

растворимость и водоудерживающую способность. Исследования показали, что водоудерживающая способность увеличилась по сравнению с исходной. При экструзионной обработке происходит частичная денатурация белков, в результате чего их ферментативная атакуемость возрастает почти в два раза. Крахмальные зерна полностью разрушаются, их природная упорядоченная структура претерпевает превращения и переходит в аморфную структуру, что подтверждается рентгеноструктурным анализом экструдатов.

Полученные образцы экструдатов могут использоваться как готовые продукты питания, не требующие дополнительной кулинарной обработки, так и в качестве полуфабрикатов. Благодаря своим прекрасным органолептическим характеристикам (однородная структура, легкий запах и вкус ореха), высокой водоудерживающей способности, представляется перспективным использовать их в качестве обогащающего и модифицирующего компонента в технологии кисломолочных продуктов и творожных изделий, салатных заправах, а также продуктов подверженных процессам замораживания-оттаивания.

Таким образом, экструзионная обработка муки амарантовой сортовой нативной позволяет значительно расширить ассортимент экологически чистых и безопасных пищевых продуктов общего, функционального и лечебно-профилактического назначения.

Литература

1. Дулаев В.Г., Медведев А.Е., Меньшенин А.И., Смирнов С.О., Технологические аспекты комплексной переработки семян амаранта, издательство – Труды научно-практической конференции. РАСХН «Технологические аспекты комплексной переработки сельскохозяйственного сырья при производстве экологически безопасных пищевых продуктов общего и специального назначения по направлению: 2Пищевые технологии будущего. Гипотезы. Теории. Эксперименты»; М.: Углич, 2002. - С.175
2. Дулаев В.Г., Меньшенин А.И., Смирнов С.О., Новая технология и ассортимент продуктов глубокой переработки семян амаранта// Научное обеспечение и тенденции развития производства пищевых добавок в России. Материалы докладов международной конференции/ Россельхозакадемия, ГУ ВНИИПАКК. – СПб. 2005.- С.66.
3. Жушман А.И., Карпов В.Г., Иващенко П.А., Изменение свойств и структуры кукурузных крахмалов и муки при экструзионной обработке. –М.: сахарная пром.,1993.-№3.- С. – 39-42.
4. Краус С.В., Линниченко В.Г., Кривенцова Л.Д., Тупица В.Ю., Экструдирование муки для детского питания// Изв. Вузов. Пищевая технология.-1988.-№1.-С.62-64.

БАЄР О.О.¹, ЄМЕЦЬ А.І.¹, РАДЧУК В.В.², БЛЮМ Я.Б.¹

¹Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,
вул. акад. Заболотного, 148, Київ, 03680, Україна, e-mail: alyemets@univ.kiev.ua

²Інститут генетики рослин та дослідження культурних рослин,
Німеччина, 06466, Гатерслебен, Корренттрассе, 3

ПЕРЕНЕСЕННЯ СТІЙКОСТІ ДО ДІНІТРОАНІЛІНОВИХ ГЕРБІЦИДІВ У РОСЛИНИ ЛЬОНУ-ДОВГУНЦЯ ЗА ДОПОМОГОЮ *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

Льон культурний (*Linum usitatissimum* L.) впродовж багатьох років залишається основною прядильною культурою, що продукує високоякісне волокно, яке йде на

виробництво побутових, технічних і пакувальних тканин (Карпець і ін., 2001). Враховуючи важливість даної культури, вдосконалення її агрономічних характеристик на сьогоднішній день залишається надзвичайно актуальним. Важливою складовою агротехнічного менеджменту цієї сільськогосподарської культури залишається використання гербіцидів. Серед гербіцидів, які можуть використовуватися для боротьби з бур'янами у посівах льону, одне з визначальних місць посідають антимітотичні сполуки або руйнівники мікротрубочок, яким належить близько чверті ринку всіх гербіцидів (Molin & Khan, 1997; Vaughn, 2000). Динітроанілінові гербіциди, які широко використовуються, зокрема трифлуралін, пендиметалін і оризалін, належать саме до цієї групи. Основною мішенню дії динітроанілінів є тубулін (Емец и Блюм, 1999; Morejohn & Fosket, 1991), структурний компонент мікротрубочок будь-якої еукаріотичної клітини. Відомо, що тубуліни рослин зв'язуються більш специфічно з даними речовинами і в більш низьких, мікромолярних, концентраціях, ніж тубуліни тварин. Для отримання ліній рослин, стійких до динітроанілінових гербіцидів, було створено конструкцію для агробактеріальної трансформації, що містить мутантний ген альфа-тубуліну (*Tuam1*), ізольованого із резистентного до цих гербіцидів біотипу гусячої трави (*Eleusine indica* L.) (Yamamoto et al., 1998). Цей ген забезпечує стійкість не лише до широкого спектру не тільки динітроанілінових гербіцидів, але й перехресну стійкість до гербіцидів з класу фосфоротіоамідів.

Таким чином, метою даної роботи було перенесення гену стійкості до динітроанілінових гербіцидів у рослини льону-довгунцю за допомогою *Agrobacterium tumefaciens* і отримання гербіцид-стійких трансгенних ліній льону.

Матеріали та методи

Для агробактеріальної трансформації використовували бінарний вектор pBITUBA8, який містив мутантний ген α -тубуліну *Tuam1* з *E. indica* і ген β -тубуліну *HvTUB1* з ячменю (*Hordeum vulgare*). Обидва гени знаходилися під контролем 35S-промотора вірусу мозаїки цвітної капусти (Yemets et al., 2007). Оскільки конструкція pBITUBA8 також містила селективний маркерний ген *ntpII*, що забезпечує стійкість до канаміцину, було проведено тестування життєздатності експлантів льону на поживних середовищах, які містили різні концентрації антибіотика (0-200 мг/л), для визначення оптимальної селективної концентрації даного агента. Для цього сегменти гіпокотилів п'ятиденних проростків розміром 2-3 мм переносили в чашки Петрі (по 25-30 експлантів на чашку) з відповідною концентрацією канаміцину і інкубували 28 діб при температурі 24-26°C в умовах 16/8 годинного періоду.

Для трансформації льону використовували нічну культуру агробактерії, яку вирощували на середовищі LB (Sambrook et al., 1989) з рифампіцином (100 мг/л) і канаміцином (100 мг/л). Бактерію інкубували на орбітальному шейкері при 28°C. З метою запобігання негативного впливу метаболітів на процес трансформації після закінчення часу нарощування культуру агробактерії очищали центрифугуванням (1000 об/хв.), супернатант видаляли, а осад перед інокуляцією розбавляли свіжим рідким середовищем МС-БН (Баер и др., 2004) до досягнення оптичної щільності $OD_{600} = 0,5$.

В якості експлантів для трансформації використовували сегменти гіпокотилів п'ятиденних проростків льону-довгунцю сорту Могилевський 2 розміром 2-3 мм, які розміщували на чашки Петрі з агаризованим середовищем МС-БН, де протягом 48 год. вони проходили період прекультивування. Трансформацію і ко-культивування з агробактерією проводили згідно методу (Дрейпер и др., 1991). Після ко-культивування експланти переносили у чашки з культурою агробактерії і залишали на 2 год. Контрольну частину експлантів на цей час розміщували на рідкому середовищі МС-БН без агробактерії. Далі експланти переносили на середовище МС-БН, в яке було додано антибіотик цефотаксим у концентрації 200 мг/л для інгібування розвитку колоній агробактерій і канаміцин (100 мг/л) для створення селективного тиску на нетрансформовані клітини. Рослини, які вижили і регенерували в селективних умовах,

в подальшому переносили на безгормональне середовище МС (Murashige and Skoog, 1962) для укорінення та проведення молекулярно-біологічного аналізу.

Отримані трансгенні рослини аналізували за допомогою ПЛР-аналізу та блотинг-гібридизації за Саузерном. Рослинну ДНК виділяли за допомогою набору DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, ФРГ). Умови реакції і праймери для ампліфікації гену *npt II* були описані раніше (Радчук и др., 2000). Для аналізу по Саузерну 5 мкг рослинної ДНК кожної лінії і 100 нг ДНК вектору рВITUBA8 обробляли ендонуклеазою *Hind III* (“Ферментас”, Литва), розділяли у 0,8%-ному агарозному гелі і переносили на нейлоновий фільтр Hybond-NX („Amersham“, США) відповідно до стандартної методики (Sambrook et al., 1989). Наступну гібридизацію, відмивку і експозицію проводили, як описано раніше (Radchuk et al., 2005). В якості зондів використовували фрагменти генів *Tuam1*, *HvTUB1* та *nptII*, отримані за допомогою ПЛР.

Результати та обговорення

Для трансформації льону-довгунцю використовували конструкцію, що містила обидва гени гетеродимерного білку тубуліну: мутантний ген α -субодиниці (*Tuam1*) з природного високостійкого до динітроанілінів біотипу *E. indica* і повнорозмірний ген β -субодиниці тубуліну (*HvTUB1*) з *H. vulgare*. Відомо, що наявність генів саме обох одиниць екзогенного тубуліну повинна забезпечувати їх стабільну експресію в клітинах трансгенних рослин (Anthony et al., 1998).

Важливою передумовою для розробки успішної системи трансформації рослин є також відпрацювання методики введення їх в культуру та отримання регенерантів. В попередній роботі нами було введено в культуру сорти льону вітчизняної та зарубіжної селекції, проведено скринінг на відбір сортів з високим регенераційним потенціалом (Баер и др., 2004). На основі отриманих результатів було виділено сорт Могилевський 2, що характеризується високим ембріогенним потенціалом, який також має високі господарські показники щодо якості волокна.

Для агробактеріальної трансформації використовували сегменти гіпокотилів, оскільки вони, як було показано раніше, демонструють найбільшу регенераційну здатність і є найбільш оптимальними експлантами (Поляков и др., 1998; Dong & McNughen, 1991). Оскільки плазмід рВITUA8 містить маркерний ген *nptIII*, селекцію трансгенів проводили на середовищі з канаміцином. Попередньо було проведено оцінку впливу різних концентрацій цього селективного агенту на життєздатність клітин льону. Канаміцин додавали в середовище МС-БН для індукції калусогенезу та регенерації пагонів в концентраціях 0, 50, 75, 100 і 200 мг/л. При використанні антибіотика на всіх середовищах спостерігали пригнічення калусоутворення у порівнянні з контролем. Впродовж чотирьох тижнів культивування утворення калусів спостерігали при використанні концентрацій канаміцину 50 і 75 мг/л. Хоча калусні колонії були життєздатними, формування пагонів при цьому не відмічали. При використанні концентрацій канаміцину 100 і 200 мг/л калусоутворення взагалі було відсутнє, а через місяць після початку культивування експланти повністю відмирали. Тому враховуючи отримані дані, для селекції трансгенних рослин льону була вибрана концентрація 100 мг/л канаміцину. Для льону-довгунця на сьогоднішній день існує лише одна робота по трансформації, в якій для регенерації трансформантів з гіпокотилів також використовували 100 мг/л даного антибіотику (Поляков и др., 1998).

Як наслідок, через 3-4 тижні після інокуляції сегментів гіпокотилів льону спостерігали активне формування калусів по краях експлантів на середовищі, що містило селективний агент. У результаті селективного відбору були відібрані лише зелені колонії, з яких в подальшому регенерували рослини. У результаті роботи було відселектовано 120 таких канаміцин-стійких ліній. Раніше аналогічним чином через стадію калусу було регенеровано трансгенні рослини льону (Basiran et al., 1987; Поляков и др., 1998). Ефективність агробактеріальної трансформації оцінювали по

співвідношенню кількості сегментів гіпокотилів, що давали життєздатний калус на селективному середовищі, до загальної кількості експлантів, що трансформували. Через місяць після початку культивування у присутності канаміцину для сорту Могилевський 2 ефективність складала 65%. Не дивлячись на високу ефективність трансформації зі збільшенням часу селекції та продовженням періоду культивування різко знижувалася частота регенерації з отриманого калусу та коренеутворення трансформантів льону. Встановлено, що ефективність регенерації трансформантів знаходилась в межах 10-12%.

Для підтвердження трансгенної природи отриманих регенерантів було проведено молекулярно-біологічний аналіз за допомогою ПЛР. При ампліфікації з використанням специфічних праймерів до перенесеного *npt II* гену були отримані фрагменти, що відповідають позитивному контролю (плазмідна ДНК). При аналізі нетрансформованого контролю ампліфікація гену не відбувалась. Оскільки як α -, так і β -тубулін рослин кодуються відносно великою кількістю генів з подібними послідовностями, то специфічна ампліфікація перенесених генів з конструкції рВІТUBA8 в трансгенних рослинах була неможливою, тому для виявлення наявності даних генів α - та β -тубуліну в трансформованих рослинах використовували метод гібридизації за Саузерном. Як видно з представлених результатів (Рис. 1 А і Б), ендогенні послідовності як α -, так і β -тубуліну льону гібридизувались з зондом до α -тубуліну гусячої трави та β -тубуліну ячменю, відповідно, що призводило до появи ідентичної кількості і розміщення гібридизаційних полос ДНК трансгенних і контрольних рослин.

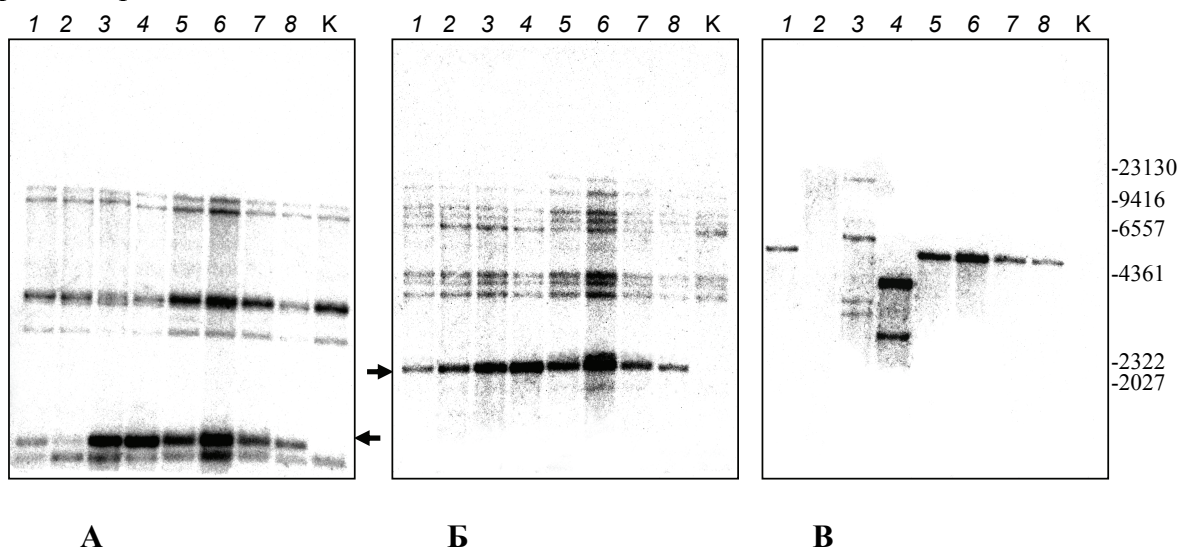


Рис.1. Аналіз трансгенних рослин льону-довгунця методом блотинг-гібридизації по Саузерну з пробами до *Tuam1*(А), *HvTUB1* (Б) та *nptII* (В) генів. 1-8 – незалежні трансгенні рослини; К – контрольна нетрансформована рослина. Положення фрагментів молекулярного маркера вказано в парах основ праворуч. Стрілками показано положення специфічних гібридизованих фрагментів для *Tuam1*(А) і *HvTUB1* (Б) генів відповідно.

За допомогою Саузерн-гібридизації з використанням зонду до *nptII* гену (Рис. 1В) було також встановлено, що число копій Т-ДНК в трансгенних рослинах льону коливалась від 1 до 4, однак більшість рослин містила лише 1 послідовність Т-ДНК.

Висновки

Результати проведених досліджень демонструють успішну трансформацію льону-довгунця за допомогою *A. tumefaciens* та стабільну інтеграцію мутантного гену α -тубуліну, що забезпечує стійкість до динітроанілінових гербіцидів.

Література

Баер О.А., Баер Г.Я., Емец А.И., Блюм Я.Б. Введение в культуру *in vitro* и регенерационная способность сортов льна-долгунца с различной устойчивостью к полеганию // Физиол. биохим. культ. растений. – 2004. – т. 36, № 1. – С. 48-54.

Генная инженерия растений. Лабораторное руководство / Под ред. Дж. Дрейпера, Р. Скотта, Ф. Армитиджа, Р. Уолдена. – М.: Мир, 1991. – 408 с.

Емец А.И., Блюм Я.Б. Устойчивость растений к гербицидам с антимикротрубочковым механизмом действия: от природных мутантов до переноса генов // Физиол. раст. – 1999. – т. 46, № 6. – С. 899–907.

Карпець І.П., Карпець А.І., Динник О.В. Нова методика визначення якості волокна у поодиноких стеблах льону-довгунця у зв'язку з селекційними і генетичними дослідженнями // Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть. – К.: Логос, 2001. – т. 3. – С. 68-70.

Поляков А.В., Чиркизова О.Ф., Каляева М.А., Захарченко Н.С., Балохина Н.В., Бурьянов Я.И. Трансформация растений льна-долгунца // Физиол. раст. – 1998. – т. 45, № 6. – С. 882-887.

Радчук В.В., Клоке Э., Радчук Р.И., Нойманн М., Блюм Я.Б. Получение трансгенных растений рапса (*Brassica napus* L.) с помощью *Agrobacterium tumefaciens* // Генетика. – 2000. – т. 36, № 7. – С. 932-941.

Anthony R., Waldin T., Ray J., Bright S., Hussey P. Herbicide resistance caused by spontaneous mutation of the cytoskeletal protein tubulin // Nature. – 1998. – vol. 393. – P. 260-263.

Basiran N., Armitage P., Scott R.J. & Draper J. Genetic transformation of flax (*Linum usitatissimum*) by *Agrobacterium tumefaciens* regeneration of transformed shoots via a callus phase // Plant Cell Rep. – 1987. – N 6. – P. 396-399.

Dong J.Z., McHughen A. Patterns of transformation intensity on flax hypocotyls inoculated with *Agrobacterium tumefaciens* // Plant Cell Rep. – 1991. - vol. 10. - P. 555-560.

Molin W.T. & Khan R.A. Mitotic disrupter herbicide: recent advances and opportunities. In: Herbicide Activity: Toxicology, Biochemistry and Molecular Biology, 1997.

Morejohn L.C., Fosket D.E. The biochemistry of compounds with anti-microtubule activity in plant cells // Pharm. Ther. – 1991. – vol. 51. – P. 217–230.

Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – vol. 15. – P. 473-497.

Radchuk V.V., Sreenivasulu N., Radchuk R.I., Wobus U., Weschke W. The methylation cycle and its possible function in barley endosperm development // Plant Mol. Biol. - 2005. – vol. 59. - 289-307.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbour Press, Cold Spring Harbour, NY (1989).

Vaughn K.C. Anticytoskeletal herbicides/ in: P.Nick (Ed.). Plant Microtubules: Potential for Biotechnology, Springer, New York.- 2000. – P. 193-205.

Yamamoto E., Zeng L., Baird W.V. α -Tubulin missense mutations correlate with antimicrotubule drug resistance in *Eleusine indica* // Plant Cell. – 1998. – vol. 10. – P. 297–308.

Yemets A., Radchuk V., Bayer O., Bayer G., Pakhomov A., Baird V., Blume Ya. Development of transformation vectors based upon a modified plant α -tubulin genes as a selectable marker // Cell Biol. Int.- 2007.-doi:10.1016/j.cellbi.2007.11.012

Резюме

Представлено дані по агробактеріальній трансформації рослин льону-довгунця *L. usitatissimum* сорту Могилевський 2, що характеризується високим ембріогенним потенціалом, геном стійкості до динітроанілінових гербіцидів. Молекулярно-генетичний аналіз підтвердив наявність та експресію перенесеного мутантного гену α -тубуліну в трансгенних лініях льону.

Представлены результаты по агробактериальной трансформации растений льна-долгунца *L. usitatissimum* сорта Могилевский 2, который характеризуется высоким эмбриогенным потенциалом, геном устойчивости к динитроанилиновым гербицидам. Молекулярно-генетический анализ подтвердил наличие и экспрессию мутантного гена α -тубулина в трансгенных линиях льна.

Data on *Agrobacterium*-mediated transformation of flax *L. usitatissimum* cultivar Mogilevsky 2 with high embryogenic potential by dinitroaniline herbicide resistant gene are presented. Molecular genetic analysis confirmed presence and expression of mutant α -tubulin gene in transgenic flax line.

БАЕР Г.Я.¹, БАЕР О.А.¹, ШИША Е. Н.¹, ЛЕМЕШ В.А.², КАРТЕЛЬ Н.А.², ЕМЕЦ А.И.¹, БЛЮМ Я.Б.¹

¹*Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Украина, 03680, Киев, ул. акад. Заболотного, 148, e-mail: galinabayer@univ.kiev.ua*

²*Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Беларусь, 220072, Минск, ул. Академическая, 27*

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ МИКРОТРУБОЧЕК В КЛЕТКАХ ЛЬНА-ДОЛГУНЦА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ХИМЕРНОГО ГЕНА GFP- TUA6

Лен-долгунец является одной из древнейших технических культур, успешно выращиваемой в мире, и, в частности, в Украине. Основную ценность льна-долгунца составляет стебель, где содержится 20-30 % волокна. Известно, что из тонких стеблей льна получают волокно более высокого качества, однако такие растения, как правило, характеризуются сниженной устойчивостью к полеганию. Льняное волокно также называют лигноцеллюлозным, поскольку оно состоит в основном из целлюлозных фибрилл (70 %), а также гемицеллюлозы, пектина и лигнина. Считают, что целлюлозные микрофибриллы являются основным механическим элементом клеточной стенки и их ориентация зависит от ориентации кортикальных микротрубочек клеток (Baskin 2001; Baskin 2005). В ряде работ показано, что нарушения нативной организации микротрубочек (Whittington et al., 2001; Baskin 2004) или отложения целлюлозных микрофибрилл (Sugimoto et al., 2001; Williamson et al., 2001) после обработки химическими веществами, а также вследствие генетических мутаций, приводят к изменению нормального роста клеток и появлению аномального фенотипа у растений. С помощью методов иммунофлуоресцентной микроскопии ранее было установлено, что ориентация отложения целлюлозных фибрилл при формировании клеточной стенки всегда происходит параллельно направлению кортикальных микротрубочек в клетке (Giddings & Staehelin, 1991). Для более детального изучения роли микротрубочек в процессах формирования и отложения целлюлозных фибрилл в клеточной стенке, а также особенностей организации кортикальных микротрубочек в клетках сортов льна-долгунца, характеризующихся различной устойчивостью к полеганию, было решено провести трансформацию льна химерным геном тубулина, слитым с репортерным геном GFP (green fluorescent protein). Успешная экспрессия GFP-меченого тубулина в клетках трансформантов, детектируемая с помощью конфокальной микроскопии, позволила бы глубже изучить особенности организации микротрубочек в живых клетках этих линий.

Поэтому целью нашей работы являлась агробактериальная трансформация генотипов льна с разной устойчивостью к полеганию, районированных на территории