

**ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПЕРОКСИДАЗЫ И
ЭЛЕКТРОФОРТИЧЕСКОЙ ПОДВИЖНОСТИ БЕЛКОВ ЛИСТЬЕВ
КЛЕВЕРА ЛУГОВОГО (*TRIFOLIUM PRATENSE* L.) ПРИ
АГРОБАКТЕРИАЛЬНОЙ
ТРАНСФОРМАЦИИ**

*Янчевская Т.Г., Ковалёва О.А., кандидаты биол. наук,
Гриц А.Н., Лемеза О.В., научные сотрудники*

*Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф Купревича НАН Беларуси,
г. Минск*

Аннотация. Обсуждаются результаты по изменению активности пероксидазы и электрофоретического спектра белков листьев трансформированных и нетрансформированных растений клевера лугового при адаптации трансформантов к условиям выращивания *in vivo* на ионообменном субстрате ТРИОНА и торфогрунте. Оценка уровня экспрессии трансгена в трансформированных растениях по изменению электрофоретического спектра белков и активности пероксидазы подтвердила ранее установленную трансформацию *in planta* растений клевера для 35S-GUS (маркерные гены GUS и E35S-licBSK).

Введение. Совершенствование методов генетической инженерии, а также разработка методов переноса генетического материала в растительную клетку и методов восстановления в условиях *in vitro* из отдельных клеток полноценных трансформантов, позволило модифицировать геномы многих видов растений. Наиболее широко используемый метод трансформации - агробактериальный - был разработан на основе природного процесса. Почвенная бактерия *Agrobacterium tumefaciens* способна инфицировать двудольные растения, вызывая опухоли - корончатые галлы. При этом происходит перенос и встраивание в растительный геном двух групп генов: продукты одних вмешиваются в нормальный метаболизм растения и способствуют разрастанию опухоли, а продукты других синтезируют опины, вещества, не нужные растению, но используемые в пищу бактериями [1, 2]. ДНК бактерий существуют не только в виде хромосом, но и в виде кольцевых молекул (плазмид). Бактерии *Agrobacterium tumefaciens* помимо прочих содержат T1-плазмиды, на которой среди прочих генов имеется так называемая область T-ДНК, который встраивают в ДНК растений. Выяснилось, что агробактерии способны переносить в растения любую ДНК, которая расположена в этом месте плазмиды. Поэтому в плаزمиде природные гены заменяют любыми другими, представляющими научный интерес. Как правило, это два-три гена: целевой; селективный, придающий устойчивость к определенным веществам (чаще всего - антибиотикам), что позволяет трансформированной клетке расти в питательной среде с антибиотиками, в то время как нетрансформированные клетки в ней гибнут; и репортерный ген, позволяющий качественно определить трансформированную клетку по окрашиванию/свечению в ультрафиолетовом свете или иным способом (по изменению активности Red/Ox ферментов).

Для получения трансформантов суспензию агробактерий, содержащих плазмиды с выбранными генами, кокультивируют совместно с органами / тканями растений (эксплантами), из которых регенерируют целые растения. В этой системе агробактерии с помощью vir-белков переносят участок Ti-плазмиды и встраивают его в растительную ДНК. Проблема поиска методов и приемов, повышающих эффективность переноса T-ДНК, остается актуальной для получения трансгенных растений. Выбор экспланта играет существенную роль при проведении процесса агробактериальной трансформации. В работах по получению трансгенных растений с помощью *Agrobacterium tumefaciens* в настоящее время в качестве эксплантов чаще всего используют незрелые зародыши или эмбриогенный каллус. В обоих случаях присутствует этап культивирования тканей *in vitro*, что имеет ряд недостатков. Во-первых, появляется зависимость от морфогенетического потенциала тканей. Во-вторых, условия *in vitro* могут привести к появлению соматональных вариантов, в том числе устойчивых к селективному агенту. Кроме того, растения-регенеранты могут обладать пониженной фертильностью, жизнеспособностью, нести различные уродства. Бобовые считаются сложной культурой для трансформации. Регенерация *in vitro* этой культуры в высокой степени определяется генотипом, и сорта, способные к регенерации, встречаются не часто. В настоящее время осуществляется поиск эксплантов, позволяющих эффективно получать трансгенные растения вне зависимости от морфогенетического потенциала культуры.

Цель настоящей работы – изучить изменение активности пероксидазы и электрофоретической подвижности белков листьев клевера лугового при агробактериальной трансформации и адаптации трансформантов к условиям выращивания *in vivo* на ионообменном субстрате ТРИОНА и торфогрунте.

Материалы и методы исследований. В работе использованы трансгенные (трансформация была показана ранее с помощью метода ПЦР) растения клевера лугового ди- и тетраплоидных сортов: Янтарный, Витебчанин и Цудоуны белорусской селекции (таблица 1).

Таблица 1 – Биологические и хозяйственные признаки используемых сортов клевера лугового (*Trifolium pratense* L.)

Сорт	Плоидность	Созревание укоса	Урожайность зел. массы, ц/га	Содержание сухого вещества, ц/га	Содержание протеина, %
Витебчанин	(2n=14)	среднеспелый	600	110	17,3
Янтарный	(2n=28)	раннеспелый	600	113	16,7

Для трансформации использовали двухдневную культуру *Agrobacterium tumefaciens* AGL0, несущую модельный вектор на основе pGreen 0229 со вставкой 35S-GUS (маркерный ген GUS). Трансформированные и нетрансформированные растения клевера лугового с. Витебчанин, Янтарный и Цудоуны были высажены в пластиковые контейнеры (рис. 1) с ионообменным субстратом ТРИОНА (опыт) и

почвогрунтом “Двина” (контроль, рН 6,4), соответствующим естественным условиям выращивания культуры клевера.



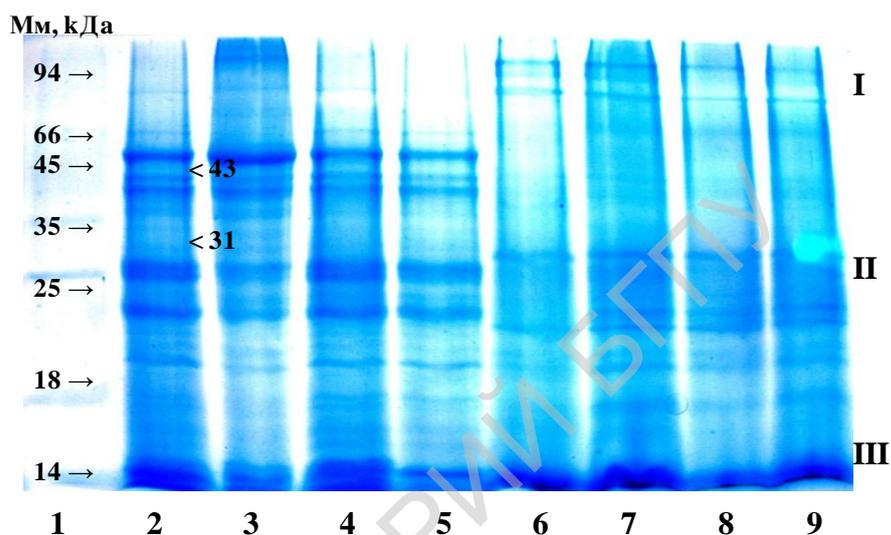
Рисунок 1 – Растения клевера в возрасте 14 суток на разных субстратах

Субстрат ТРИОНА [3, 4] представляет собой композицию, состоящую из ионообменных природных и синтетических полимеров, насыщенных по оптимуму для растений клевера лугового и предназначенных для проведения полной вегетации и получения семян. Трансформированные и контрольные растения клевера лугового выращивали на биотехнических комплексах БТК-1 [4] в контролируемых условиях с искусственным освещением (лампы ДНаЗ-400 при $\lambda_{max} = 594-600$ нм, освещенность 24000 лк, фотопериод 16/8 ч), при влажности воздуха (75-80%) и температуры: днем – $20 \pm 2^\circ\text{C}$, ночью – $17 \pm 2^\circ\text{C}$ [4]. Периодически осуществлялся полив дистиллированной водой.

Содержание белка в образцах определяли с помощью метода Бредфорда [5]. Проведение SDS электрофоретического анализа в ПААГ в денатурирующих условиях осуществляли по Laemmli [6] на приборе для вертикального мини-электрофореза «SE-250» (Amersham Biosciences, Великобритания). Гель переносили в дистиллированную воду и через 2 сут высушивали в целлофановой пленке на вакуумной гелевой сушке «Dry gel Sr» (slab gel dryer-Model SE/60, США). Электрофоретические профили белков растворимых и мембранных белков обрабатывали и анализировали с помощью программы Total Lab Control Centre v.2.01 и Gel-Pro Analyzer v.4.0. Активность пероксидазы изучали микрометодом [7]. В ходе обработки экспериментальных данных вычисляли среднее значение, стандартную ошибку среднего (m), достоверность различий между вариантами определяли с учетом коэффициента Стьюдента (t) для принятого уровня значимости ($p=0,05$). Для статистической обработки экспериментальных данных использовали прикладные пакеты программ «MS Excel 2003», «STATISTICA 6.0», и статистические методы, принятые в области биологических исследований [8].

Результаты и их обсуждение. При разделении белков листьев трансформированных и нетрансформированных растений клевера сортов Цудоуны, Витебчанин и Янтарный не наблюдали существенных различий в сортовой специфичности. При сопоставлении треков трансформантов сорта Цудоуны, выращиваемых при различных условиях минерального питания, наблюдаются вариации по количеству белковых компонентов. На рис.2, количественное увеличение полипептидов с молекулярной массой 55 кДа

прослеживается во всех исследуемых вариантах. Электрофореграмма (рис. 2) условно разбита на три зоны: I – зона медленных белков (катодная часть геля), II – зона средних по подвижности белков, III – зона быстрых белков (анодная часть геля). В зоне медленных белков полосы (I) интенсивно окрашены и ярко выражены. Полосы средней зоны (II) интенсивно окрашены и ее компоненты являются общими для трех сортов клевера лугового. Зона быстрых белков (III) содержит много окрашенных минорных компонентов, которые визуальнo трудно определить. Различия в молекулярном спектре белков в зависимости от условий минерального питания наблюдали только в зоне медленных белков (I) (рис. 2).

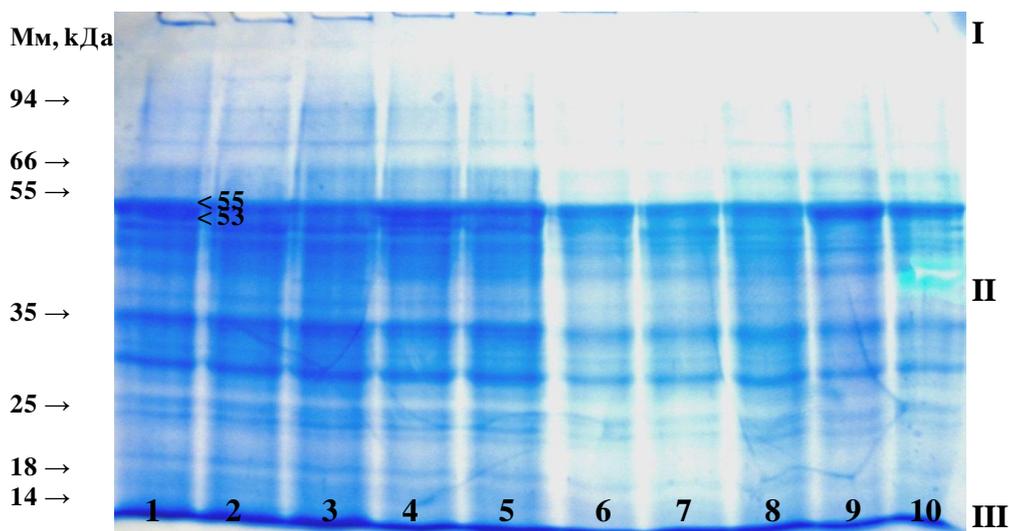


1 - белковые маркеры молекулярных масс: 94, 66,45,35,25,18,14 кДа; 2-5 – растворимая цитоплазматическая фракция белков; 2 – с. Цудоуны, трансформанты, выращенные на ионообменном субстрате; 3 - с. Цудоуны, трансформанты, выращенные на почвогрунте; 4 – с. Витебчанин, нетрансформированные растения, выращенные на почвогрунте; 5 – с. Янтарный, нетрансформированные растения, выращенные на почвогрунте; 6-9 - мембранные фракции. Последовательность описания аналогична предыдущим трекам. I – зона медленных белков, II – зона средних по подвижности белков, III – зона быстрых белков

Рисунок 2 - Электрофоретическое разделение в ПААГ с додецил сульфатом натрия фракции легкорастворимых и общих мембранных белков листьев клевера, выращенных на биотехнологическом комплексе на естественных почвах и искусственных ионообменных субстратах

При анализе мембранных фракций белков листьев клевера следует отметить определенные отличия. Полипептид с молекулярной массой 31 кДа обнаруживается в трансформированных растениях клевера с. Цудоуны и нетрансформированных растениях клевера других сортов, выращенных на почвогрунте (рис. 2). При выращивании трансформантов с. Цудоуны на ионообменном субстрате данный полипептид не обнаруживается. В растворимой фракции белков листьев трансформантов, выращенных на почвогрунте, происходит появление полипептида с молекулярной массой 43 кДа, не наблюдаемого в других вариантах.

Спектры растворимых белков листьев трансформированных и нетрансформированных растений клевера сортов Цудоуны, Витебчанин и Янтарный в различных условиях минерального питания приведены на рис. 3.



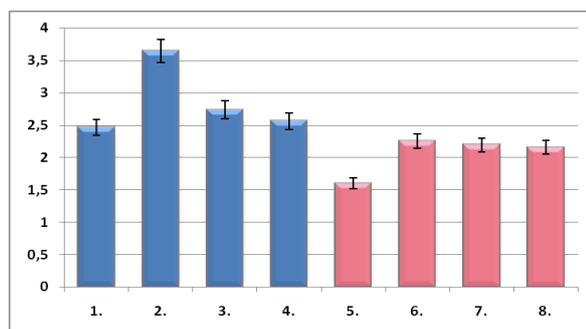
1, 2 - с. Цудоуны, трансформанты, выращенные на ионообменном субстрате; 3 - с. Цудоуны, трансформанты, выращенные на почвогрунте; 4 – с. Витебчанин, выращенные на почвогрунте; 5 – с. Янтарный, выращенные на почвогрунте; 6-10 - повтор треков 1-5 в меньшей концентрации анализируемых образцов. I – зона медленных белков, II – зона средних по подвижности белков, III – зона быстрых белков.

Рисунок 3 - Электрофоретическое разделение в полиакриламидном геле с додецил сульфатом натрия фракции легкорастворимых белков листьев клевера, выращенных на биотехнологическом комплексе на естественных почвах и искусственных ионообменных субстратах

Из рис. 3 видно некоторое перераспределение между полипептидами у трансформантов, адаптированных на ионообменном субстрате, а именно: в треке 1 имеются два полипептида с близкими молекулярными массами 55 и 53 кДа. В трансформантах, выращенных в условиях почвогрунта, такого не наблюдается (треки № 2-3) и спектр полипептидов листьев клевера сортов Витебчанин и Янтарный по белковым компонентам выглядит однородным.

Известно, что значительную роль в ответных реакциях растений на условия окружающей среды оказывают окислительно-восстановительные процессы [9]. Образование активных форм кислорода (АФК) является одним из ранних ответов на внешнее воздействие. В клетках существует динамическое равновесие между образованием АФК и их ликвидацией, которое осуществляется с помощью многокомпонентной системы антиоксидантной защиты, состоящей из низко- и высокомолекулярных компонентов. Одной из них является пероксидаза, способная реагировать на широкий спектр факторов, приводящих к нарушению гомеостаза АФК у растений. Под влиянием внешних факторов у этого фермента меняется активность.

Как показали результаты нашей работы, в ходе онтогенеза *T.pratense* в различных условиях минерального питания наблюдалось варьирование значений активности пероксидазы. Пик максимальной ферментативной активности пероксидазы наблюдался у трансформированных растений с. Цудоуны, выросших на естественных почвах. Активность пероксидазы у этих же растений, но выросших на ионообменном субстрате в 1,5 раза ниже (рис. 4).



1-4 растворимая фракция листьев; 1 - с. Цудоуны, трансформанты на ионообменном субстрате; 2 - с. Цудоуны, трансформанты на почвогрунте; 3 – с. Витебчанин, выращенные на почвогрунте; 4 – с. Янтарный, выращенные на почвогрунте; 5-8 – экстракты хлоропластов.

Последовательность описания аналогична.

Рисунок 4 – Активность пероксидазы в листьях клевера лугового, выращенных на биотехнологическом комплексе на естественных почвах и искусственных ионообменных субстратах

Несмотря на то, что активность пероксидазы возрастала у трансформантов на почвогрунте, при этих же условиях выращивания у нетрансформированных растений с.Витебчанин и с.Янтарный наблюдалось снижение активности фермента (рис. 4). При сравнении активности пероксидазы в экстрактах хлоропластов, следует отметить, что в условиях естественных почвогрунтов она примерно одинакова для трансформированных и нетрансформированных растений различных сортов. На ионообменном субстрате также, как в растворимой фракции листьев, наблюдается снижение ферментативной активности у трансформантов с.Цудоуны, что указывает на отсутствие стрессовых факторов при использовании ионообменного субстрата для адаптации трансформированных растений.

Выводы. Изменения электрофоретических спектров белков подтвердили ранее установленную трансформацию *in planta* растений клевера для 35S-GUS (маркерный ген *GUS* и E35S-*licBSK*). Выявлены условия лучшей адаптации *in vivo* растений клевера на ионообменном субстрате ТРИОНА по данным изменения активности пероксидазы.

Список использованных источников:

1. Ramanathan ,V. Transfer of NON-T-DNA portions of the *Agrobacterium tumefaciens* TI plasmid PTIA6 from the left Terminus of T-L-DNA / V. Ramanathan, K. Veluthambi // PLANT MOL. BIOL. – 1995. – Vol. 28. – P. 1149-1154.
2. De Buck, S. T-DNA vector backbone sequences are frequently integrated into the genome of transgenic plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation / S. De Buck [et al.] // MOL. BREEDING. – 2000. – Vol. 6. – P. 459-468.
3. Патент РБ № 5891. Способ круглогодичного получения мини-клубней картофеля в защищенном грунте / Т.Г. Янчевская, В.А. Бобров, А.Л. Ольшаникова: Заявл. 10.10.2003.

4. Патент РБ № 2579. Устройство для круглогодичного выращивания безвирусных мини-клубней и рассады картофеля / Т.Г. Янчевская, В.А. Бобров, С.А. Пешков: Заявл. 25.08. 2005.
5. Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quatitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. Bradford // *Anal. Biochem.* – 1976. – Vol. 72. – P. 248 - 254.
6. Laemmli, U.K. Cleavage of Stuctural Proteins during Assembly of Heat of Bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // *Nature.* - 1970. - Vol. 227. - P. 680-685.
7. Хайрулин, Р.М. Защитные реакции пшеницы при инфицировании грибными патогенами. 2. Активация анионных изоформ пероксидазы в проростках пшеницы при инфицировании спорами *Tilletia caries* / Р.М. Хайрулин, З.Р. Юсупова, Н.Б. Трошина // *Физиология растений.* - 2000. - Т. 47, № 1. С. 114-119.
8. Рокицкий, П.Ф. Биологическая статистика / П.Ф. Рокицкий // Мн.: В.Ш. – 1973. С. 28 – 50.
9. Урбах, В.Ю. Биометрические методы/ В.Ю. Урбах. - М.: Наука, 1964.-415с.

ЯНЧЕВСКАЯ Т.Г., КОВАЛЁВА О.А., ГРИЦ А.Н., ЛЕМЕЗА О.В.
**ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПЕРОКСИДАЗЫ И
 ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЙ ПОДВИЖНОСТИ БЕЛКОВ ЛИСТЬЕВ
 КЛЕВЕРА ЛУГОВОГО (*TRIFOLIUM PRATENSE* L.) ПРИ
 АГРОБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ**

РЕЗЮМЕ

Обсуждаются результаты по изменению активности пероксидазы и электрофоретического спектра белков листьев трансформированных и нетрансформированных растений клевера лугового при адаптации трансформантов к условиям выращивания *in vivo* на ионообменном субстрате ТРИОНА и торфогрунте. Оценка уровня экспрессии трансгена в трансформированных растениях по изменению электрофоретического спектра белков и активности пероксидазы подтвердила ранее установленную трансформацию *in planta* растений клевера.

YANCHEVSKAYA T.G., KOVALYOVA O.A., GRITZ A.N., LEMEZA O.V.
**CHANGE PEROXIDASE ACTIVITY AND ELECTROPHORETIC MOBILITY
 OF PROTEINS LEAF CLOVER (*TRIFOLIUM PRATENSE* L.) IN
 AGROBACTERIAL TRANSFORMATION**

SUMMARY

It was discussed the results to modify the activity of peroxidase and electrophoretic protein spectrum leaves transformed and not transformed plant clover in adapting the transformants to growing *in vivo* on ion exchange substrate TRIONA and

tradition peat. Assessment of the level of transgenic expression in transformed plants to change the electrophoresis protein and activity spectrum of peroxidase confirmed the previously installed transformations *in planta* clover plants were done.

РЕПОЗИТОРИЙ БГПУ