M.I., Couture P., Brauer M. *Pseudomonas aeruginosa* UG2 rhamnolipid biosurfactants: structural characterization and their use in removing hydrophobic compounds from soil. e.a. // Can. J. Microbiol. – 1993. – Vol.39. – P. 1071–1078.

COMBINED EXPRESSION OF BACTERIAL ENDOCHITINASE AND RHAMNOSYLTRANSFERASE IN TRANSGENIC PLANTS

A.V.Shakhbazau, G.G.Brychkova, T.V.Maneshina, N.A.Kartel

Protective genes of microbial origin are acknowledged as a promising tool to improve valuable traits in transgenic plants, such as pathogen and herbicide resistance and soil contamination tolerance. Within this work, multi-gene plant expression system was created which combines in a single pGreen-based vector endochitinase from *Serratia plymuthica* under 35S CaMV promoter, rhamnolipid transferase from *Pseudomonas aeruginosa* under pMSP-2 promoter and *bar* gene in *nos*-cassette. Transgenic tobacco plants were obtained through agrobacterial transformation and direct gene transfer to protoplasts. Transgene presence and expression were confirmed using PCR and RT-PCR, respectively. Expression of bacterial endochitinase in tobacco markedly inhibited the growth of fungal pathogen *Fusarium oxysporum*, whereas rhamnolipid transferase conferred tolerance to soil contamination with crude oil. Ability to deliver several valuable transgenes in a single transformation experiment can make the developed system a useful tool to improve cultivated crops.

Key words: *transgenic plants, endochitinase, rhamnolipid transferase, combined expression.*

Представлено Є.І.Слобожаніною
Рекомендовано до друку Л.І.Воробйовою