

*На правах рукописи*

**Колачевская  
Оксана Олеговна**



**ВЛИЯНИЕ ГЕНА БИОСИНТЕЗА АУКСИНА *tms1* ПОД  
КОНТРОЛЕМ КЛУБНЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ПРОМОТОРА  
НА КЛУБНЕОБРАЗОВАНИЕ КАРТОФЕЛЯ *in vitro***

03.01.05 -- физиология и биохимия растений

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва-2015

Работа выполнена в лаборатории сигнальных систем контроля онтогенеза им. академика М.Х. Чайлахяна Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, г. Москва

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук,  
профессор

**Романов Георгий Александрович**

**Официальные оппоненты:**

**Чуб Владимир Викторович**, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, профессор кафедры физиологии растений.

**Шпаковский Георгий Вячеславович**, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, заведующий лабораторией механизмов генной экспрессии.

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Санкт-Петербургский государственный университет, Биолого-почвенный факультет.

Защита состоится 14 апреля 2015 г. в 11 часов на заседании Совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 002.210.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук по адресу: 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35. Факс: (499) 977-80-18, e-mail [m-azarkovich@ippras.ru](mailto:m-azarkovich@ippras.ru); [ifr@ippras.ru](mailto:ifr@ippras.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук [www.ippras.ru](http://www.ippras.ru).

Автореферат разослан 09 февраля 2015 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук



Азаркович Марина Ивановна

**Актуальность проблемы.** Картофель является одной из основных сельскохозяйственных культур в мире, поэтому вопросы регуляции клубнеобразования и роль фитогормонов в этом процессе имеют не только научное, но и большое практическое значение. С помощью классических методов физиологии растений показано, что клубнеобразование у картофеля находится под гормональным контролем. В общих чертах изучена динамика фитогормонов в онтогенезе клубней и выявлена важная роль гиббереллинов (ГА), в основном, как ингибирующих факторов, в гормональной регуляции клубнеобразования (Аксенова и др., 2012). Роль других фитогормонов в клубнеобразовании менее изучена. В случае ауксинов было показано, что введение ИУК в среду культивирования картофеля увеличивало число и ускоряло рост клубней (Аксенова и др., 2000; Romanov et al., 2000), а выросшие в почве крупные клубни содержали ИУК в большей концентрации по сравнению с мелкими клубнями (Пузина, 2000). Недавно путем точных измерений было показано, что концентрация ауксинов в кончиках столонов возрастает в несколько раз непосредственно перед инициацией клубней (Roumeliotis et al., 2012). Все это указывало на существенную роль ауксинов в процессах инициации и роста клубней. Однако к началу работы в литературе отсутствовали сведения о попытках создания новых форм картофеля с модифицированным синтезом ауксина. В этой связи представляло интерес изучить эффекты направленного изменения эндогенного содержания ауксинов в растениях картофеля, с использованием трансгенного подхода. В качестве гена биосинтеза ауксина был выбран агробактериальный ген *tms1*, кодирующий фермент трансформации триптофана в индол-3-ацетамид – прямой предшественник ауксина.

**Цель и задачи исследования.** Целью данной работы являлось изучение влияния трансгена биосинтеза ауксина *tms1* под контролем клубнеспецифичного В33-промотора гена пататина на эндогенное содержание ауксина, а также способности к клубнеобразованию растений картофеля *in vitro* в различных условиях выращивания.

В соответствии с этой целью были поставлены следующие экспериментальные задачи:

- 1) Получить трансформированные растения картофеля, экспрессирующие ген *tms1* с клубнеспецифичным промотором В33.
- 2) Определить уровни экспрессии трансгена *tms1* в клубнях и побегах у разных линий трансформантов.
- 3) Исследовать влияние, оказываемое экспрессией гена *tms1* на эндогенное содержание ауксина и ряда других фитогормонов.
- 4) Изучить влияние трансгена *tms1* на динамику образования клубней в условиях различной длины дня и при различном содержании сахарозы в среде.

- 5) Оценить влияние экзогенных фитогормонов на способность к клубнеобразованию у контрольных и трансформированных геном *tms1* растений.

**Научная новизна.** На основе сконструированных векторов впервые получены трансгенные растения картофеля, содержащие агробактериальный ген биосинтеза ауксина *tms1* под контролем клубнеспецифичного промотора пататина класса I (В33-промотор).

Доказана органоспецифичная экспрессия гена *tms1* в трансгенных растениях: увеличение в 3.5-4.4 раза содержания ауксина в клубнях, но не в побегах В33-*tms1* трансформантов картофеля. Показано, что преимущественная экспрессия *tms1* в клубнях проявляется у большинства трансформированных растений в возрасте 1-2 месяцев, хотя у более старых растений относительный уровень экспрессии этого трансгена варьирует. Обнаружено, что в результате трансформации геном *tms1* в клубнях и побегах растений изменялось эндогенное содержание не только ИУК, но и некоторых других фитогормонов, в частности, жасмоновой и салициловой кислот. Факт повышения уровня ауксина при экспрессии *tms1* прямо указывает на существование у растений картофеля двухстадийного пути биосинтеза ауксина, с индол-3-ацетамидом в качестве промежуточного продукта.

Установлено, что В33-*tms1* трансформанты картофеля характеризуются повышенным уровнем клубнеобразования *in vitro* в большинстве испытанных условий освещения и содержания сахарозы в среде, а степень позитивного влияния экзогенных гормонов (ИУК и кинетина) на клубнеобразование трансгенных растений существенно снижена по сравнению с контролем. Все эти результаты свидетельствуют об участии ауксина в регуляции клубнеобразования у картофеля.

**Практическая значимость.** Впервые предложен и осуществлен способ повышения продуктивности картофеля путем органоспецифичного увеличения содержания ауксина за счет экспрессии рекомбинантной полинуклеотидной последовательности В33:*tms1* преимущественно в клубнях. Полученные результаты могут быть использованы как в дальнейших исследованиях клубнеобразования картофеля, так и на практике. Данные фундаментального характера о направлении и механизмах влияния гена *tms1* с клубнеспецифичным промотором на клубнеобразование картофеля и эндогенные уровни фитогормонов углубляют понимание комплексной гормональной регуляции этого процесса и полезны при подготовке лекционного материала для чтения курсов физиологии, биохимии и генетики растений в высших учебных заведениях. Практическое применение результатов данного исследования дает перспективы получения новых сортов картофеля повышенной урожайности и с более ранним и синхронным образованием клубней независимо от светового режима, что имеет большое значение, например, в высоких широтах.

**Апробация работы.** Материалы диссертации были представлены на Международной научной конференции «Современные аспекты генетической инженерии растений» (Киев, Украина, 2011); VII Международной научной конференции «Регуляция роста, развития и продуктивности растений» (Минск, Беларусь, 2011); VII Съезде Общества физиологов растений России «Физиология растений – фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий» (Нижний Новгород, 2011); Third International Symposium «Intracellular Signalling and Bioactive Molecules Design» (Lviv, Ukraine, 2012); IV и V Всероссийских симпозиумах «Трансгенные растения: технологии создания, биологические свойства, применение, биобезопасность» (Москва, 2012; 2014); Международной конференции «Биология – наука XXI века» (Москва, 2012); Всероссийской научной конференции с международным участием «Инновационные направления современной физиологии растений» (Москва, 2013); Годичном собрании Общества физиологов растений России и Международной научной конференции «Физиология растений – теоретическая основа инновационных агро- и фитобиотехнологий» (Калининград, 2014); International Conference on Bioorganic Chemistry, Biotechnology and Bionanotechnology» (Moscow, 2014).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 20 печатных работ, включая 1 главу в зарубежной монографии и 5 статей, в том числе 2 в зарубежном и отечественном рецензируемых журналах.

**Структура диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения и пяти глав: обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты, обсуждение, заключение и выводы, а также списка цитируемой литературы. Материалы диссертации изложены на 128 страницах машинописного текста, содержат 6 таблиц и 19 рисунков. Список литературы включает 140 источников, в т.ч. 111 зарубежных.

## ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

**Объект исследования и культура *in vitro*.** Объектом исследования служили растения картофеля сорта Дезире, которые выращивали на агаризованной среде Мурасиге-Скуга (МС) без гормонов с добавлением сахарозы (2%). Растения размножали одноузловыми черенками длиной около 1 см, далее культивировали в условиях длинного дня (ДД, световой период 16 ч) при 22-24°C, 4 недели до следующего черенкования. В опытах на клубнеобразование испытывали различное содержание сахарозы в среде: 1, 3, 5 и 8%; условия длинного и короткого (8 ч) дня (КД), а также полной темноты; добавление в среду гормонов: ИУК (1 мг/л) или кинетина (1 мг/л).

**Конструирование рекомбинантных плазмид, содержащих ген *tms1 (iaaM)* под контролем промотора гена пататина В33** (проводилось в лаборатории проф. Я.И. Бурьянова, ФИБХ, Пушкино). Агробактериальный ген триптофанмонооксигеназы

(*tms1*, или *iaaM*), отвечающий за первую стадию 2-стадийного пути биосинтеза ИУК, был клонирован в бинарный вектор pBin-B33 под контроль клубнеспещифичного промотора гена пататина класса I (B33-промотор). Для трансформации растений готовили ночную культуру клеток *Agrobacterium tumefaciens*, содержащих трансформирующий вектор pBin-B33.

**Агробактериальная трансформация картофеля.** Здоровые листья 4-недельных пробирочных растений картофеля отрезали, удаляя 1 мм основания листа и надрезая главную жилку несколько раз поперёк с интервалом 1 мм. Экспланты помещали в чашки Петри с 30-40 мл жидкой среды, содержащей 100 мкл бактериальной суспензии. В одну чашку помещали 10-15 листьев, на каждый эксперимент брали по 3-5 чашек. Чашки помещали на 15 мин на шейкер (50 rpm) при комнатной температуре, и затем инкубировали 48 ч в темноте.

**Регенерация побегов растений.** Спустя двое суток инкубации в жидкой среде с агробактериями экспланты без отмывки переносили надрезами вниз на агаризованную среду для индукции каллусов и инкубировали 7-8 дней в условиях длинного дня при 27°C. За это время из раневой ткани начиналось развитие каллуса. Через неделю экспланты переносили на среду для регенерации побегов и инкубировали ещё 14-17 дней, после чего переносили их на свежую среду такого же состава каждые 10 дней, пока из почек, возникших на каллусе, не развивались побеги 2-3 см в длину. Побеги, достигшие этой длины, переносили на среду MS и в дальнейшем выросшие трансформанты размножали черенкованием, аналогично исходным растениям.

**Выделение ДНК и РНК из растений для ПЦР.** Выделение ДНК из растительных тканей проводили СТАБ-методом; выделение РНК – Тризольным методом.

**Анализ геномной ДНК и кДНК трансгенных растений методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).** ПЦР проводили на амплификаторе Терцик (ДНК-Технология). Реакцию проводили в объёме 25 мкл, содержащем 2.5 мкл dNTP, 2.5 мкл 10x буфера (Силекс), 0.3 мкл Hot-Taq полимеразы, 5 мкл геномной ДНК или 1 мкл кДНК, и по 10 пмоль каждого праймера. После начальной денатурации в течение 2 мин при 95°C проводили 30 циклов ПЦР (денатурация при 95°C в течение 50 с, отжиг при 55°C в течение 60 с, синтез при 72°C в течение 30 с) и выдерживали в конце 5 мин при 72°C.

**ПЦР в режиме реального времени.** ПЦР-РВ осуществляли на амплификаторе АНК-32 (Синтол). Реакцию проводили в объёме 25 мкл, содержащем 12.5 мкл SYBR-Green; 1 мкл кДНК (не менее 100 нг вещества) и по 0.1 мМ каждого праймера. Праймеры подбирали так, чтобы длина амплифицируемых фрагментов составляла ≈100 н.п. Аналитическая повторяемость опытов трехкратная. После начальной денатурации в течение 10 мин при 95°C проводили 30 циклов ПЦР-РВ (денатурация при 95°C в течение 15 сек, отжиг при 60°C в течение 30 сек, синтез при 72°C в

течение 30 сек) и выдерживали в конце 5 мин при 72°C. Исходное количество ДНК-матриц определяли по калибровочным прямым, построенным по данным ПЦР-РВ для генов домашнего хозяйства картофеля (актина и тубулина), взятых в четырёх концентрациях (исходная концентрация ДНК, разведения  $\times 10^{-1}$ ,  $\times 10^{-2}$ ,  $\times 10^{-3}$ ).

**Определение содержания фитогормонов методом ультра-разрешающей жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии (LC-MS/MS)** проводили на базе лаборатории физиологии растений Университета г. Вагенингена, Нидерланды. Для определения ИУК 200 мг растительной ткани растирали в ступке с жидким азотом и дважды экстрагировали 1 мл холодного метанола, содержащего 0.1 нмоль/мл [фенил- $^{13}\text{C}_6$ ]-ИУК в качестве внутреннего стандарта. Объединённые метанольные фракции очищали на анионообменных колонках, высушивали, перерастворяли в смеси ацетонитрил:вода:формалин (25:75:0.1) и пропускали через фильтры Minisart SRP40.45-мм (Sartorius). Количественное определение ИУК проводили с внешним стандартом ИУК на тандемном квадрупольном масс-спектрометре Waters Xevo. Количество ИУК определяли по калибровочной кривой с известными количествами внешних стандартов, с учетом площади пика внутреннего стандарта. Результаты анализировали, используя программное обеспечение MassLynx4.1 (Waters). Аналогичным методом проведено определение ряда фитогормонов и их метаболитов в одной пробе.

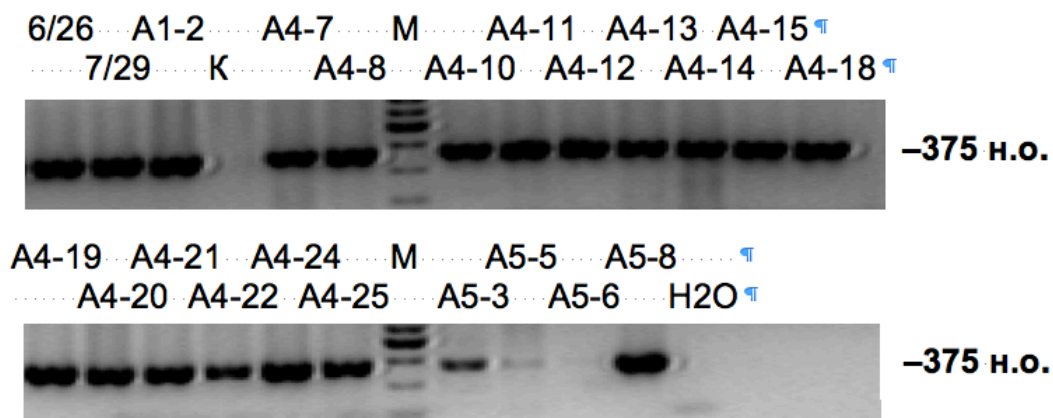
## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Характеристика полученных линий *tms1*-трансформантов картофеля

**Получение трансформированных растений.** На первом этапе исследования на основе вектора клонирования PBS и бинарного вектора pBin-B33 был сконструирован вектор pBin-B33-*tms1*, включающий ген биосинтеза ауксина *tms1*, присоединенный к клубнеспецифичному промотору гена пататина класса I (B33-промотор). Этим вектором были трансформированы агробактерии *Agrobacterium tumefaciens*. Вектор трансформации, кроме целевой конструкции, содержал маркерный ген устойчивости к канамицину (*npt II*), что облегчало отбор трансформированных клонов как бактерий, так и полученных позднее растений. На втором этапе полученные трансгенные агробактерии размножали в жидкой среде LB и проводили агробактериальную трансформацию растений картофеля *Solanum tuberosum* L., используя листовые экспланты (см. «Объекты и методы»). В результате трансформации и последовательных гормональных воздействий на экспланты была получена серия растений-регенерантов, устойчивых к селективному агенту - антибиотику канамицину.

**Отбор и проверка трансформантов.** Для отбора клонов, содержащих целевую конструкцию B33:*tms1*, из молодых листьев этих растений выделяли тотальную ДНК и проводили ПЦР с праймерами, подобранными к встраиваемой конструкции таким образом, чтобы амплифицируемый участок ДНК начинался в последовательности промотора B33, заканчивался в экзоне *tms1* и имел достаточную протяжённость (375

н.о.) (Рис.1). Таким образом, мы исключали из дальнейшей работы линии, где ген синтеза ИУК был интегрирован в геном, но не находился под контролем клубнеспецифичного промотора. Отобранные таким образом растения были размножены черенкованием и выращивались в дальнейшем на среде без антибиотиков, содержащей 2% сахарозы, при 16-часовом (ДД) освещении белым дневным светом, т.е. в условиях, способствующих вегетативному росту надземных органов растений и неблагоприятных для клубнеобразования. В первых же пассажах обнаружилось, что некоторые линии существенно отстают в скорости роста от контрольных растений (линии А4-13 и А4-15) и имеют более мелкие листья. Эти линии не использовали в последующих исследованиях.



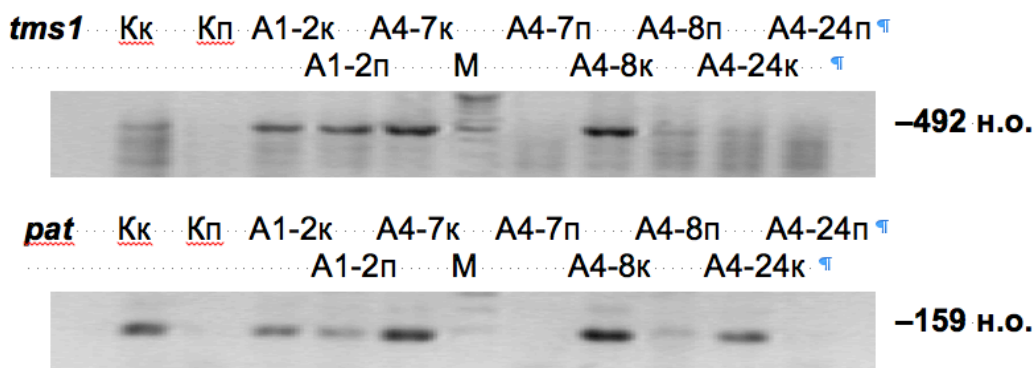
**Рис. 1.** ПЦР-анализ геномной ДНК на наличие конструкции B33:*tms1*. Обозначения продуктов ПЦР: 6/26, 7/29, – плазмидная ДНК разных клонов *E. coli*, содержащая векторную конструкцию; А1-2, А4-7 и др. – ДНК независимо трансформированных этой же конструкцией линий картофеля; К – ДНК контрольных (нетрансформированных) растений; М – маркер молекулярной массы ДНК. Наличие полосы ампликонов размером 375 н.о. доказывает присутствие в ДНК трансгенных линий гена *tms1*, слитого с промотором B33.

Уже на этом этапе обнаружилось, что некоторые линии растений, несущих целевую конструкцию, образуют клубни при выращивании в условиях ДД и низкого содержания сахарозы в среде, хотя обычно этот процесс активизировался после 4-х недель вегетативного роста. Это согласовывалось с данными по положительному влиянию экзогенного ауксина на способность к клубнеобразованию (снижение влияния фотопериода и пороговой концентрации сахарозы), полученными ранее в нашей лаборатории (Аксенова и др., 2000; Romanov et al., 2000).

Из полутора десятков линий трансформированных конструкцией B33:*tms1* растений, для дальнейших исследований были отобраны те, которые мало отличались от контрольных по характеристикам вегетативного роста и развития, но проявляли способность образовывать клубни в неоптимальных условиях. Эти линии в возрасте 4-х недель были проверены на экспрессию встроенного гена методом ОТ-ПЦР после выделения тотальной РНК из клубней и побегов и обратной транскрипции.



Контролем служил ген пататина класса I, экспрессия которого, как и ожидалось, наблюдалась в основном в клубнях. В большинстве отобранных линий трансформантов действительно обнаружилась транскрипция гена *tms1*, которая коррелировала с транскрипцией гена пататина (Рис. 2).



**Рис. 2.** ПЦР-анализ кДНК, полученной обратной транскрипцией на выделенной из клубней (к) и побегов (п) РНК, с праймерами к целевому гену *tms1* (верхний ряд) и контрольному гену «домашнего хозяйства» пататина (нижний ряд). Растения культивировали в течение 4 недель на ДД при 5% содержании сахарозы в среде. Клоны обозначены так же, как на Рис. 1. Результаты показывают корреляцию у большинства линий клубнеспецифичной экспрессии гена пататина класса I и встроенного гена *tms1*.

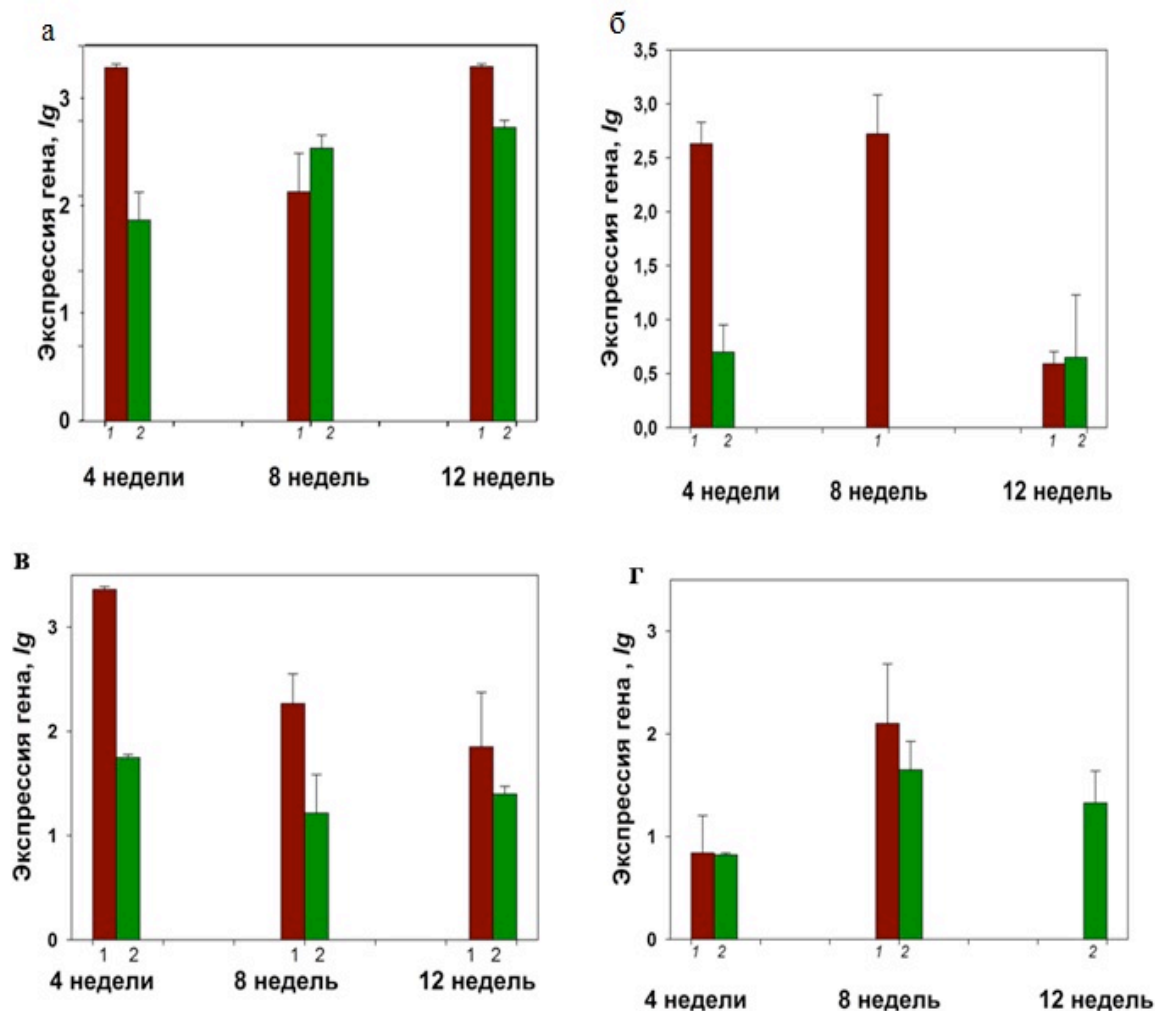
Таким образом, в результате генно-инженерных работ впервые были созданы трансгенные растения картофеля нового типа, экспрессирующие агробактериальный ген биосинтеза ауксина под контролем клубнеспецифичного промотора. Однако факт присутствия и экспрессии трансгена еще не гарантировал сам по себе клубнеспецифичного повышения уровня ауксина.

Поэтому наша дальнейшая работа была направлена на количественное изучение биохимических характеристик полученных трансгенных линий картофеля.

**Анализ экспрессии трансгена.** Измерение уровней экспрессии трансгена *tms1* в клубнях и побегах четырех независимых линий трансформантов проводили методом ПЦР в режиме реального времени, которые показали, что клубнеспецифичность экспрессии выражена в разных линиях в большей или меньшей степени. Экспрессия трансгена в клубнях была активной, чем в побегах, в большинстве измерений, особенно в период роста (4 недели) молодых клубней (Рис. 3). В этом возрасте уровень экспрессии гена *tms1* в клубнях линии А1-2 превышал в 10.2 раза, в клубнях линии А4-7 – в 89 раз, а в линии А4-8 (8-недельные растения) – в 11.6 раз уровень его экспрессии в побегах этих растений. По мере роста клубней уровни экспрессии *tms1* изменялись по-разному, в зависимости от линии (Рис. 3, средние и правые столбики).

Наиболее стабильную экспрессию, и вместе с тем относительно небольшие различия между клубнями и побегами в позднем периоде культивирования показали линии А1-2 (Рис. 3а) и А4-8 (Рис. 3в). Между этими линиями наблюдалось также

сходство по способности к клубнеобразованию. Высокую активность гена *tms1* в клубнях в первые 2 месяца культивирования и резкое снижение её к 3-му месяцу культивирования показала линия А4-7 (Рис. 3б). В отличие от остальных, у линии А4-24 в первый месяц наблюдалась невысокая и примерно равная для клубней и побегов экспрессия *tms1*, а максимум экспрессии приходился на 2-ой месяц (Рис. 3г).

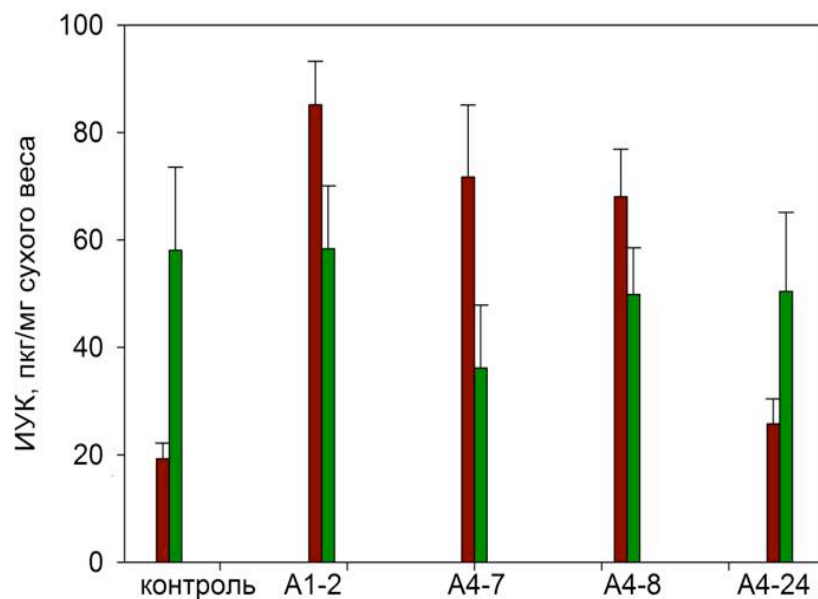


**Рис. 3.** Количественный ПЦР-анализ экспрессии гена *tms1* в клубнях (коричневые столбики) и побегах (зелёные столбики) трансформированных линий картофеля разного возраста. Высота столбиков пропорциональна логарифму относительного содержания транскриптов *tms1*. а) линия А1-2; б) линия А4-7; в) линия А4-8; г) линия А4-24.

Экспрессию трансгена в побегах можно объяснить описанным ранее (Rocha-Sosa et al., 1989; Наумкина и др., 2007) фактом активации промотора В33 высоким (3-10%) уровнем сахарозы, поскольку анализируемые растения выращивали на среде, содержащей 5% сахарозы для стимуляции клубнеобразования.

**Определение содержания ИУК.** Содержание эндогенной ИУК определяли в клубнях и побегах растений возрастом 4 недели методом ультраразрешающей

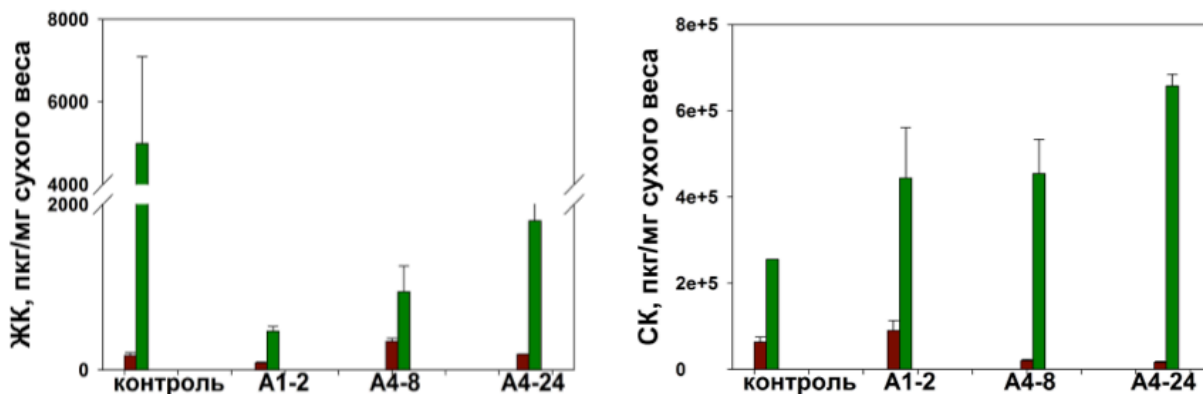
хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией. Из четырёх исследованных линий трансформантов три показали повышенное (в 3.5-4.4 раз) по сравнению с контрольными растениями содержание ИУК в клубнях, самое высокое содержание ИУК отмечено у линии A1-2, несколько более низкое, но сходное между собой у линий A4-7 и A4-8 (Рис. 4). При этом у трансформантов резко повышалось соотношение клубни:побеги содержания эндогенного ауксина до 1.4 в растениях линии A4-8, 1.45 в линии A1-2 и 1.98 в линии A4-7, по сравнению с 0.33 у контрольных растений. Характерно, что клон A4-24 с низким уровнем экспрессии трансгена обнаружил и относительно низкое содержание ИУК в клубнях.



**Рис. 4.** Содержание свободной эндогенной ИУК в клубнях (коричневые столбики) и побегах (зелёные столбики) независимых линий B33:*tms1*-трансформантов картофеля по отношению к ее содержанию у контрольных растений (пунктирная линия). Растения культивировали в течение 4 недель на ДД при 5% содержании сахарозы в среде.

Измерение содержания других фитогормонов в клубнях и побегах трансформантов выявило ряд дополнительных изменений гормонального статуса растений. В частности, в клубнях проявилась общая тенденция повышения содержания жасмоновой кислоты (Рис. 5а) и снижения содержания салициловой кислоты (Рис. 5б). В побегах можно отметить заметное повышение уровня салициловой кислоты (Рис. 5б), а также снижение содержания жасмоновой кислоты (Рис. 5а). Также отмечалось снижение содержания в клубнях цитокининов (данные не приводятся). Можно предположить, что сходные изменения в уровнях эндогенного содержания некоторых фитогормонов, наблюдаемые у всех или большинства линий независимых трансформантов, возникают как следствие изменения содержания ИУК. Надо отметить, что диапазон этих согласованных изменений нецелевых фитогормонов в клубнях в целом существенно меньше, чем диапазон изменений

ИУК, поэтому вряд ли эти изменения могут быть ведущими в проявлении фенотипических эффектов у трансформантов. Разнонаправленные изменения гормонального статуса, обнаруженные у отдельных линий независимых трансформантов, видимо, представляют собой особенности данных линий, которые могут влиять на их ростовые и физиологические свойства.

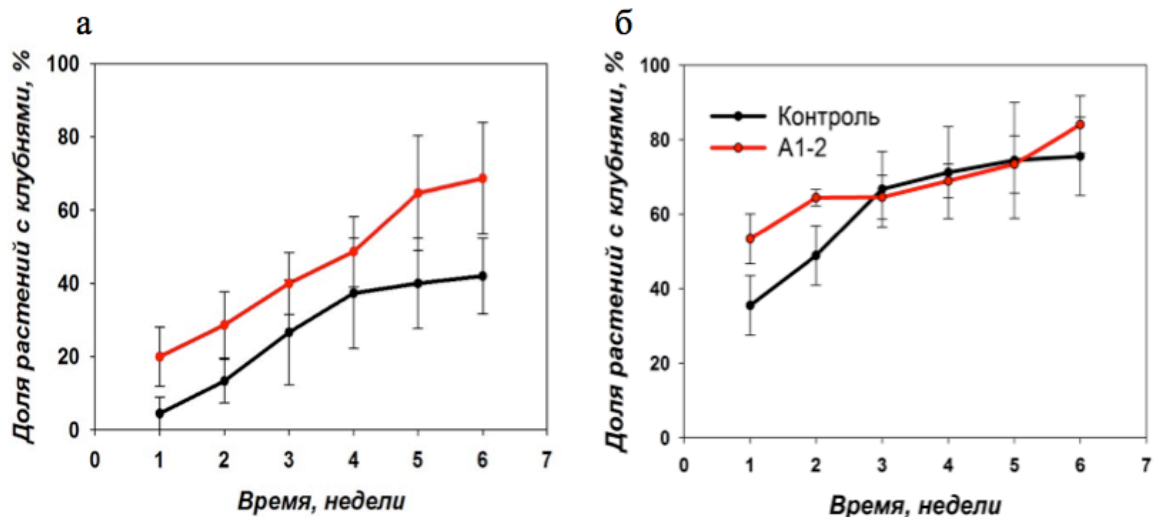


**Рис.5.** Эндогенное содержание жасмоновой кислоты (а) и салициловой кислоты (б) в клубнях и побегах независимых линий В33:*tms1*-трансформантов картофеля и контрольных растений. Растения культивировали в течение 4 недель на ДД при 5% содержании сахарозы в среде.

#### Изучение влияния трансгена *tms1* на динамику образования клубней в условиях различной длины дня

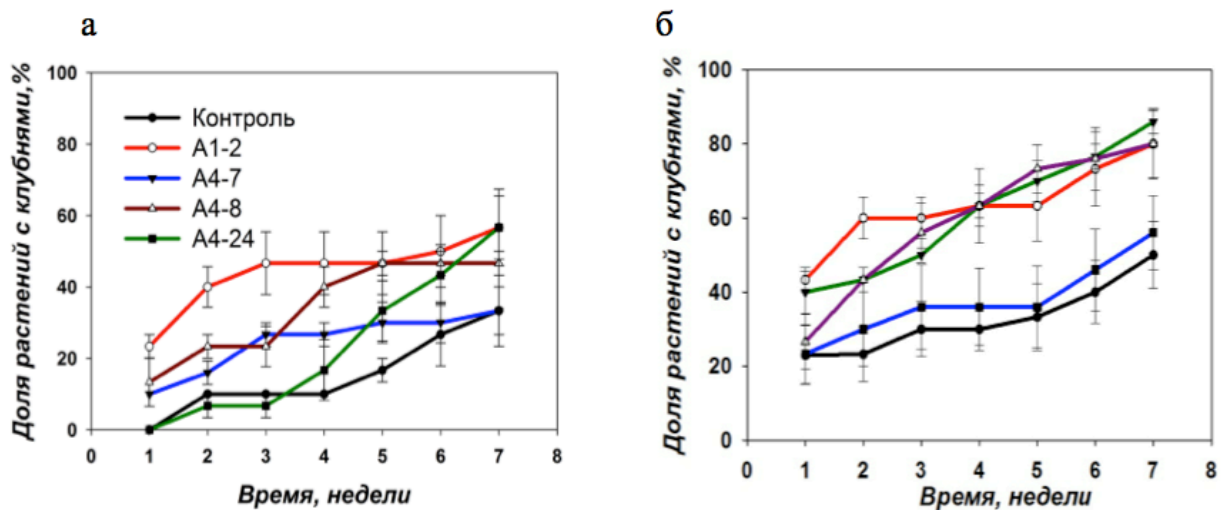
Известно, что клубнеобразование у картофеля находится под комплексным контролем фитогормонов (Prat, 2004; Sarkar, 2008; Aksenova et al., 2014), а при выращивании *in vitro* этот процесс также сильно зависит от содержания сахарозы в среде (Gregory, 1956; Ewing, 1985). Кроме того, формы картофеля различаются по зависимости от длины дня – есть облигатно или факультативно короткодневные и нейтральные сорта. В последние десятилетия для изучения регуляции процессов онтогенеза успешно используются трансгенные формы картофеля. В частности, в предшествующих работах лаборатории (Аксёнова и др. 1999, 2000) было показано, что введение гена *rolB* (ауксиноподобный эффект) под контролем В33-промотора повлияло на морфогенез растений картофеля и снизило зависимость процесса клубнеобразования от экзогенной сахарозы и светового режима.

Наши опыты с трансформантами нестрого-короткодневного сорта Дезире, содержащими ген *tms1*, согласуются с этими результатами. Так, при выращивании растений в темноте при благоприятном содержании сахарозы в среде, инициация клубней у трансформантов по гену *tms1* начиналась на неделю раньше контрольных растений и была более активной в первые 2 недели, после чего различия сглаживались при более высоком содержании сахарозы в среде (8%) и сохранялись при более низком (5%) (Рис. 6).



**Рис. 6.** Динамика клубнеобразования картофеля при выращивании контрольных и В33:*tms1*-растений в темноте на среде МС с различными концентрациями сахарозы: 5% (а) и 8% (б).

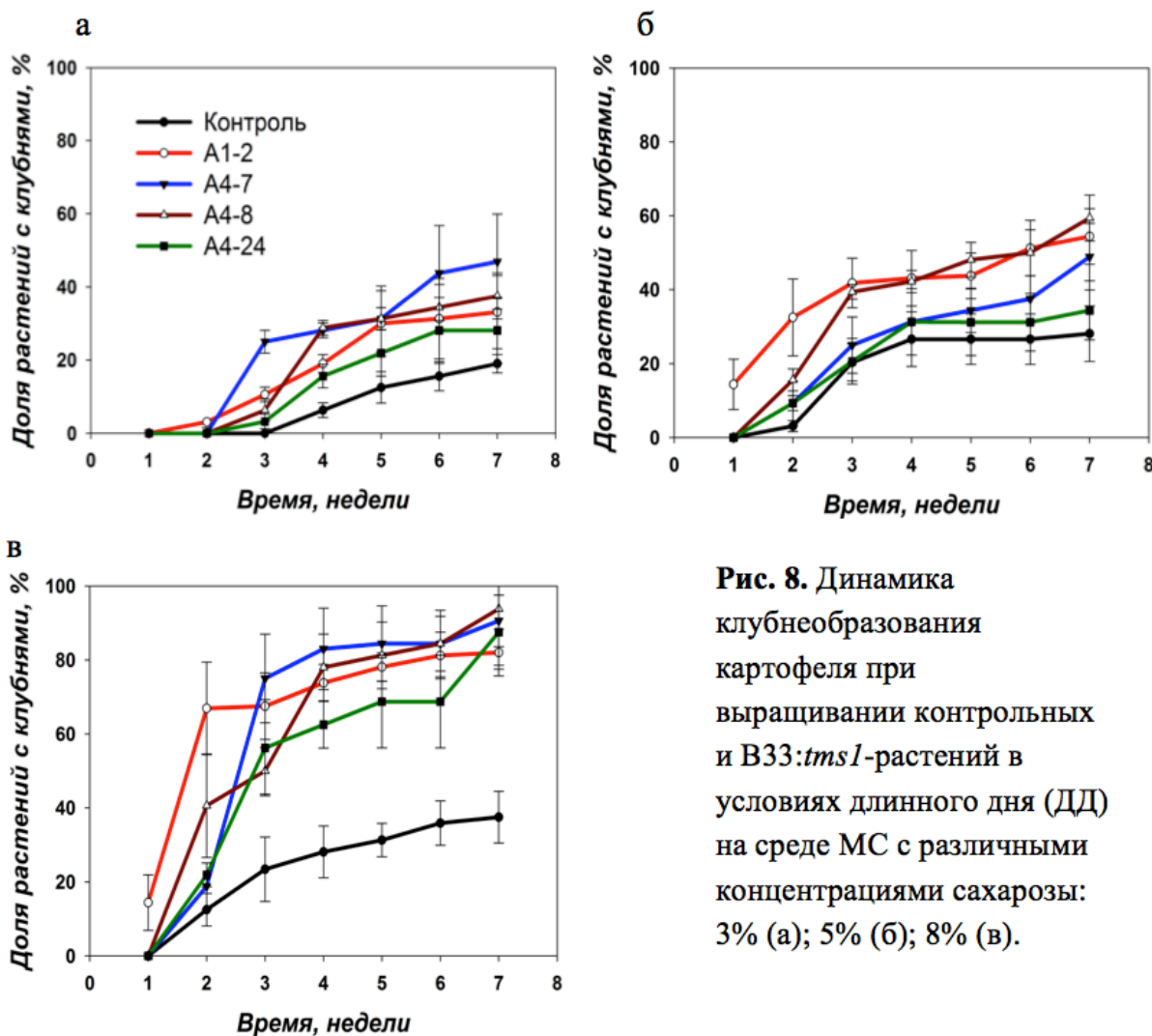
В стимулирующем клубнеобразование световом режиме (КД) все исследованные линии трансгенных растений также начинали формировать клубни на 5-7 дней раньше контрольных растений и процесс заложения клубней происходил у них быстрее, хотя к концу эксперимента различия между ними и контрольными растениями по числу клубней были не очень существенными (в 1.25-1.6 раз) (Рис.7).



**Рис. 7.** Динамика клубнеобразования картофеля при выращивании контрольных и В33:*tms1*-растений в условиях короткого дня (КД) на среде МС с различными концентрациями сахарозы: 5% (а) и 8% (б).

Наибольшие отличия от контрольных растений трансформанты проявили в неиндуцирующих условиях (ДД): здесь индукция клубней начиналась у них даже на бедной по сахарозе среде (3%) на 2-3-й неделе, тогда как контрольные растения

начинали формировать клубни начиная с 4-й недели. При более благоприятном для клубнеобразования содержании сахарозы в среде трансформанты по гену *tms1* закладывали и развивали клубни быстрее и интенсивнее, чем контроль, опережая его в первые 3 недели в 4-5 раз, и сохраняя преимущество в 2 раза в конце эксперимента (6 недель) (Рис. 8). Таким образом, введение гена *tms1* ускоряет переход к клубнеобразованию и его интенсивность как в индуцирующих, так и, в ещё большей степени, в неиндуцирующих условиях освещения.



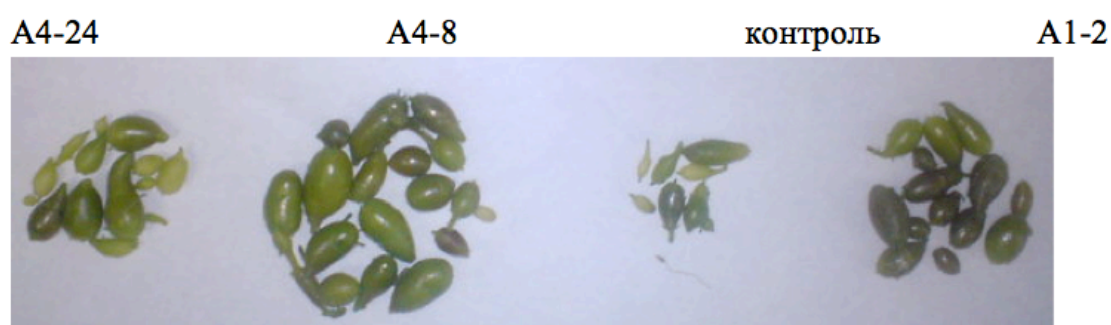
**Рис. 8.** Динамика клубнеобразования картофеля при выращивании контрольных и В33:*tms1*-растений в условиях длинного дня (ДД) на среде МС с различными концентрациями сахарозы: 3% (а); 5% (б); 8% (в).

### Исследование зависимости клубнеобразования от содержания сахарозы в среде

У различных линий растений, экспрессирующих ген *tms1*, наблюдалось снижение пороговой концентрации сахарозы в среде для инициации клубней по сравнению с контрольными растениями. Растения линии А1-2 образовывали клубни даже при 1% содержании сахарозы в среде на ДД к 5-й неделе; у контрольных растений ничего подобного не наблюдалось. В темноте и на ДД клубнеобразование у трансформантов начиналось при 3% сахарозы в среде со 2 недели, а у контрольных растений на неделю позже.

Экспрессия гена *tms1* ускорила инициацию клубней при благоприятном для клубнеобразования содержании сахаразы в среде у большинства изучаемых линий в среднем на неделю: на 5% и 8% микроклубни появлялись у трансформантов начиная с 1-й недели при любом освещении, а у контрольных растений - только спустя еще неделю.

Во всех условиях выращивания количество клубней, образованных трансформантами, превышало соответствующее число у контрольных растений в 1.5-5 раз в течении всего времени культивирования (Рис. 9). Средняя масса одного клубня, в зависимости от линии трансформантов, превышала таковую в контроле на 81-250% на среде, содержащей 3% сахаразы (ДД); на 41-173% на среде с 5% сахаразы; и на 35-162% на среде с 8% сахаразы (КД+ДД) (Табл. 1).



**Рис. 9.** Клубни после 7 недель культивирования растений на ДД при 5%-ном содержании сахаразы в среде.

**Таблица 1.** Средняя масса одного клубня при выращивании растений в различных условиях освещения в зависимости от содержания сахаразы в среде.

Фотопериод	Растения	Масса клубня (мг) в зависимости от содержания сахаразы:		
		3%	5%	8%
КД	Контроль	33±12 <sup>a</sup>	81±15 <sup>a</sup>	80±10 <sup>a</sup>
	A1-2	38±10 <sup>a</sup>	101±15 <sup>a</sup>	120±30 <sup>a</sup>
	A4-7	44±7 <sup>a</sup>	114±10 <sup>b</sup>	190±8 <sup>b</sup>
	A4-8	21±5 <sup>a</sup>	133±12 <sup>b</sup>	200±10 <sup>b</sup>
	A4-24	30±10 <sup>a</sup>	89±9 <sup>a</sup>	67±15 <sup>a</sup>
ДД	Контроль	32±5 <sup>a</sup>	77±4 <sup>a</sup>	80±3 <sup>a</sup>
	A1-2	112±20 <sup>b</sup>	166±17 <sup>b</sup>	210±40 <sup>b</sup>
	A4-7	58±1 <sup>c</sup>	88±6 <sup>a</sup>	80±8 <sup>a</sup>
	A4-8	18±4 <sup>d</sup>	210±90 <sup>b</sup>	108±20 <sup>c</sup>
	A4-24	30±9 <sup>a</sup>	140±9 <sup>b</sup>	85±7 <sup>a</sup>

Таким образом, экспрессия трансгена *tms1* ускоряла переход к клубнеобразованию и его интенсивность как в индуцирующих, так и, в ещё большей степени, в неиндуцирующих условиях освещения. В результате увеличения числа и средней массы клубней их урожайность (масса клубней на одно растение) у трансформантов значительно превышала таковую у контрольных растений в большинстве испытанных условий выращивания (Табл. 2). Растения линии А1-2 с относительно высокой и стабильной экспрессией трансгена и повышенным в 4.4 раза содержанием ИУК проявляли повышение продуктивности по сравнению с контролем в 2.1-5.9 раз во всех условиях культивирования. Меньше всего отличались по урожайности от контроля растения линии А4-24 (в двух случаях из шести, превышение в 1.9-2.5 раз), в которых содержание ИУК было наименьшим (в 1.3 раза выше контрольного). Линии А4-7 и А4-8, содержание ИУК в которых превышало контрольное, соответственно, в 3.7 и 3.5 раз, заняли промежуточное положение (по четыре случая из шести, превышение в 2.0-4.5 и 2.4-5.8 раз).

**Таблица 2.** Средняя урожайность клубней (мг) на одно растение в различных условиях выращивания

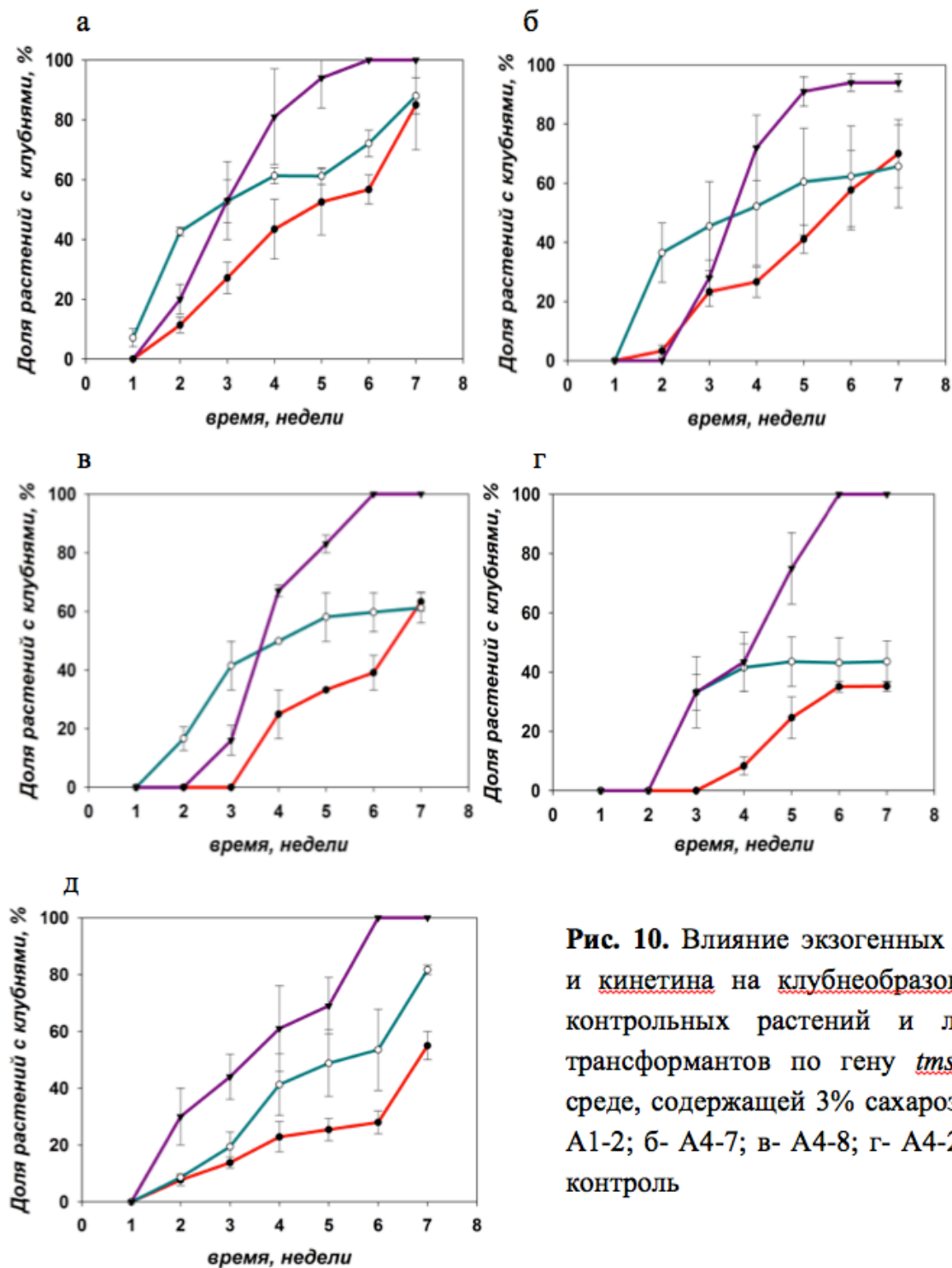
Фотопериод	Растения	Масса клубней (мг) в зависимости от содержания сахарозы в среде, %		
		3	5	8
КД	контроль	3.3±1 <sup>a</sup>	26.7±4 <sup>a</sup>	40.1±6 <sup>a</sup>
	А1-2	9.5±2 <sup>b</sup>	57.3±7 <sup>b</sup>	96.0±13 <sup>c</sup>
	А4-7	4.4±1 <sup>a</sup>	37.9±5 <sup>a</sup>	157.7±12 <sup>b</sup>
	А4-8	3.15±1 <sup>a</sup>	63.3±9 <sup>b</sup>	164.0±18 <sup>b</sup>
	А4-24	3.0±1 <sup>a</sup>	50.5±6 <sup>b</sup>	46.9±5 <sup>a</sup>
ДД	контроль	6.1±2 <sup>a</sup>	21.6±6 <sup>a</sup>	30.0±5 <sup>a</sup>
	А1-2	36.9±8 <sup>b</sup>	90.3±9 <sup>c</sup>	172.2±14 <sup>b</sup>
	А4-7	27.2±5 <sup>b</sup>	43.0±8 <sup>b</sup>	72.5±12 <sup>c</sup>
	А4-8	6.7±2 <sup>a</sup>	124.7±13 <sup>d</sup>	101.3±17 <sup>c</sup>
	А4-24	8.4±0.9 <sup>a</sup>	48.2±5 <sup>b</sup>	74.4±9 <sup>c</sup>

### **Влияние экзогенных гормонов на способность к клубнеобразованию трансформантов по гену *tms1***

Экспрессирующие ген *tms1* линии показали определённые отличия от контрольных растений по отношению к экзогенным фитогормонам. На среде с низким содержанием сахарозы (3%) добавление 1 мг/л ИУК стимулировало

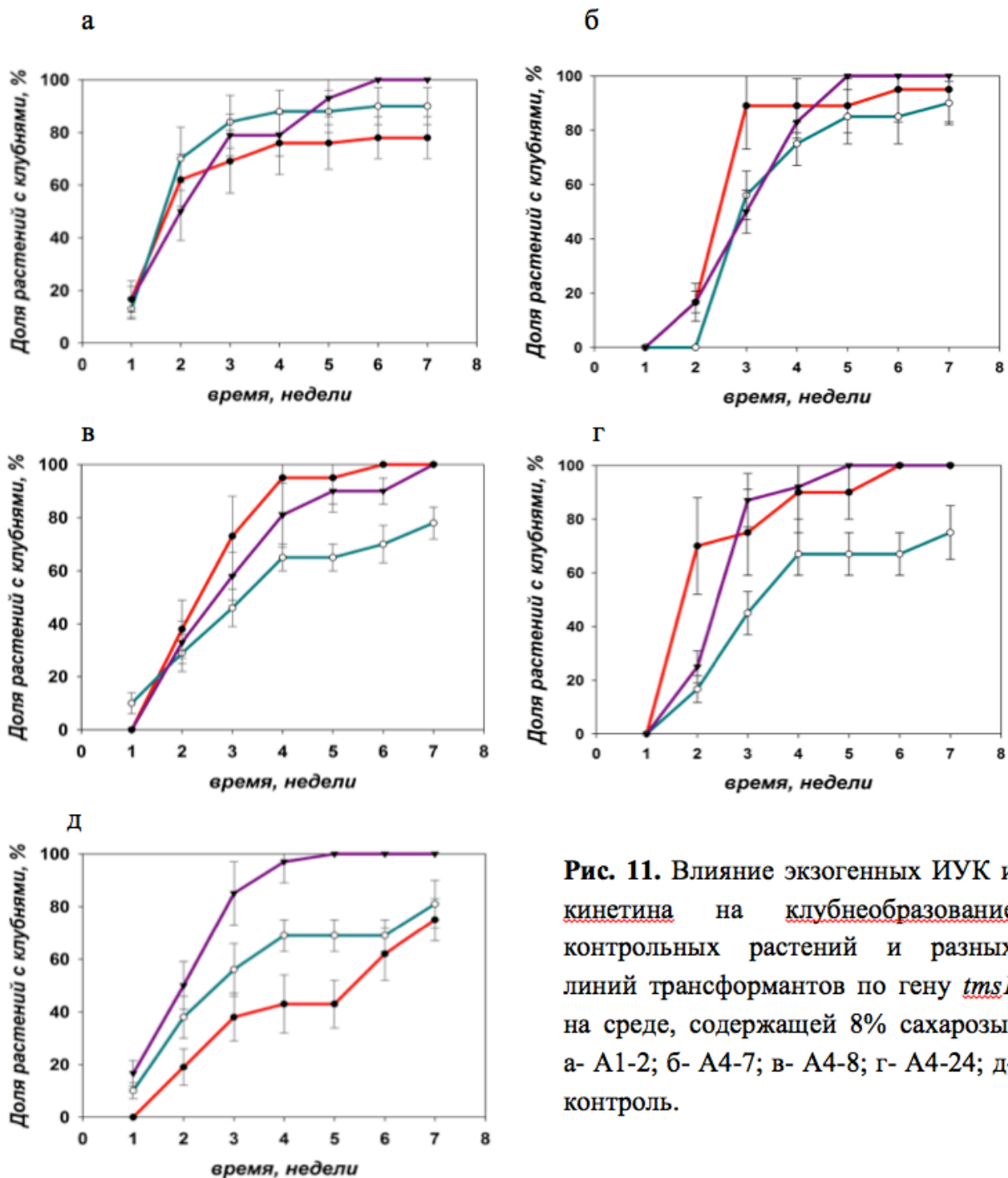


клубнеобразование и у контрольных растений, и у трансформантов, но у последних стимуляция проявлялась только в первые 4 недели на ДД, после чего количество клубней на средах с ИУК и б/г выравнивалось, а у контрольных растений разница увеличивалась с 3-й недели до конца культивирования, достигая 30% к 7-й неделе. Добавление в среду 1 мг/л кинетина усиливало клубнеобразование у контрольных растений с 1-й недели, а у трансформантов – со 2-й; во всех вариантах разница достигала 15-50% к концу 7-й недели (Рис. 10).



**Рис. 10.** Влияние экзогенных ИУК и кинетина на клубнеобразование контрольных растений и линий трансформантов по гену *tms1* на среде, содержащей 3% сахарозы. а- А1-2; б- А4-7; в- А4-8; г- А4-24; д- контроль

При выращивании на среде, содержащей 8% сахарозы, ИУК способствовала усилению клубнеобразования у контрольных растений с 1-й недели культивирования до 7-й; из всех линий трансформантов усиление клубнеобразования со 2-й недели отмечалась только у растений линии A1-2; у растений остальных линий клубнеобразование угнеталось при добавлении ИУК на 2-30% к концу 7-й недели. Добавление кинетина в среду стимулировало клубнеобразование у контрольных растений, начиная с 1-й недели, и приводило к 100% растений с клубнями на 4-й неделе, в то время как во всех линиях трансформантов проявлялось угнетение клубнеобразования до 3-й недели по сравнению с растениями на среде без гормонов, а 100%-ное образование клубней наступало лишь к 5-й – 7-й неделе (Рис. 11).



**Рис. 11.** Влияние экзогенных ИУК и кинетина на клубнеобразование контрольных растений и разных линий трансформантов по гену *tms1* на среде, содержащей 8% сахарозы. а- A1-2; б- A4-7; в- A4-8; г- A4-24; д- контроль.

Таким образом, реакция растений с введённым геном *tms1* на экзогенные фитогормоны была позитивной только при содержании сахарозы в среде ниже оптимального, а при его увеличении всё ярче проявлялось подавление клубнеобразования как экзогенным кинетином, так и, особенно, экзогенной ИУК. Вероятнее всего, это связано с повышенным содержанием эндогенного ауксина, когда избыток гормонов в среде начинает играть ингибирующую роль. Зависимость действия экзогенных фитогормонов от содержания сахарозы в среде указывает на взаимосвязь гормональной и углеводной регуляции клубнеобразования. Подобная связь была выявлена ранее в работах нашей лаборатории (Macháčková et al. 1997; Аксёнова и др. 2000), хотя молекулярные механизмы её нуждаются в дальнейшем исследовании.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Клубнеобразование у картофеля – сложный процесс, регулируемый комплексом внешних (температура, освещение, минеральное снабжение) и внутренних (гормональный статус, углеводные запасы) факторов. С целью изучения участия одного из основных фитогормонов – ауксина – в регуляции этого процесса мы получили растения картофеля, трансформированные конструкцией с геном синтеза ауксина *tms1* и изучили особенности физиологических реакций полученных растений в различных условиях культивирования. В нашей модельной системе экспрессия гена *tms1* в клубнях была в целом выше, чем в побегах, что приводило к избирательному повышению содержания ИУК в клубнях. Факт повышения уровня ауксина при экспрессии *tms1* прямо указывает на существование у растений картофеля двухстадийного пути биосинтеза ауксина, с индол-3-ацетамидом в качестве промежуточного продукта. Обнаружено, что локальное повышение уровня ауксина ускоряет и усиливает процесс клубнеобразования, снижает зависимость клубнеобразования от длины дня и пороговый уровень углеводного снабжения, необходимый для формирования клубней. Повышение эндогенного содержания ИУК в клубнях оказало влияние на гормональный баланс у трансформантов и на их ответную реакцию на воздействие экзогенных фитогормонов (ауксина, цитокинина). Все эти результаты подтверждают участие ауксина в регуляции клубнеобразования у картофеля. Возможно, увеличение эндогенного содержания ИУК способствует образованию клубней у картофеля в неблагоприятных условиях.

## ВЫВОДЫ

1. На основе сконструированных векторов впервые получены трансгенные растения картофеля, содержащие агробактериальный ген биосинтеза ауксина *tms1* под контролем клубнеспецифичного промотора пататина класса I.
2. С помощью обратной транскрипции и ПЦР в режиме реального времени доказана органоспецифичная экспрессия гена *tms1* в трансгенных растениях. Преимущественная экспрессия *tms1* в клубнях проявлялась у большинства независимых трансформантов в возрасте 1-2 месяца.
3. Измерение содержания фитогормонов на основе метода ультраразрешающей жидкостной хроматографии/масс спектрометрии показало увеличение в 1.5-2 раза содержания ауксина в клубнях, но не в побегах В33-*tms1*-трансформантов картофеля.
4. Параллельно с изменением содержания ауксина обнаружены изменения в содержании других фитогормонов (жасмоновой и салициловой кислот, цитокининов) в клубнях В33-*tms1*-трансформантов картофеля.
5. В33-*tms1*-трансформанты картофеля характеризовались повышенным уровнем клубнеобразования *in vitro* в большинстве испытанных условий освещения и содержания сахарозы в среде.
6. Внесение в среду культивирования экзогенных фитогормонов – ИУК и кинетина – по-разному влияло на клубнеобразование трансформантов и контрольных растений; это влияние зависело от содержания сахарозы в среде. Фитогормоны, особенно ауксин, в целом в меньшей степени стимулировали клубнеобразование у В33-*tms1*-трансформантов по сравнению с контрольными растениями.
7. Работа показывает возможности трансгенного подхода с использованием тканеспецифичных промоторов для направленного воздействия на гормональный баланс и клубнеобразование у картофеля.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи

1. **Kolachevskaya O.O., Alekseeva V.V., Sergeeva L.I., Rukavtsova E.B., Getman I.A., Vreugdenhil D., Buryanov Y.I., Romanov G.A.** (2014) Expression of Auxin synthesis gene *tms1* under control of tuber-specific promoter enhances potato tuberization *in vitro*. *J. Integrative. Plant Biology*. Doi [10.1111/jipb.12314].
2. **Aksenova N.P., Sergeeva L.I., Kolachevskaya O.O., Romanov G.A.** (2014) Hormonal regulation of tuber formation in potato. *Bulbous Plants. Biotechnology*. K.G. Ramawat & J.M. Merillon (eds.) CRC Press, p. 3-36.
3. **Колачевская О.О., Алексева В.В., Сергеева Л.И., Рукавцова Е.Б., Гетман И.А., Бурьянов Я.И., Романов Г.А.** (2014) Синтез ауксина и клубнеобразование у трансформантов картофеля с клубнеспецифичной экспрессией гена *tms1*. *Сборник статей V Всероссийского симпозиума «Трансгенные растения: технологии создания, биологические свойства, применение, биобезопасность»* Москва, 1-4 декабря, с. 121-124.
4. **Аксенова Н.П., Сергеева Л.И., Константинова Т.Н., Голяновская С.А., Колачевская О.О., Романов Г.А.** (2013) Регуляция покоя и прорастания клубней картофеля. *Физиология растений*, т. 60, № 3, с. 307-319.
5. **Колачевская О.О., Алексева В.В., Ломин С.Н., Сергеева Л.И., Бурьянов Я.И., Романов Г.А.** (2012) Изучение характеристик клубнеобразования у трансформантов картофеля с измененным гормональным статусом. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова.*, т. 8, № 4, с. 31-32.
6. **Аксенова Н.П., Константинова Т.Н., Сергеева Л.И., Голяновская С.А., Колачевская О.О.** (2010) Фотопериодическая и сахарозная зависимость накопления и распределения биомассы растений картофеля *in vitro*. *Биологические основы садоводства и овощеводства. Материалы Международной конференции*, Мичуринск-наукоград РФ, 22-25 сентября, т. 3. с. 32-37.

### Тезисы

7. **Kolachevskaya O.O., Alekseeva V.V., Sergeeva L.I., Rukavtsova E.B., Getman I.A., Buryanov Ya.I., Romanov G.A.** (2014) An increase in organ-specific auxin activity enhances the tuberization of potato plants *in vitro*. *«International Conference on Bioorganic Chemistry, Biotechnology and Bionanotechnology»*, Moscow, Russia, September 15–19, *Acta Naturae*; Special issue, p. 28.
8. **Колачевская О.О., Алексева В.В., Сергеева Л.И., Ломин С.Н., Гетман И.А., Рукавцова Е.Б., Бурьянов Я.И., Романов Г.А.** (2014) Влияние гена биосинтеза

ауксина *tms1* на клубнеобразование картофеля *in vitro*. *Материалы Годичного собрания Общества физиологов растений России и Международной научной конференции «Физиология растений – теоретическая основа инновационных агро- и фитобиотехнологий»*, Калининград, 19-25 мая, ч. 1, с. 249-251.

9. **Колачевская О.О., Сергеева Л.И., Алексеева В.В., Ломин С.Н., Бурьянов Я.И.** (2013) Изучение гормональной регуляции клубнеобразования картофеля (*Solanum tuberosum* L.) *Тезисы Всероссийской научной конференции с международным участием «Инновационные направления современной физиологии растений»*, Москва, 2-6 июня, с. 64.
10. **Колачевская О.О., Алексеева В.В., Ломин С.Н., Сергеева Л.И., Бурьянов Я.И., Романов Г.А.** (2012) Влияние генов биосинтеза основных фитогормонов под контролем В33-промотора на содержание фитогормонов и способность к клубнеобразованию у трансформированных растений картофеля. *Материалы Международной конференции «Биология – наука XXI века» (Ред. Р.Г. Василев)*. М.: МАКС Пресс, с. 378-379.
11. **Kolachevskaya O.O., Alekseeva V.V., Lomin S.N., Sergeeva L.I., Buryanov Y.I., Romanov G.A.** (2012) Manipulation of endogenous hormone status and tuber formation in potato plants. *Abstracts 3rd International Symposium «Intracellular Signalling and Bioactive Molecules Design»*, Lviv, Ukraine, 17-23 September, p. 65.
12. **Колачевская О.О., Алексеева В.В., Ломин С.Н., Сергеева Л.И., Бурьянов Я.И., Романов Г.А.** (2012) Взаимодействие экзогенных и эндогенных фитогормонов при формировании клубней у растений картофеля (*Solanum tuberosum* L.) *in vitro*. *Тезисы IV Всероссийского симпозиума «Трансгенные растения: технологии создания, биологические свойства, применение, биобезопасность»* Москва, 19-23 ноября, с. 53.
13. **Колачевская О.О., Алексеева В.В., Ломин С.Н., Сергеева Л.И., Бурьянов Я.И., Романов Г.А.** (2012) Исследование роли эндогенных фитогормонов в регуляции конкурентных отношений акцепторных органов картофеля (*Solanum tuberosum* L.) с применением методов геной инженерии. *Тезисы IV Всероссийского симпозиума «Трансгенные растения: технологии создания, биологические свойства, применение, биобезопасность»*, Москва, 19-23 ноября, с. 51.
14. **Колачевская О.О., Алексеева В.В., Ломин С.Н., Сергеева Л.И., Бурьянов Я.И., Романов Г.А.** (2012) Эффект гена биосинтеза ауксина *tms1* на формирование клубней и содержание фитогормонов в трансгенных растениях картофеля (*Solanum tuberosum* L.). *Тезисы IV Всероссийского симпозиума «Трансгенные растения: технологии создания, биологические свойства, применение, биобезопасность»*, Москва, 19-23 ноября, с. 52.
15. **Колачевская О.О., Алексеева В.В., Ломин С.Н., Сергеева Л.И., Бурьянов Я.И., Романов Г.А.** (2011) Изучение влияния гена биосинтеза ауксина под контролем В33-промотора на способность к клубнеобразованию трансформированных

растений картофеля. *Тезисы Международной научной конференции «Современные аспекты генетической инженерии растений»*, Киев, Украина, 30 мая – 01 июня, с. 31.

16. **Колачевская О.О., Сергеева Л.И., Алексеева В.В., Ломин С.Н., Бурьянов Я.И., Романов Г.А.** (2011) Влияние гена биосинтеза ауксина под контролем В33-промотора на содержание фитогормонов и способность к клубнеобразованию у трансформированных растений картофеля. *Тезисы VII Международной научной конференции «Регуляция роста, развития и продуктивности растений»*, Минск, Беларусь, 26-28 октября, с. 101.
17. **Колачевская О.О., Алексеева В.В., Ломин С.Н., Сергеева Л.И., Бурьянов Я.И., Романов Г.А.** (2011) Получение трансформированных растений картофеля с генов биосинтеза ауксина под контролем клубнеспецифичного В33-промотора. *VII Съезд Общества физиологов растений России «Физиология растений – фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий» (материалы докладов)*, Нижний Новгород, Россия, Часть 1, с. 348-349.
18. **Ломин С.Н., Колачевская О.О., Сергеева Л.И., Романов Г.А.** (2011) Получение с помощью Gateway-технологии (Invitrogen) генетических конструкций для создания трансгенного картофеля с измененным уровнем фитогормонов в клубне. *VII Съезд Общества физиологов растений России «Физиология растений – фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий» (материалы докладов)*, Нижний Новгород, Россия, Часть 2, с. 430-431.
29. **Колачевская О.О., Алексеева В.В., Гетман И.А., Ломин С.Н., Сергеева Л.И., Бурьянов Я.И., Романов Г.А.** (2010) Получение трансформированных растений картофеля с геном биосинтеза ауксина под контролем клубнеспецифичного В33-промотора. *Тезисы III Всероссийского симпозиума “Физиология трансгенного растения и фундаментальные основы биобезопасности”*, Москва, с. 53.