

Министерство образования и науки РФ
Правительство Иркутской области
Иркутский национальный исследовательский технический университет
Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН
Байкальский биотехнологический центр

ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ (Сборник научных трудов)



По материалам Всероссийской
научно-практической конференции
с международным участием
25-27 июня 2015г.

ИРНТУ 85:
Форум науки и инноваций

Иркутск 2015

Работа поддержана фондом РФФИ 14-14-00924. Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Бетехтин, А. Г. Курс минералогии / А. Г. Бетехтин; Москва : КДУ, 2008. – 619с.
2. Abdullayev, E. Enlargement of halloysite clay nanotube lumen by selective etching of aluminum oxide / E. Abdullayev, A. Joshi, W. Wei, Y. Zhao, Y. Lvov // ACS nano. – 2012. – V.6. – P. 7216–7226.
3. Abdullayev, E. Clay nanotubes for corrosion inhibitor encapsulation: release control with end stoppers / E. Abdullayev, Y. Lvov // J. Mater. Chem. – 2010. – V.20. – P. 6681–6687.
4. Du, M. Newly emerging applications of halloysite nanotubes / M. Du, B. Guo, D. Jia // Polymer Intern. - 2010. - V.59. – P. 574-595.
5. Konnova, S.A Biomimetic cell-mediated three-dimensional assembly of halloysite nanotubes / Konnova, S.A., Sharipova I. R., Demina T., Osin Y. N, Yarullina D. R., Ilinskaya O. N., Lvov Y. M., Fakhrullin R. F. // Chem Commun.- 2013. – v. 49. – P. 4208-4210.

УДК 601.4 579.64

ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ *ARABIDOPSIS THALIANA*, С БАКТЕРИАЛЬНЫМ ГЕНОМ ФИТАЗЫ *PANTOAE AGGLOMERANS*

Ч. Нямсүрэн¹, Л. Р. Валеева¹, Д. С. Трошагина²,
Е.В.Шакиров², М. Р.Шарипова¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет
420008, Россия, г. Казань, ул. Кремлевская 18, Chuka_ch@mail.ru

²University of Texas at Austin, Section of Integrative Biology, Austin,
TX, 78712 USA

Получена новая гетерологичная система экспрессии гена фитазы *Pantoea agglomerans* для тканеспецифической экспрессии в эпителиях корней растений. Вектором трансформировали модельное растение *Arabidopsis thaliana*. Получены независимые гомозиготные линии, содержащие в геноме ген фитазы *P. Agglomerans* под контролем индуцибельного промотора *Pht1;2*.
Ключевые слова: бактериальная фитаза, *Pht1;2* промотор, *Arabidopsis thaliana*.

Одним из важных макроэлементов, необходимым для жизнедеятельности растений, является фосфор. Он играет ключевую роль в фотосинтезе и процессах, связанных с восстановлением энергии. В сельском хозяйстве широко применяют фосфорные удобрения, однако растения усваивают только 10-20% фосфатов, большая часть почвенного фосфора находится в недоступном для растений состоянии (Holford, 1997). Поэтому важной проблемой для сельского хозяйства является возможность утилизации труднодоступных соединений почвы, обогащенных фосфором, таких как фитат. Растения самостоятельно не способны утилизировать фитаты до легко усваиваемых компонентов - остатков фосфорной кислоты и мио-инозитола. [Ma *et al.*, 2012; Singh, Satyanarayana, 2011]. Ферменты фитазы микробного происхождения способны переводить фосфор из фитатов в доступные неорганические соединения. Поэтому поиск микроорганизмов, гены фитаз, которых будут использованы для создания трансгенных растений с улучшенными свойствами, является актуальным. Целью работы явилось получение генетически модифицированных растений *Arabidopsis thaliana*, экспрессирующих бактериальный ген фитазы *Pantoea agglomerans*.

Нуклеотидную последовательность гена бактериальной фитазы *phyCg* оптимизировали для повышения уровня экспрессии в растениях *A. Thaliana* (<http://www.jcat.de/>). Оптимизированный ген бациллярной фитазы клонировали в бинарный вектор *pCBK05* под контролем растительного промотора *Pht1;2*. Экспрессия промотора *Pht1;2* происходит в эпителиальных клетках корней *A. thaliana* и индуцируется недостатком неорганического фосфора в ризосфере (Mudge *et al* 2002). Рекомбинантная конструкция содержала последовательности, кодирующие сигнальный пептид растительного

белка экстенсина AtExt3, необходимого для секреции фермента в ризосферу, и 3'-концевые His- и Strep- последовательности для эффективной детекции и очистки белка (рис. 1).

Полученную конструкцию клонировали в вектор pCBK05 по сайтам рестрикции *Pst*I и *Spe*I и вектор трансформировали в агро-бактерии методом электропорации.

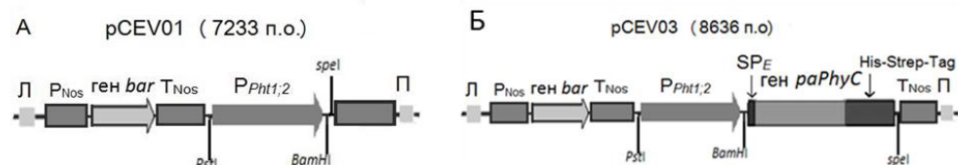


Рис. 1. Бинарные Т-ДНК плазмиды для трансформации растений *Arabidopsis*. А – pCEV01 с растительным промотором *Pht1*; Б – pCEV03 с промотором *Pht1;2* и геном фитазы *P. agglomerans*. *Ppht1;2* – промотор *Pht1;2* эпителиальных клеток корней растений *A. thaliana*; *SPE* – последовательность сигнального пептида растительного гена экстенсина; *Tnos* - терминатор гена нопалинсинтазы; *His-Strep-Tag* – 3'-концевые последовательности пептидных тагов; ген *bar* – ген устойчивости к селективному гербициду BASTA под контролем *Pnos* промотора и *Tnos* терминатора гена нопалинсинтазы; П и Л – правая и левая фланкирующие последовательности Т-ДНК, соответственно; *Pst*I, *Bam*HI, *Spe*I – сайты рестрикции

Проводили трансформацию *A. Thaliana* рекомбинантными бактериями *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (Clough and Bent, 1998). Селекцию трансформантов проводили на среде MS (Murashige-Skoog) с добавлением гербицида BASTA. Из семян растений, трансформированных вектором с бактериальной фитазой *P. agglomerans*, получили 36 трансгенных растений (G2 линия), для 12 из которых наличие гена фитазы подтверждено методом ПЦР (рис. 2). У 5 из 12 линий растений второго поколения (T2), несущих ген *P. agglomerans*, расщепление по селективному признаку составило 3:1 (единичная вставка) (таблица 1). В поколении T3 получили 3 линии растений, гомозиготных по гену микробной фитазы (линии G2-5-1, G2-1-4, G2-19-1). Также получено в качестве нулевого контроля 3 гомозиготных растения, несущих про-

мотор Pht1;2 (A1-1-1, A1-2-5 A1-4-12).

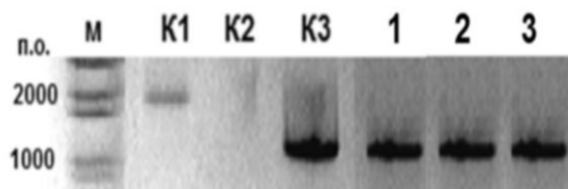


Рис. 2. Электрофорез продуктов амплификации ДНК трансгенных растений T1 поколения с геном бактериальной фитазы под управлением промотора Pht1;2. M -маркер; K1 -ДНК WT с праймерами к промотору Pht1;2 (положительный контроль); K2 -ДНК WT с праймерами к гену фитазы (отрицательный контроль); K3 - ДНК плазмиды pCEV03 с праймерами к гену фитазы (положительный контроль); 1-3 ДНК трансгенного растения с праймерами к гену фитазы *P. agglomerans*. Ожидаемые размеры продуктов ПЦР с праймерами к генам фитаз около 1300 п.о.

Таблица 1. Анализ устойчивости к гербициду BASTA трансгенных растений, трансформированных вектором на основе промотора Pht1;2

Трансгенные растения первого поколения T1	Соотношение устойчивых/чувствительных к гербициду растений в T2	Предполагаемое количество копий T-ДНК в геноме каждой линии
G2-5	131/39 (3:1)	1
G2-1	58/17 (3:1)	1
G2-19	61:26 (3:1)	1
A1-1	67/24 (3:1)	1
A1-2	213/72 (3:1)	1
A1-4	55/19 (3:1)	1

G2 – линии трансгенных растений, несущих гены фитазы *P. agglomerans*;

A1 – линия трансгенных растений, не несущих гена фитазы.

Таким образом, нами получены гомозиготные трансгенные растения с геном микробной фитазы. Биотехнология, основанная на

экспрессии бактериальных фитаз в растениях, может играть существенную роль для решения проблемы фосфорного питания растений в условиях ограниченного применения минеральных фосфорных удобрений.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Clough, S.J. Floral dip: a simplified method of *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* / S.J. Clough, A. F. Bent // The Plant Journal – 1998. – V.16(6). – P. 735-743.
2. Ma, X.-F. Transgenic expression of phytase and acid phosphatase genes in alfalfa (*Medicago sativa*) leads to improved phosphate uptake in natural soils / X.-F.Ma, S. Tudor, T. Butler, Y. Ge, Y. Xi, J. Bouton, M. Harrison, Z.-Y. Wang // Mol. Breeding. – 2012. – V. 30. – P. 377–391.
3. Mudge S.R. Expression analysis suggests novel roles for members of the Pht1 family of phosphate transporters in *Arabidopsis* / S.R. Mudge, A.L. Rae, E. Diatloff, F.W. Smith // Plant J. – 2002. – V. 31(3). – P. 341 – 353.
4. Singh, B. Satyanarayana, T. Microbial phytases in phosphorus acquisition and plant growth promotion / B. Singh, T. Satyanarayana // Physiol. Mol. Biol. Plants. – 2011. – V. 17. – P. 93–103.

УДК 57.052

НОВЫЕ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ В ГЕНОМЕ *BACILLUS PUMILUS*

Н.Л. Рудакова, О.С. Митрофанова, Л. Т. Динь, Н.П. Балабан,
М.Р. Шарипова

Казанский (Приволжский) федеральный университет,
420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, natalialrudakova@mail.ru

В геноме B. pumilus 7P идентифицированы 2 гена металлопротеиназ: секретуемой (mprVp) и мембраносвязанной (ptbVp). Секретуемая металлопротеиназа относится к семейству адамализиноподобных металлопротеиназ клана метцинкинов (AN EU

УДК 601.4 579.64

**СОЗДАНИЕ ЭКСПРЕССИОННОЙ СИСТЕМЫ
СИНТЕТИЧЕСКОГО ГЕНА ФИТАЗЫ
PANTOEA AGGLOMERANS**

Хабипова Н. Н.¹, Валеева Л. Р.¹, Нямсурэн Ч.¹, Нигматуллина Л. Р.¹,
Шакиров Е. В.², Шарипова М. Р.¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет

420008, Россия, г. Казань, ул. Кремлевская 18, Chuka_ch@mail.ru

²University of Texas at Austin, Section of Integrative Biology, Austin, TX,
78712 USA

На основе вектора pET28b и штамма E.coli BL 21 pLysS получена экспрессионная система синтетического гена фитазы P.agglomerans. Наличие синтетического гена фитазы у рекомбинантных штаммов установили с помощью ПЦР – и рестрикционного анализа.

Ключевые слова: фитат, фитазы, Pantoea agglomerans

Фосфор – одним из важнейших элементов, необходимых для роста и жизнедеятельности организмов. Для растений единственным источником фосфора является почвенный раствор, животные получают фосфор вместе с пищей [Balaban *et al.*, 2014, Р. 433-437]. Актуальной проблемой на сегодняшний день является дефицит фосфорного питания растений и животных. В связи с этим, большое внимание привлекает фитат (мио-инозитол гексакисфосфат) - основной резервуар органического фосфора в почве и семенах растений, но растения не могут усваивать фосфор из почвенного фитата. Кроме того, избыток фитатов в почве может стать причиной эвтрофикации водоемов [Lei *et al.*, 2001, Р. 474-481]. Однако многим микроорганизмам за счет наличия у них специфических фосфогидролаз – фитаз удается высвобождать фосфаты, гидролизуя фитат.

Фитаза бактерии *Pantoea agglomerans* (*paPhyc*) обладает высокой активностью, причем свойства фермента (рН- и температурные оптимумы) хорошо соответствуют условиям кислых почв умеренных широт [Greiner, 2004, Р. 577-585]. Эти характеристики

позволяют открыть большие перспективы использования фитазы в сельском хозяйстве, в частности для улучшения роста и урожайности сельскохозяйственных культур.

Современные методы генетической инженерии, а именно молекулярного клонирования, позволяют создать генетические системы, с помощью которых можно получить высокоэффективные рекомбинантные штаммы, экспрессирующие целевые гены и изучить особенности и свойства полученных рекомбинантных ферментов. Получение рекомбинантного штамма, несущего синтетический ген фитазы *P. agglomerans* с оптимизированной нуклеотидной последовательностью для экспрессии в растительном организме, и изучение свойств фермента является одним из этапов исследования регулирования фосфорного обмена.

Цель работы – получение экспрессионной системы на основе синтетического гена фитазы *Pantoea agglomerans*.

Провели клонирование синтетического гена фитазы *P. agglomerans paPhyC* в вектор рЕТ28b. Для экспрессии использовали плазмиду рЕТ28b, относящуюся к экспрессионным векторам рЕТ-системы, и широко используемую для создания гетерологичных систем экспрессии прокариотических и эукариотических рекомбинантных белков.

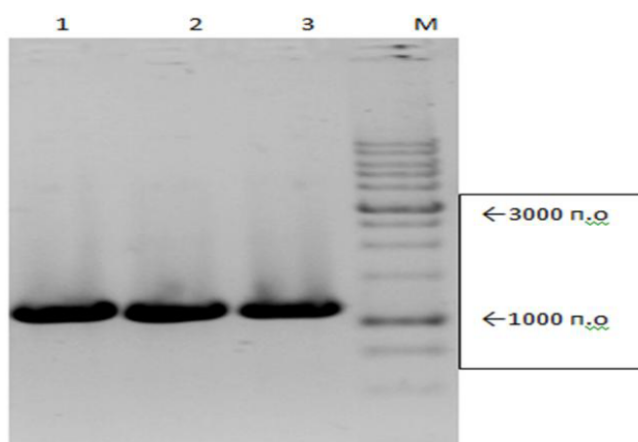


Рис. 1. Электрофорез после амплификации гена фитазы *P.agglomerans* 1 – 3 – пробы по порядку; М – маркер (M12)

Провели амплификацию синтетического гена фитазы *P.agglomerans*. Электрофорез в агарозном геле подтвердил наличие

продуктов реакции амплификации размером около 1200 п.о., что соответствовало длине гена фитазы *paPhyC* (рис. 1).

Для клонирования гена фитазы в рЕТ 28b использовали рестриктазы *NcoI* и *XhoI*, сайты рестрикции для которых имелись на векторе рЕТ 28b и в амплифицированной последовательности гена фитазы *paPhyC*. Рестрицированную последовательность гена и вектор лигировали. Полученную в результате клонирования конструкцию рЕТ 28b *paPhyC* трансформировали в клетки *E.coli* DH 5α. Отбор трансформантов проводили в стерильных условиях на среде LA с добавлением маркерного антибиотика – канамицина (*Km*). Наличие целевого гена идентифицировали с помощью ПЦР-анализа колоний *E.coli* DH5α, трансформированных вектором рЕТ 28b с геном фитазы. Для подтверждения результатов ПЦР-анализа провели рестрикционный анализ полученных колоний с использованием рестриктаз *NcoI* и *XhoI*. Электрофорез продуктов рестрикции показал наличие двух ДНК-фрагментов размером около 5300 и 1200 п.о. только для одной из анализируемых плазмидных ДНК колоний-трансформантов (что соответствовало размерам вектора рЕТ 28b (5368 п.о.) и гена *paPhyC* (1200 п.о.). Таким образом, только одна из полученных колоний несла рекомбинантный вектор. Результаты секвенирования подтвердили полное соответствие гена *paPhyC* на плазмиде рЕТ28b рекомбинантного штамма синтетическому гену фитазы *P.agglomerans*.

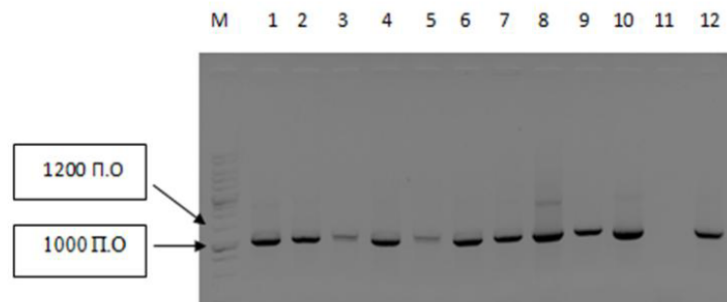


Рис. 2. Электрофорез после ПЦР с колоний *E.coli* BL 21 pLysS М – молекулярный маркер (М 12), 1-10 – образцы по порядку, 11 - отрицательный контроль (плазмида рЕТ 28b), 12 - положительный контроль (плазмида рЕТ 28b *paPhyC*)

Далее провели трансформацию рекомбинантной плазмиды в клетки *E.coli* BL 21 pLysS. Трансформантов отбирали на среде LA с добавлением антибиотиков – *Km* и *Sm*. ПЦР-анализ подтвердил наличие интегрированного гена фитазы *raPhyC* во всех отобранных клонах-трансформантах (рис. 2).

Таким образом, получили экспрессионную систему на основе штамма *E.coli* BL 21 pLysS с интегрированным синтетическим геном фитазы *P.agglomerans*. Дальнейшая экспрессия белка в высокопродуктивном экспрессионном штамме позволит получить фитазу в количествах, необходимых для выделения, очистки и изучения ферментативных и биохимических свойств фермента.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Balaban N.P., Suleimanova A. D., Valeeva L. R., Chastukhina I. B., Sharipova M. R. Inositol Phosphates and their Biological Effects // Biomedical & Pharmacology Journal. 2014. V. 7. P. 433-437.

2. Greiner, R. Degradation of myo-inositol hexakisphosphate by a phytate-degrading enzyme from *Pantoea agglomerans* // The Protein Journal. 2004. V. 23. P. 577–585.

3. Lei, X.G. Stahl C.H. Biotechnological development of effective phytases for mineral nutrition and environmental protection // Appl. Microbiol Biotechnol. 2001. V. 57. P. 474 – 481.

УДК 557.150;576.809.53

РЕТРОИНГИБИРОВАНИЕ НИКОТИНАТ ФОСФОРИБОЗИЛТРАНСФЕРАЗЫ ИЗ CORYNEBACTERIUM FLAVUM ПРОДУКТАМИ РЕАКЦИИ

В.Ж. Цыренов, Н.Г. Дульянинова, А.А. Санданов, Б.Д. Мункуева

Восточно-сибирский государственный университет технологий и управления, 670013, Россия, г. Улан-Удэ, ул. Ключевская 41-а.
esstu.biotechnolodgy@yandex.ru

soils under the influence of Azotobacter and Bacillus bacteria // Journal of Geochemical Exploration. 2015. Vol. 149. P. 52-58.

3. Control over chemical and biological indices of the environment / Edited by L.K. Isayev. SPb: ecological-analytical information centre "Soyuz", 1998. 896 pp.

4. Sokolova M.G., Akimova G.P. Vaishlya O.B. Effect of phytohormones synthesized by rhizosphere bacteria on plants // Applied Biochemistry and Microbiology. 2011. V.47. № 3. P. 302-307.

5. Tessier A., Campbell P.G.C., Bisson M. Sequential extraction procedures for the speciation of particulate trace metals // Anal. Chem. 1979. V. 51. P. 844-851.

6. Vaishlya O.B., Amyago D.M., Guseva N.V. Role of Bacillus Mucilaginosus at Silicon Biogeochemical Cycle in a System "Soil – Plant" // Mineralogical Magazine. 2013. V. 77. P. 2383 (doi:10.1180/minmag.077.5.22).

УДК 601.4 579.64

**РАСТЕНИЯ – ПРОДУЦЕНТЫ МИКРОБНЫХ ФИТАЗ:
ПЕРСПЕКТИВНЫЙ МЕТОД БИОТЕХНОЛОГИИ**

Валеева Л.Р.¹, Нямсүрэн Ч.¹, Трошагина Д.С.¹, Шарипова М.Р.¹,
Шакиров Е.В.²

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, 420008, Россия, г. Казань, ул. Парижской коммуны, 9, lia2107@yandex.ru

²University of Texas at Austin, Section of Integrative Biology, Austin, TX, 78712 USA

Фосфор играет важную роль в функционировании живых организмов в составе таких молекул, как АТФ, фосфолипиды мембран, нуклеиновые кислоты, сигнальные мессенджеры. Исследование фосфорного метаболизма имеет фундаментальное и практическое значение. В связи с сокращением природных запасов минерального неорганического фосфора с каждым годом ощутимой становится

проблема фосфорного дефицита в питании живых организмов [8]. Почвенный фосфор представлен, в основном, органическими соединениями, большая их часть является труднодоступной для растений и животных (фитаты). Фитат (мио-инозитол гексакисфосфат) – лимитирующий фактор роста растений [11]. Растения не способны усваивать фосфор из фитата, хотя его содержание в семенах достигает 60-80% [4]. Фитат, как естественный компонент растительной пищи и корма, ограничивает фосфорное питание животных с однокамерным желудком. Кроме того, фитат связывает многие ионы металлов, белки и сахара, что так же мешает их усвоению [4; 7]. Решением проблемы фосфорного дефицита в питании живых организмов является использование фитата в качестве источника фосфора. Гидролиз мио-инозитол гексакисфосфата осуществляется под действием ферментов фитаз. Растения и животные не синтезируют внеклеточные фитазы, такие ферменты в природе синтезируют многие почвенные микроорганизмы [8].

Цель работы - разработка системы экспрессии микробной фитазы *Pantoea agglomerans* в растениях. Растения *A. thaliana* благодаря короткому жизненному циклу и знанию последовательности генома послужили основой для создания растений, экспрессирующих микробные фитазы.

Векторы и штаммы. Для трансформации растений использовали бинарный вектор pCEV04 с интегрированным модифицированным геном фитазы *P. agglomerans* *AtEx::paPhyC::HisStrep-Tag*. Конструкция экспрессионной системы содержала последовательность гена сигнального пептида экстенсина (*AtEx*), оптимизированный ген фитазы *paPhyC*, *His* и *Strep-Tag* последовательности. Для экспрессии в растениях использовали конститутивный сильный вирусный промотор *CaMV35S*, а также маркерный ген (*bar*) устойчивости к гербициду BASTA под управлением нопаинового промотора и терминатора.

Растения A. thaliana. Для получения трансгенных растений использовали *A. thaliana* (экотип Columbia). Растения-реципиенты дикого типа выращивали на почве в климат-камере с поддержанием условий роста, оптимальных для арабидопсиса: фотопериод 12 ч. день/12 ч. ночь, 20°C. Для трансформации использовали цветущие растения в возрасте 3-4 недель.

Агробактериальная трансформация растений. Трансформацию растений *A. thaliana* проводили методом макания цветков растений в агробактериальную суспензию, содержащую 5% сахарозы с добавлением детергента Silwet L-77 (0.1%) [2]. Селекцию трансформированных растений проводили на чашках Петри на среде MS (Murashige-Skoog) в присутствии гербицида BASTA (25 мкг/мл), с антибиотиком ванкомицином (100 мкг/мл) против контаминантной микрофлоры [5]. Отбор осуществляли по способности растений выживать на среде с гербицидом. Семена перед посевом стерилизовали промыванием 2.5% раствором гипохлорида натрия.

Генотипирование. Выделение ДНК растений проводили по стандартной методике в буфере СТАВ (гексадецилметил-аммонийбромид). Растительную ткань гомогенизировали пестиком в СТАВ-буфере. Для генотипирования линий трансгенных растений использовали прямой праймер к последовательности гена фитазы *P. agglomerans* (5'-саагаааассссгаага-3') и обратный праймер – к внутренней области гена фитазы (5'-тссатассстссааагсстг-3'). Для генотипирования линии О1 использовали прямой праймер к промотору CaMV35S (5'-атссасатасстсгсаа-3') и обратный – к терминатору нопалинсинтазы (5'-сатсгсаагассггсаас-3'). Ожидаемые размеры ПЦР-продуктов – около 400 п.о. Количество копий трансгена в геноме растений определяли по менделевскому расщеплению семян трансгенного поколения, анализируя число выживших и погибших растений на селективной среде с гербицидом BASTA.

ОТ-ПЦР. Для получения кДНК гена фитазы из растительного генома проводили реакцию обратной транскрипции. Тотальную РНК выделяли из тканей растений с использованием TRI-реагента (TRI Reagent RNA Isolation Reagent, Sigma Aldrich). Для избавления от ДНК в пробе добавляли ДНКазу I.

Комплементарную ДНК получали методом обратной транскрипции с использованием набора для получения кДНК «RevertAid (H-) First Strand» по стандартной методике (Fermentas). В качестве праймера использовали последовательность *OligodT*. Для амплификации кДНК растений использовали пары праймеров к началу и внутренней области гена фитазы (длина продукта около 400 п.о.), началу и концу гена фитазы (длина продукта около 1200 п.о.).

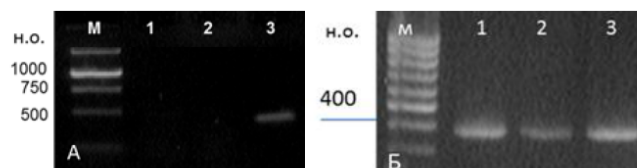


Рис. 1. Электрофорез продуктов амплификации ДНК трансгенных растений: А – ПЦР для растений с интегрированным геном фитазы *P. agglomerans* под управлением промотора CaMV35S (линии E). Размер ПЦР-продукта около 500 п.о. М – маркер; 1 – O1-1 (отрицательный контроль); 2 – O1-2 (отрицательный контроль); 3 – линия E-1. Б – ПЦР на контрольной линии трансгенных растений без гена фитазы (линия O1). Ожидаемый размер ПЦР-продукта – 400 п.о. М – маркер; 1 – O1-1; 2 – O1-2; 3 – плазмидная ДНК (положительный контроль)

Трансформация растений и получение нескольких поколений трансгенных растений. Получили 3 независимые линии (E1, E2, E3 линии) растений T1 при использовании вектора pCEV04 на основе вирусного промотора CaMV35S, содержащего модифицированный ген бактериальной фитазы *raPhyC*. Наличие вставки подтвердили ПЦР (рис.1А). Во втором поколении сегрегация признака трансгенной вставки составила 15:1 у четырех линий растений (E2-7, E2-16, E3-4, E3-5). Получили контрольную линию трансгенных растений без встроенного гена фитазы (O1 линия), содержащую лишь промотор CaMV35S. Наличие трансгенной вставки подтверждено ПЦР (рис.1Б). От растений линий E2-7, E3-4 и O1-1 получили растения третьего поколения с расщеплением по трансгенной вставке близкой 15:1: E2-7-5, E3-4-3, O1-1-5.

Экспрессия РНК гена фитазы в тканях трансгенных растений. Для растений второго поколения с геном фитазы под управлением промотора CaMV35S получили ПЦР-продукты 500 кДа; геномная ДНК в пробах не присутствовала (рис. 2А).

Провели анализ экспрессии РНК фитазы в линиях растений третьего поколения. кДНК амплифицировали с использованием праймеров к началу и концу гена фитазы *raPhyC* (рис.2Б).

Синтез стабильной РНК модифицированного гена фитазы в тканях растений подтвердили секвенированием продуктов амплификации с кДНК транскриптов.

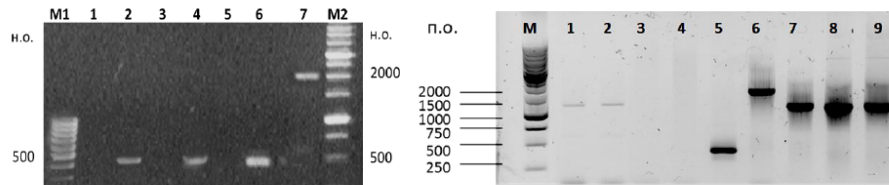


Рис. 2. Электрофорез продуктов амплификации кДНК трансгенных растений второго поколения. А – M1, M2 – ДНК маркеры; 1 – отрицательный контроль, E1 - 1 (праймеры к растительному промотору); 2 – E1-1; 3 – отрицательный контроль, E1-2 (праймеры к растительному промотору); 4 – E1-2; 5 – отрицательный контроль, E1-3 (праймеры к растительному промотору); 6 – E1-3; 7 – положительный контроль, плазмидная ДНК. Ожидаемый размер ПЦР-продукта 500 н.о. Б – М – ДНК маркер; 1 – E2-7-5; 2 – E3-4-3; 3 – отрицательный контроль, E2-7-5 (праймеры к промотору и терминатору); 4 – отрицательный контроль, E3-4-3; 5 – геномная ДНК O1-1-5 (праймеры к промотору и терминатору, около 400-500 п.о.); 6 – геномная ДНК E2-7-5 (праймеры к промотору и терминатору, 1800 п.о.); 7 – геномная ДНК E2-7-5 (праймеры к гену фитазы, 1200 п.о.); 8 – положительный контроль, плазида pCBK05 35S::paPhyC (1800 п.о.); 9 – положительный контроль pCBK05 35S::paPhyC (1200 п.о.)

Создание трансгенных растений с использованием генов микробных фитаз является перспективным направлением в решении проблемы дефицита фосфора в питании живых организмов. Бактериальные фитазы обладают высокой активностью и специфичностью и представляют интерес для создания экспрессионных систем для трансформации растительных клеток. Кислые бактериальные и грибные фитазы широко используются в трансформации растений, причем фитазная активность трансгенных растений, экспрессирующих рекомбинантные кислые фитазы, значительно возрастает по сравнению с диким типом растений, что позволяет таким растениям расти на средах с фитатом [10; 1]. Мы использовали ген кислой фитазы группы HAPs из *P. agglomerans*. Клонирование целевого гена

под управление сильного конститутивного промотора позволило получить высокую экспрессию рекомбинантного белка [3].

Скрининг растений по признаку устойчивости к гербициду BASTA позволил отобрать 3 линии растений с множественной вставкой гена фитазы, и линию без интегрированного гена фитазы с одной копией трансгена в геноме. Проблемой при создании трансгенных растений является элиминация гена. Показано, что во втором и в третьем поколениях растений ген бактериальной фитазы стабильно экспрессировался на уровне транскрипции. Это подтвердило экспрессию белка для полученных линий растений в ряду поколений, что необходимо при получении гомозиготных по трансгенной вставке растений.

Таким образом, разработана гетерологичная система экспрессии гена микробной фитазы в растениях *A. thaliana*, на основе которой получены три поколения трансгенных растений со множественной вставкой интегрированного гена фитазы *P. agglomerans*, стабильно экспрессирующегося на уровне РНК.

Работа выполнена в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров, частично за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности (проект №14-83).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Bilyeu K.D., Zeng P., Coello P., Zhang Z.J., Krishnan H.B., Bailey A., Beuselinck P.R., Polacco J.C. Quantitative conversion of phytate to inorganic phosphorus in soybean seeds expressing a bacterial phytase // *Plant Physiology*. 2008. V. 146. P. 468–477.
2. Clough S.J., Bent A. F. Floral dip: a simplified method of Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* // *The Plant Journal*, 1998. V.16(6). P. 735-743.
3. George T.S., Richardson A.E., Hadobas P.A., Simpson R.J. Characterization of transgenic *Trifolium subterraneum* L. which expresses phyA and releases extracellular phytase: growth and P nutrition in la-

boratory media and soil // Plant, Cee and Environment, 2004. V. 27. P. 1351-1361.

4. Haefner S., Knietsch A., Sholten E., Braun J., Lohscheidt M., Zelder O. Biotechnological production and applications o phytases // Microbiol. Biotechnol, 2005. V.68. P. 588-597.

5. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiol Plant, 1962. V. 15. P. 473–497.

6. Plaxton W.C., Tran H.T. Metabolic adaptations of phosphate-starved plants // Plant physiology, 2011. V. 156. P. 1006-1015.

7. Rao K.V, Rao T.P., Reddy V.D.. Molecular characterization, physicochemical properties, known and potential applications of phytases: An overview // Critical Reviews in Biotechnology, 2009. V. 29(2). P. 182–198.

8. Richardson A. Extracellular secretion of *Aspergillus phytase* from *Arabidopsis* roots enables plants to obtain phosphorus from phytate // The Plant Journal. 2001.V. 25(6). P. 641-649.

9. Singh B., Satyanarayana T. Microbial phytases in phosphorus acquisition and plant growth promotion // Physiol. Mol. Biol. Plants, 2011. V. 17. P. 93–103.

10. Wang, Y., Ye X., Ding G., Xu F. Overexpression of phyA and appA genes improves soil organic phosphorus utilisation and seed phytase activity in *Brassica napus* // PLoS ONE. 2013. V. 8(4). P. 1-9.

УДК: 634.11: 581

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА
КЛОНОВЫХ ПОДВОЕВ ЯБЛОНИ
ПРИ КЛОНАЛЬНОМ МИКРОРАЗМНОЖЕНИИ**

С.Г. Долгих, А.Б. Нурдинова

Казахский научно-исследовательский институт плодородства и виноградарства, Казахстан, 050060, г. Алматы, пр. Гагарина 238/5
e-mail: Dolgikhsvet@mail.ru

Производство высококачественного посадочного материала является важным направлением развития современного садовод-