

УДК 581.192.7

В.М. Жукова
Н.И. Рекославская
Р.К. Салаяев
Е.В. Кузнецова
Е.Г. Чеканова

V. Zhukova
N. Pekoslavskaya
R. Salyaev
E. Kuznetsova
E. Chekanova

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ УДФГ-ТРАНСФЕРАЗЫ В МЕТАБОЛИЗМЕ
ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ SOLANUM

STUDY OF A ROLE OF UDFG-TRANSFERASE IN METABOLISM
OF TRANSGENIC SOLANUM PLANTS

Получены трансгенные растения *Solanum tuberosum* L. и *S. demissum* L. в результате трансформации целевого гена *ugt*, выделенного из *Zea mays* при помощи агробактериального вектора. Ген *ugt* кодирует синтез УДФГ-трансферазы. Показано повышение активности УДФГ-трансферазы, изменение ауксинового статуса и устойчивость к гербицидам ауксинового типа у трансгенных растений. Предполагается, что УДФГ-трансфераза играет ключевую роль в ауксиновом обмене в растениях.

Исследования, связанные с генетической модификацией растений, приобрели актуальность и значительно расширяются, так как имеют несомненное прикладное значение и способствуют накоплению новых знаний в фундаментальных биологических науках, раскрывающих механизмы регуляции активности генов в метаболических процессах, ими кодируемых. Особую роль при этом отводят целевым генам, выделенным из донорских организмов, которые определяют высокую вероятность и предсказуемость при создании нового растительного организма на основе их введения.

Познание путей биосинтеза одного из основных фитогормонов индолилуксусной кислоты (ИУК) является интересной и дискуссионной задачей физиологии растений ввиду значительной разветвленности и многовариантности [1], свидетельствующих о высокой адаптивности ростовых процессов. Концентрация свободной ИУК в растениях создается путем баланса между биосинтезом и связыванием, контролируется различными процессами инактивации. К таковым относят необратимую окислительную деградацию ферментным комплексом ИУК – оксидазы. Существует также обратимое инактивирование или запасание путем конъюгирования с различными органическими веществами, в частности, с сахарами при помощи УДФГ-трансферазы с образованием сложных эфиров. Так как конъюгирование ИУК не исключает конверсии синтезированных конъюгатов до свободной формы гормона, то, вероятно, этот процесс и фермент играют существенную роль в регуляции роста и развития растений [2].

В связи с этим изучили роль УДФГ-трансферазы в различных морфологических и метаболических процессах на модельной системе трансгенных растений, полученных при помощи методов генной инженерии. С целью усиления ауксинового статуса осуществили перенос гена *ugt*, кодирующего УДФГ-трансферазу, из кукурузы *Zea mays* L. в растения рода *Solanum* и изучали его экспрессию в трансгенных формах *Solanum*.

Выращенные в асептических условиях черенки безвирусного картофеля *Solanum tuberosum* L. (сорта Бородинский, Гатчинский, Пушкинец, Былина) и дикого вида *S. demissum* L. инфицировали трансконъюгантом путем укола в область покоящейся пазушной почки. Трансконъюгант получали в результате скрещивания бактериальных штаммов: *Escherichia coli* XL1-Blue с pBluescript с клонируемым в ней геном *ugt*, *E. coli* K802 с pRT104, содержащий 35S-промотор, ген *gusA*. В качестве вектора использовали обезоруженный штамм *Agrobacterium tumefaciens* 699 с pCNL65 в EHA105, mod 35-S-*gusA*-int и ген *npt II*. Полученные после

трансформации регенерированные побеги использовали для работы, контролем служили неинфицированные растения. Эффективность прошедшей трансформации подтвердили экспрессией маркерных генов *npt II*, так как трансформированные растения выдерживали скрининг на селективной среде, содержащей 50 мг/л канамицина, в отличие от контрольных. Экспрессию репортерного гена *gusA* определяли, изучая активность маркерного фермента бета-глюкуронидазы: флуориметрический метод анализа выявил интенсивную флуоресценцию во всех образцах из трансформированных растений. Путем гистохимического анализа обнаружили зоны локализации маркерного фермента бета-глюкуронидазы в присутствии субстрата X-Glc по распределению окраски индиго в различных частях и органах растений.

При помощи метода блот-гибридизации по Саузерну в геномной ДНК трансформированных растений выявили интенсивные полосы гибридизации с меченым зондом гена *ugt*. В качестве зонда использовали меченую 32 Р-ЦТФ вставку гена *ugt*, которую выделили из кДНК кукурузы и клонировали в плазмиде *pBluescript* штамма *E. coli* DH5альфа. Полосы гибридизации обнаружили в низкомолекулярной области около 2 т.п.н., 5 т.п.н., 8 т.п.н. и высокомолекулярной около 23 т.п.н. Полосы гибридизации с зондом наблюдали также в ДНК контрольных растений, что свидетельствует о присутствии собственной УДФГ-трансферазы. В то же время эти зоны гибридизации в ДНК были незначительными по интенсивности и отличались количеством полос и областью гибридизации с зондом. ПЦР анализ при использовании праймеров к гену *ugt* из кукурузы показал присутствие этого гена в плазмидной ДНК, выделенной из культуры трансконъюганта, а также в препаратах геномной ДНК трансгенного картофеля 3-х поколений.

Для изучения активности целевого фермента определяли активность УДФГ-трансферазы в буферных вытяжках из клеток исходного бактериального штамма и рекомбинантного (с геном *ugt*) штамма *E. coli* XL1-Blue. Выявили увеличение удельной активности фермента в 300 раз: в рекомбинантном штамме *E. coli* XL1-Blue (6.9 мкмоль/ мг белка) по сравнению с исходным (0.02 мкмоль/мг белка).

У трансгенных растений *Solanum* выявили корреляцию между присутствием кукурузного гена *ugt* в геномной ДНК и активностью фермента УДФГ-трансферазы. Активность фермента во фракциях, полученных из трансгенных растений, в 5 раз была выше по сравнению с контрольными растениями. Самую высокую активность УДФГ-трансферазы в трансгенных растениях *Solanum* обнаружили в цитозольной фракции, а у контрольных растений в пластидной фракции. Как было показано ранее [3], УДФГ-трансфераза из кукурузы являлась цитоплазматическим, а по нашим данным у картофеля – пластидным ферментом.

УДФГ-трансфераза у кукурузы *E. coli* XL1-Blue, вероятно, определяет устойчивость к высоким концентрациям 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д), так как ингибирование фермента происходило только при 40% дозе гербицида [3]. Трансгенные растения в результате трансформации приобрели устойчивость к обработке токсическими дозами 2,4-Д как при выращивании *in vitro* (микрклональном размножении), так и при выращивании в полевых условиях в течение нескольких лет, в отличие от контрольных.

Трансгеноз и экспрессия гена *ugt* способствовали изменению ауксинового статуса у растений. Произошло повышение содержание триптофана (в 1.4 раза), увеличилась скорость биосинтеза ИУК (в 1.8 раза) и гидролиза (на 23%) конъюгатов ИУК, наблюдалось увеличение в 1.4 раза содержания всех форм связанной, суммарной и свободной ИУК.

Таким образом, модификация генома растений рода *Solanum* с помощью методов генной инженерии показала, что УДФГ-трансфераза является ключевым ферментом в регуляции ауксинового статуса, влияет на метаболические процессы и повышает устойчивость растений к повреждающим факторам.

ЛИТЕРАТУРА

Гамбург К.З., Рекославская Н.И., Швецов С.Г. Ауксины в культурах тканей и клеток растений. – Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1990. – 243 с.

Рекославская Н.И. Пути биосинтеза индолилуксусной кислоты и триптофана в созревающем эндосперме кукурузы. Изучение in vitro // Физиология растений, 1995. – Т. 42. – № 2. – С. 165–174.

Leznicki A.J. and Bandurski R.S. Enzymic Synthesis of Indole-3-Acetyl-1-O-b-D-Glucose // Plant Phisiol, 1988. – V. 88. – P. 1474–1480.

SUMMARY

The modification of genom of *Solanum* plants by methods of genetic ingeneering have shown thet UDFG-transferase is the main ferment in regulation of auxine status; it influences the metabolie processes and increases tolerance of plants to harmful factors.