

ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
“ИНСТИТУТ ГЕНЕТИКИ И ЦИТОЛОГИИ
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ”

УДК: 577.214.052:631.524.86:635.21

САВЧИН
Дмитрий Васильевич

**СИСТЕМЫ ЭКСПРЕССИИ ГЕТЕРОЛОГИЧНОГО ГЕНА *GOX*
PENICILLIUM FUNICULOSUM И АНАЛИЗ ИХ ЭФФЕКТИВНОСТИ В
ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ РАСТЕНИЯХ
*SOLANUM TUBEROSUM L.***

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук
по специальности 03.01.07 – молекулярная генетика

Минск, 2016

Работа выполнена в Государственном научном учреждении «Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси».

Научный руководитель:

Картель Николай Александрович

доктор биологических наук, профессор, академик НАН Беларуси, заведующий лабораторией молекулярной генетики ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»

Официальные оппоненты:

Решетников Владимир Николаевич

доктор биологических наук, профессор, академик НАН Беларуси, заведующий лабораторией биохимии и биотехнологии растений ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси»

Падутов Владимир Евгеньевич

доктор биологических наук, доцент, член-корреспондент НАН Беларуси, заведующий лабораторией генетики и биотехнологии ГНУ «Институт леса НАН Беларуси»

Оппонирующая организация: Белорусский государственный университет

Защита состоится 7 апреля 2016 г. в 14.00 на заседании совета по защите диссертаций Д 01.31.01 при ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси» по адресу 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27.

Тел.: (+37517) 294 91 79, факс: (+37517) 284 19 17, e-mail: T.Kuzhir@igc.by

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси».

Автореферат разослан 5 марта 2016 года

Ученый секретарь совета
по защите диссертаций,
доктор биологических наук

Т.Д. Кужир

ВВЕДЕНИЕ

Картофель является одной из основных сельскохозяйственных культур, возделываемых в Беларуси. Важнейшим направлением селекции картофеля является создание сортов, сочетающих высокий потенциал продуктивности и вкусовых качеств с устойчивостью к болезням и вредителям. Для повышения защитных свойств и создания устойчивых форм растений эффективным подходом, в дополнение к традиционным методам селекции, является генетическая инженерия. На сегодняшний день трансгенные растения широко используются в качестве модельных объектов для изучения структуры и функций генов и для решения ряда прикладных задач, связанных с получением новых сортов. Методология генетической инженерии значительно расширяет возможности исследователей в отношении конструирования растений с новыми хозяйственно ценными признаками (Картель и др., 2005; Кильчевский и др., 2010). В частности, применение методов генетической инженерии является перспективным направлением для создания сортов картофеля с повышенной устойчивостью к комплексу патогенов за счет встраивания и экспрессии гетерологичных генов, контролируемых неспецифические защитные реакции растительного организма, что в конечном итоге позволит улучшить качество и сократить потери урожая.

Одним из генов, влияющих на неспецифическую устойчивость растений, является ген *gox*, который кодирует фермент глюкозооксидазу. Данный ген встречается в грибах, бактериях и дрожжах, но отсутствует в растительных организмах. Глюкозооксидаза окисляет глюкозу в тканях растений с образованием пероксида водорода, который участвует в функционировании защитных систем растений и является сигнальной молекулой для запуска ряда защитных механизмов. Данный подход используется в мировой практике (Wu et al., 1995; Selvakumar, 2013). Созданы трансгенные растения ряда культур, содержащие ген глюкозооксидазы и проявляющие повышенный уровень устойчивости к широкому ряду грибных и бактериальных патогенов, а также неблагоприятным абиотическим факторам. Для Республики Беларусь создание растений картофеля, обладающих одновременно хозяйственно ценными признаками и повышенной комплексной устойчивостью к фитопатогенам, также является актуальной задачей.

В этой связи перспективным представляется создание трансгенных растений картофеля, несущих ген глюкозооксидазы, так как есть основания ожидать, что они могут обладать повышенной комплексной устойчивостью к фитопатогенам.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с научными программами, темами. Представленная работа выполнялась в рамках ГПНИ «Молекулярно-генетические, физиолого-биохимические и клеточные основы создания новых биотехнологий для сельского хозяйства, здравоохранения, промышленности и охраны окружающей среды» («Фундаментальные основы биотехнологий») 2011-2015 гг. Подпрограмма 2 «Молекулярно-генетическое изучение структурно-функциональной организации геномов растений, животных, микроорганизмов и человека как фундаментальной основы новых биотехнологий» (Геномика). Задание 2.02 «Изучение геномов растений с помощью технологии молекулярных маркеров и генетической трансформации» 2011-2013 гг., № государственной регистрации 20113482, Гранта Российского фонда фундаментальных исследований для молодых ученых, проект № 10-04-90909-моб_снг_ст, 2010 г.

Диссертационная работа соответствует приоритетному направлению фундаментальных и прикладных научных исследований Республики Беларусь на 2011-2015 годы, отраженному в пункте 3.6 «идентификация и картирование генов; паспортизация, маркирование, идентификация, селекция и создание сельскохозяйственных растений, животных и микроорганизмов с помощью ДНК-технологий; ДНК-технологии и генно-инженерные методы в диагностике и лечении заболеваний человека и сельскохозяйственных животных» Постановления Совета Министров Республики Беларусь от 19.04.2010 № 585.

Цель и задачи исследования. Цель диссертационной работы – создание генетически модифицированных растений *Solanum tuberosum*, экспрессирующих ген глюкозооксидазы из *Penicillium funiculosum*, для повышения их неспецифической устойчивости к фитопатогену *Phytophthora infestans*.

Для достижения цели поставлены следующие задачи:

1. Провести анализ и оптимизацию нуклеотидной последовательности нативного гена *gox* *P. funiculosum* для его эффективной экспрессии в растениях *Solanum tuberosum*.
2. Сконструировать растительные экспрессионные векторы, в которых нативный и модифицированный гены *gox* и *gox-mod* находятся под контролем конститутивного промотора 35S РНК CaMV.
3. Создать трансгенные растения картофеля с нативным и модифицированным гетерологичными генами *gox* и *gox-mod*.
4. Подтвердить факт экспрессии гетерологичного трансгена в растениях с помощью молекулярных и биохимических методов и оценить

эффективность растительных экспрессионных векторов.

5. Оценить уровень устойчивости генетически модифицированных растений картофеля к фитопатогену *P. infestans*, вызывающему заболевание фитофтороз.

Научная новизна. Впервые в нуклеотидной последовательности нативного гена *gox* грибка штамма *P. funiculosum* 46.1 выявлены редкие для растений *S. tuberosum* кодоны, что приводит к снижению эффективности экспрессии гетерологичного гена *gox* в трансгенных растениях картофеля. Показано, что оптимизация кодового состава нативного гена *gox* в соответствии с частотой использования кодонов в растениях *S. tuberosum* приводит к увеличению уровня накопления глюкозооксидазы в трансгенных растениях картофеля, что в свою очередь приводит к увеличению концентрации эндогенного пероксида водорода. На растениях картофеля сорта белорусской селекции Скарб установлено, что увеличение концентрации эндогенного пероксида водорода в растительной ткани приводит к повышению уровня устойчивости растений картофеля к заболеванию фитофторозом.

Положения, выносимые на защиту.

1. Последовательность нативного гена *gox P. funiculosum* содержит 27,4% редких для растений *S. tuberosum* кодонов, для которых внутриклеточная концентрация изоакцепторных тРНК не более 10% (в 3,1% случаев) и не более 20% (в 24,3% случаев). Данная последовательность модифицирована в соответствии с кодоновым составом растений *S. tuberosum* без изменения аминокислотной последовательности его белкового продукта.

2. Векторные конструкции рВІ-L-GOX, рВІ-F-GOX и рВІ-GOXmod обеспечивают интеграцию и экспрессию гетерологичных генов *gox* и *gox-mod* в растениях *Nicotiana tabacum* и *S. tuberosum*. Транскрипционная активность и синтез целевого белка выявлены у 44%, 30% и 54% канамицин-устойчивых растений *S. tuberosum*, трансформированных векторными конструкциями рВІ-L-GOX, рВІ-F-GOX и рВІ-GOXmod соответственно.

3. Замена редких кодонов в кодирующей последовательности нативного гена *gox P. funiculosum* на синонимичные кодоны растений *S. tuberosum* ведет к увеличению накопления белкового продукта целевого гена на 21,1% в трансгенных растениях картофеля.

4. Экспрессия гетерологичного гена *gox P. funiculosum* в растениях картофеля ведет к повышению уровня их устойчивости к поражению фитопатогеном *P. infestans*. Трансгенные линии картофеля с геном *gox* характеризуются повышением уровня устойчивости к фитофторозу в среднем на 16,6% по сравнению с исходным сортом.

Личный вклад соискателя. Результаты исследований, представленные в диссертационной работе, получены и проанализированы лично соискателем или при его непосредственном участии. Основные результаты получены автором самостоятельно в 2008–2014 гг. в лаборатории молекулярной генетики ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси» и в лаборатории функциональной геномики ФГБУН «Института общей генетики РАН». Постановка задач, интерпретация и обобщение полученных результатов выполнены соискателем под руководством д.б.н., профессора, академика НАН Беларуси [Картеля Н.А.]. Эксперименты по определению уровня устойчивости трансгенных растений к фитопатогенам частично проведены в отделе иммунитета и защиты картофеля РУП «НПЦ НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству». В работах, выполненных в соавторстве, соискатель непосредственно участвовал в постановке задач, организации и выполнении экспериментов, интерпретации и верификации результатов.

Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю диссертации д.б.н., профессору, академику [Картелю Н.А.] за неоценимую помощь в планировании работы, д.б.н., доценту Голденковой-Павловой И.В. за участие в обсуждении полученных результатов и возможность проведения работ по модификации нативного гена *gox* под её непосредственным руководством; д.б.н. Михайловой Р.В. за предоставление грибного штамма *P. funiculosum* 46.1; к.б.н. Ярмолинскому Д.Г., к.б.н. Вячеславовой А.О. и Гончару А.Л. за обучение современным методам молекулярной генетики; Панюш А.С. за помощь в проведении генетической трансформации растений; Хололей Л.С. и коллективу лаборатории молекулярной генетики ИГЦ НАН Беларуси за поддержку в ходе подготовки диссертационной работы.

Апробация результатов диссертации и информация об использовании ее результатов. Основные результаты диссертационной работы были доложены и обсуждены на Международной научной конференции «Генетика и биотехнология на рубеже тысячелетий», посвященной 45-летию основания Института генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси (Минск, 2010); XXIII Зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2011); Международной научной конференции «Современные аспекты генетической инженерии растений» (Киев, 2011); 2-ой Международной школе-конференции молодых ученых «Генетика и селекция растений, основанная на современных генетических знаниях и технологиях» (Звенигород, 2011); Международной научной конференции «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы» (Минск, 2012); IV Всероссийском симпозиуме

«Трансгенные растения: технологии создания, биологические свойства, применение, биобезопасность» (Москва, 2012).

Результаты исследований внедрены в учебный процесс биологического факультета БГУ в программу лабораторных занятий в рамках спецпрактикума «Методы работы с нуклеиновыми кислотами» для студентов 4 курса специальности «1-31 01 01 Биология» (акт от 9 сентября 2013) и в программу лабораторных занятий по дисциплине «Объекты биотехнологии и их промышленное использование» для студентов 4 курса специальности «1-31 01 01 Биология» (акт от 15 сентября 2014).

Подана и принята НЦИС 1 заявка на патент РБ.

Опубликованность результатов. По материалам диссертации опубликовано 13 печатных работ, в том числе 5 статей в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень ВАК, 3 публикации в материалах конференций и 5 тезисов докладов международных научных конференций. Общее количество страниц опубликованного материала – 34 страницы. Объем публикаций в соответствии с пунктом 18 «Положения о присуждении ученых степеней и присвоения ученых званий в Республике Беларусь» – 1,2 авторского листа.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, общей характеристики работы, семи глав, заключения, библиографического списка и 11 приложений. Общий объем диссертации составляет 164 страницы, работа проиллюстрирована 32 рисунками и 24 таблицами. Библиографический список на 16 страницах включает 187 наименований, из них 13 публикаций соискателя.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Объектом исследования служили растения тетраплоидного картофеля *S. tuberosum* L. сорта белорусской селекции Скарб. В качестве модельного объекта использованы растения табака *N. tabacum* cv. *Petit Havana SR1*. Нативный ген *gox* (1818 п.н.), кодирующий фермент глюкозооксидазу, клонирован из высокопродуктивного грибного штамма *P. funiculosum* 46.1, выделенного в ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси» (Михайлова и др., 2002; Семашко и др., 2003; Семашко, 2006).

Процедуры молекулярного клонирования проводили в соответствии с типовыми рекомендациями (Sambrook et al., 2001; Драйпер и др., 1991) и привлечением коммерческих наборов реагентов (Thermo Fisher Scientific).

Анализ кодового состава нативного гена *gox* и генома *S. tuberosum* проведен с использованием программы Graphical Codon Usage Analyser

(<http://gcua.schoedl.de/>) и базы данных Codon Usage Database (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>).

Трансгенные формы растений картофеля и табака получены методом агробактериальной трансформации листовых дисков. Отбор трансформантов и последующее их культивирование *in vitro* проводили на среде MS с добавлением 100 мкг/мл канамицина в качестве селективного агента.

Молекулярно-генетический анализ отобранных трансформантов растений проводили с использованием методов ПЦР, мультиплекс-ПЦР и ОТ-ПЦР.

Качественный анализ для детекции глюкозооксидазной активности в растительных тканях проводили путем помещения фрагмента растительной ткани на 1% агарозный гель, содержащий 50 мМ йодида калия, 5% крахмала, 200 мМ D-глюкозы (Murray et al., 1999). По площади окрашивания среды судили о присутствии и относительном количестве глюкозооксидазы в исследуемых образцах.

Количественное определение глюкозооксидазы проводили путем внесения растительного белкового препарата в раствор, содержащий 3,4 мМ KI, 80 мМ C₆H₁₂O₆, 0,83 мМ Na₂MoO₄. После 20 минут инкубации при температуре 37°C проводили измерения на спектрофотометре при длине волны 560 нм в трехкратной повторности.

Качественное определение пероксида водорода в растительной ткани проводили с помощью реакции с 3,3-диаминобензидином (Thordal-Christensen et al., 1997; Kang et al., 2003).

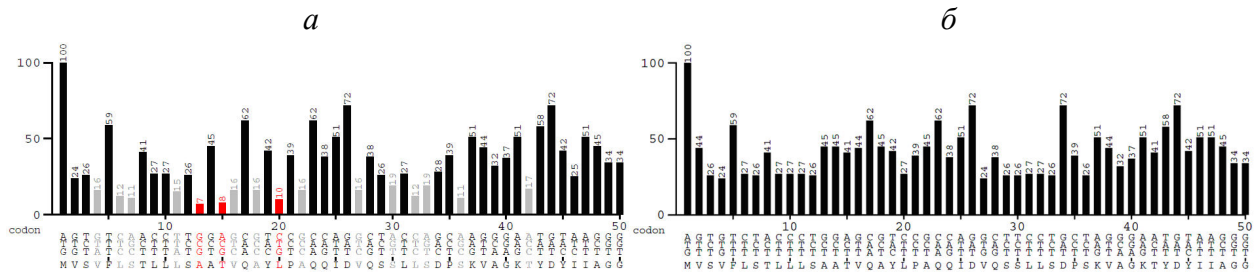
Количественное определение пероксида водорода проводили спектрофотометрическим методом, основанным на окислении ионов железа Fe⁺² пероксидом водорода до ионов железа Fe⁺³, которые образуют окрашенные соединения при взаимодействии с ксиленовым оранжевым (Wolff, 1994).

Лабораторную оценку устойчивости ботвы и клубней картофеля к заболеванию фитофторозом проводили в соответствии с рекомендациями РУП «НПЦ НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству» (Ильяшенко и др., 2010). Уровень полевой устойчивости растений картофеля к фитофторозу определяли на основании учета площади поражения листовой поверхности растений и расчета индекса AUDPC (Area Under Disease Progress Curve) (Shaw et al., 1998; Jenkins et al., 2003).

Статистический анализ результатов экспериментов проведен с использованием ПО Microsoft Excel. Для сравнения групп контрольных и трансгенных растений использовали дисперсионный анализ и двухвыборочный t-тест. Достоверность отклонения показателей исследуемых образцов от контроля определяли с вероятностью 0,05.

СОЗДАНИЕ СИСТЕМ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *GOX* В РАСТЕНИЯХ

Необходимым условием успешной реализации гетерологической генетической информации является соответствие частот использования кодонов в последовательности экспрессируемого гена и пулом тРНК организма-реципиента. Биоинформатический анализ показал, что последовательность нативного гена *gox* содержит 27,4% редких для растений картофеля кодонов, для которых внутриклеточная концентрация изоакцепторных тРНК не более 10% (в 3,1% случаев) и не более 20% (в 24,3% случаев) (рисунок 1, а). Содержание GC пар в последовательности нативного гена *gox P. funiculosum* 51,1%, в то время как для растений *S. tuberosum* среднее значение этого показателя – 42,4%. Полученные нами данные свидетельствовали о необходимости проведения оптимизации кодового состава нативного гена *gox* для его эффективной экспрессии в растениях картофеля.



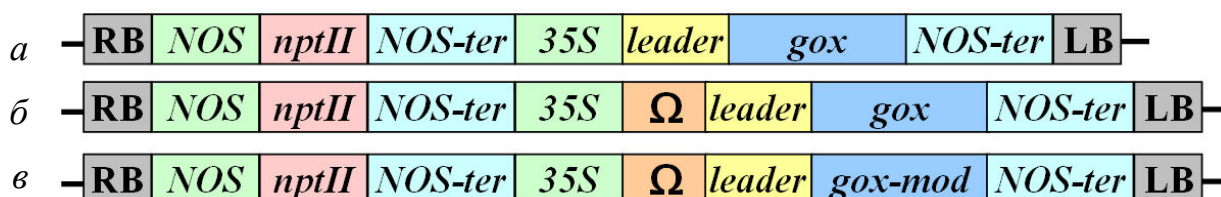
Красным цветом выделены кодоны, частота встречаемости которых в растениях *S. tuberosum* не более 10%; **серым** – не более 20%

Рисунок 1. – Фрагмент визуального отображения работы программы, иллюстрирующий анализ частоты соответствия кодового состава нативного гена *gox* (а) и модифицированного гена *gox-mod* (б) нуклеотидному составу растений *S. tuberosum*

Используя свойство вырожденности генетического кода и данные о частоте встречаемости кодонов, проведена модификация нуклеотидной последовательности нативного гена *gox* (рисунок 1, б). Следует при этом подчеркнуть, что модификация нуклеотидной последовательности гена не изменила аминокислотную последовательность его белкового продукта. Значение GC-состава модифицированного гена *gox-mod* является оптимальным для растений *S. tuberosum* и составляет 42,8%. Полноразмерная модифицированная последовательность *gox-mod* (1818 п.н.) получена путем лигирования трех синтетических фрагментов, синтезированных методом ферментативного синтеза.

На основе растительного экспрессионного вектора pVI121, который несет селективный маркер устойчивости к антибиотику канамицину *nptII*,

созданы оригинальные векторные конструкции pBI-L-GOX (рисунок 2, а) и pBI-F-GOX (рисунок 2, б) с нативным геном *gox* и вектор pBI-GOXmod (рисунок 2, в) с модифицированным геном *gox-mod*. В экспрессионных векторах нативный и модифицированный гены *gox* и *gox-mod*, слитые в рамке считывания с лидерной последовательностью гена экстенсина моркови, находятся под контролем конститутивного промотора 35S РНК CaMV. Лидерный пептид позволит белковому продукту целевых генов секретироваться в апопласт и, таким образом, включиться в защитную систему клетки.

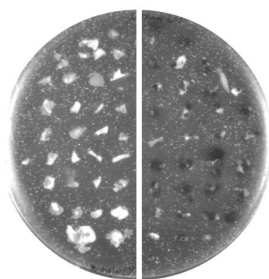


RB, LB – правый и левый концевые повторы области T-ДНК; **NOS** – промотор нопалин-синтазы; ***nptII*** – ген неомифосфотрансферазы II типа; **NOS-ter** – терминатор нопалин-синтазы; **35S** – 35S РНК CaMV промотор; **leader** – нуклеотидная последовательность лидерного пептида гена экстенсина моркови; **Ω** – энхансер омега; ***gox*** – нативный ген глюкозооксидазы; ***gox-mod*** – модифицированный ген глюкозооксидазы

Рисунок 2. – T-ДНК область растительных векторов с нативным и модифицированным генами *gox* – pBI-L-GOX (а), pBI-F-GOX (б) и pBI-GOXmod (в).

СОЗДАНИЕ И ОТБОР ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА И КАРТОФЕЛЯ

Для первичной оценки эффективности созданных векторных конструкций pBI-L-GOX, pBI-F-GOX и pBI-GOXmod проведена агробактериальная трансформация листовых дисков модельной культуры растений табака. С помощью чашечного теста для детекции глюкозооксидазной активности установлено, что все созданные векторные конструкции приводят к экспрессии гетерологичных генов *gox* и *gox-mod* и синтезу функционально активной формы фермента глюкозооксидазы в растительной ткани. Показано, что данный метод позволяет отобрать растения, в которых синтезируется целевой фермент без проведения на начальном этапе трудоемких молекулярных исследований, к тому же, данный метод позволяет исключить растения, в которых имеется трансгенная вставка, но по различным причинам не происходит синтез целевого белка (рисунок 3).



Слева – экспланты контрольных растений; справа – экспланты растений с агробактериями, содержащими векторную конструкцию pBI-GOXmod

Рисунок 3. – Результаты чашечного теста для детекции глюкозооксидазной активности у растений табака, трансформированных векторной конструкцией pBI-GOXmod

Методом агробактериальной трансформации листовых дисков получены трансгенные растения картофеля сорта Скарб с нативным и модифицированным генами *gox* и *gox-mod*. Показана высокая регенерационная способность при использовании экспрессионных систем pBI-L-GOX, pBI-F-GOX и pBI-GOXmod (таблица 1).

Таблица 1. – Эффективность регенерации и трансформации растений картофеля сорта Скарб

Конструкция	R и.э., шт.	R общ., шт.	R Km ^R , шт.	$\frac{R \text{ общ.}}{R \text{ и.э.}}$, шт.	$\frac{R \text{ Km}^R}{R \text{ и.э.}}$, шт.	$\frac{R \text{ Km}^R}{R \text{ общ.}}$, %	R <i>gox</i> , шт.	$\frac{R \text{ gox}}{R \text{ Km}^R}$, %
pBI-L-GOX	100	125	120	1,25	1,2	96	53	44
pBI-F-GOX	100	84	80	0,84	0,8	95	24	30
pBI-GOXmod	50	40	37	0,8	0,74	93	20	54
pBI-121	50	57	57	1,14	1,14	100	0	0

Примечание – R и.э. – количество исходных эксплантов; R общ. – общее количество регенерантов, шт.; R Km^R – общее количество устойчивых к канамицину регенерантов, шт.; $\frac{R \text{ общ.}}{R \text{ и.э.}}$ – количество регенерантов в пересчете на один эксплант, шт.; $\frac{R \text{ Km}^R}{R \text{ и.э.}}$ – количество устойчивых к канамицину регенерантов в пересчете на один эксплант, шт.; $\frac{R \text{ Km}^R}{R \text{ общ.}}$ – доля регенерантов, устойчивых к канамицину, в пересчете на общее число полученных регенерантов, %; R *gox* – количество регенерантов, в которых происходит синтез глюкозооксидазы, шт.; $\frac{R \text{ gox}}{R \text{ Km}^R}$ – процентное отношение растений, экспрессирующих ген *gox*, к канамицин-устойчивым растениям, %

В результате культивирования регенерантов на селективной среде отобрано 120 (pBI-L-GOX), 80 (pBI-F-GOX) и 37 (pBI-GOXmod) линий картофеля, проявляющих устойчивость к канамицину. Однако в результате проведения чашечного теста было установлено, что эффективный синтез фермента глюкозооксидазы происходит только в 53 (pBI-L-GOX), 24 (pBI-F-GOX) и 20 (pBI-GOXmod) линиях картофеля, что составляет соответственно 44%, 30% и 54% от общего количества канамицин-устойчивых растений. Пример полученных результатов исследования по детекции глюкозооксидазной активности представлен на рисунке 4.

Все отобранные первичные регенеранты растений картофеля в культуре *in vitro* имели фенотип, который не отличался от фенотипа растений исходного сорта.

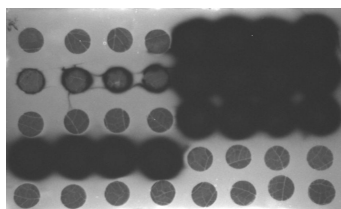
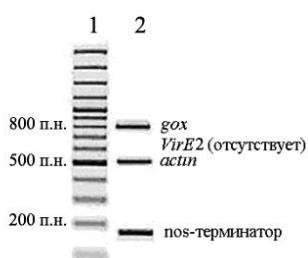


Рисунок 4. – Результаты чашечного теста для детекции глюкозооксидазной активности у трансгенных растений картофеля, трансформированных векторной конструкцией pBI-F-GOX

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ

Интеграция в геном растений Т-ДНК области вектора с целевой последовательностью подтверждена разработанным нами методом мультиплекс-ПЦР, который позволяет в результате проведения одной реакции определить присутствие в геноме трансформанта последовательностей целевого и селективного генов, оценить качество препарата ДНК по последовательности гена «домашнего хозяйства» *actin* и исключить присутствие контаминации *A. tumefaciens* в образцах ДНК после агробактериальной трансформации растений. На рисунке 5 представлен пример мультиплекс-ПЦР для анализа трансгенных растений картофеля с модифицированным геном *gox-mod*. Установлено, что анализируемые трансгенные линии содержат целевую вставку и не контаминированы агробактериальным штаммом (таблица 2). Также разработанная система мультиплекс-ПЦР может быть использована непосредственно на практике для обнаружения и контроля за трансгенными растениями картофеля, содержащими гены *gox* или *gox-mod* и селективный маркер *nptII*.



1 – маркер молекулярного веса; 2 – геномная ДНК трансгенного растения картофеля, трансформированного вектором pBI-GOXmod, *gox* – 811 п.н., *VirE2*– 620 п.н. (отсутствует), *actin* – 550 п.н., pos-терминатор – 188 п.н.
Рисунок 5. – Электрофореграмма ПЦР-продуктов (мультиплекс), выявленных при амплификации геномной ДНК трансгенных линий картофеля с модифицированным геном *gox-mod*

Транскрипция матричной РНК, кодирующей целевой белок, происходит у всех линий, отобранных методом чашечного теста, что подтверждено с помощью метода ОТ-ПЦР. Обобщенные результаты отбора трансгенных растений картофеля с генами *gox* и *gox-mod* представлены в таблице 3.

Полученные результаты позволяют сделать заключение, что созданные векторные конструкции обеспечивают интеграцию и экспрессию целевых гетерологичных генов *gox* и *gox-mod* в трансгенных растениях табака и картофеля.

Таблица 2. – Результаты мультиплекс-ПЦР трансгенных и контрольных растений картофеля

Генетический элемент	Название образца														
	Скарб	PBI	AGL0	LP 7.3	LP 15.1	LP 15.4	LP 17.2	F 7.1	F 12.3	F 16.2	F 23.3	M 5.4	M 7.3	M 8.4	M 10.1
<i>gox/gox-mod</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>nos</i>	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>actin</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>VirE2</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

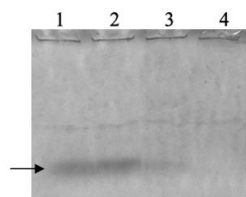
Примечание – Скарб – растения картофеля исходного сорта Скарб; PBI – растения картофеля, трансформированные векторной конструкцией pBI121; AGL0 – агробактериальный штамм *A. tumefaciens* AGL0; LP – растения картофеля, трансформированные векторной конструкцией pBI-L-GOX, F – pBI-F-GOX, M – pBI-GOXmod

Таблица 3. – Результаты отбора трансгенных линий картофеля с системами экспрессии pBI-L-GOX, pBI-F-GOX и pBI-GOXmod методами чашечного теста, ПЦР и ОТ-ПЦР

Система экспрессии	Количество отобранных линий, шт.			
	Канамицин-устойчивые	Чашечный тест	ПЦР	ОТ-ПЦР
pBI-L-GOX	120	53	53	53
pBI-F-GOX	80	24	24	24
pBI-GOXmod	37	20	20	20

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕТЕРОЛОГИЧНОГО ГЕНА GOX В РАСТЕНИЯХ БИОХИМИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

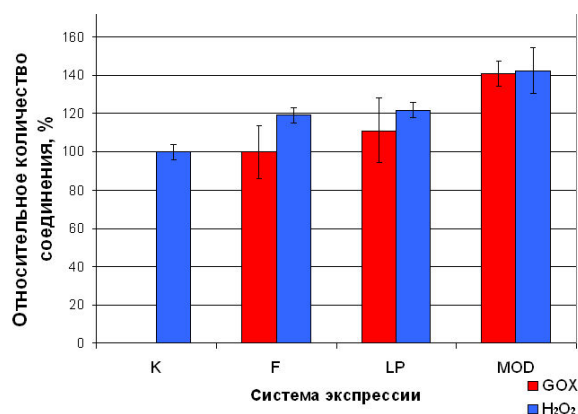
В трансгенных растениях картофеля происходит наработка белка, проявляющего глюкозооксидазную активность (рисунок 6), что свидетельствует об успешном синтезе целевого фермента в трансгенных растениях с генами *gox* и *gox-mod*.



1-3 – белок трансгенных растений картофеля; 4 – белок растений исходного сорта

Рисунок 6. – Электрофореграмма нативного электрофореза белков трансгенных линий картофеля с последующей детекцией фермента глюкозооксидазы

Оптимизация кодового состава гетерологичного гена *gox* привела к увеличению синтеза его белкового продукта, что подтверждено с помощью определения относительного содержания в растительной ткани фермента глюкозооксидазы и пероксида водорода, который образуется в результате катализируемой им реакции. Экспрессия в растениях картофеля гена *gox-mod* (MOD, рисунок 7) приводит к достоверному увеличению уровня накопления целевого белкового продукта в растительных клетках в среднем на 21,1% по сравнению с накоплением белкового продукта нативного гена *gox* (F и LP, рисунок 7).



K – растения картофеля исходного сорта Скарб и трансформированные векторной конструкцией pBI121;
F, LP, MOD – растения картофеля, трансформированные векторными конструкциями pBI-F-GOX, pBI-L-GOX и pBI-GOXmod соответственно;
GOX – фермент глюкозооксидаза;
H₂O₂ – пероксид водорода

Рисунок 7. – Относительное содержание фермента глюкозооксидазы и пероксида водорода в растительной ткани растений картофеля

Установлено, что экспрессия нативного гена *gox* привела к увеличению концентрации пероксида водорода в среднем на 23,2% относительно растений исходного сорта, а экспрессия модифицированного гена *gox-mod* – в среднем на 42,6%. Таким образом, полученный результат свидетельствует о том, что оптимизация кодового состава гена *gox-mod* привела к повышению образования пероксида водорода в среднем на 19,4% по сравнению с экспрессией нативного гена *gox*.

АНАЛИЗ УРОВНЯ УСТОЙЧИВОСТИ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ К НЕБЛАГОПРИЯТНЫМ ФАКТОРАМ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Увеличение концентрации пероксида водорода в растительной ткани способствует повышению неспецифической устойчивости растений к ряду неблагоприятных факторов, в частности, к поражению фитопатогеном *P. infestans*, вызывающему заболевание фитофтороз. Площадь поражения фитопатогеном листьев отобранных трансгенных растений в лабораторных условиях составила 7-45% (2012 г.) и 10-49% (2013 г.), в то время как у растений контрольной группы – 70% (2012 г.) и 74% (2013 г.).

В результате анализа динамики развития повреждений фитопатогеном *P. infestans* в условиях защищенного грунта показано, что трансгенные линии с генами *gox* и *gox-mod* повреждаются в меньшей степени по сравнению с контрольными растениями (таблица 4). Площадь повреждения фитофторозом листьев контрольных растений превышает в среднем на 16,6% площадь повреждения трансгенных растений с генами *gox* и *gox-mod*. Таким образом, трансгенные растения с генами *gox* и *gox-mod* дольше сохраняют жизнеспособность и имеют больше возможности для закладки и роста клубней, в отличие от растений исходного сорта.

Таблица 4. – Оценка устойчивости растений картофеля к заболеванию фитофторозом в условиях защищенного грунта, 2014 год

Образец	Площадь поражения листьев, %						AUDPC
	16 июля	23 июля	30 июля	6 августа	13 августа	20 августа	
Скарб Среднее	2,3±2,2	4,0±1,2	8,5±1,7	18,0±2,4	28,0±3,6	49,3±7,2	0,84±0,05
pBI Среднее	2,9±1,8	6,4±2,2	11,6±4,2	21,0±2,2	33,2±5,4	54,8±11,0	1,0±0,12
F 7.1	2,0	6,0	8,5	15,0	22,5	33,5	0,7
F 12.3	1,0	7,0	8,0	20,0	27,5	39,0	0,83
F 16.2	1,0	6,0	7,5	17,0	23,0	35,0	0,72
F 23.3	5,0	10,5	10,5	17,5	23,0	33,5	0,81
F Среднее	2,3±1,4	7,4±1,5	8,6±0,9	17,4±1,4	24,0±1,75	35,3±3,2*	0,77±0,06*
LP 7.3	3	6	8,5	16	21	33,5	0,70
LP 15.1	1,8	5	7	16	22,5	37	0,70
LP 15.4	6,5	7,5	10,5	15	24,5	32,5	0,77
LP 17.2	3	9	10,5	17,5	25	41,5	0,85
LP Среднее	3,6±1,5	6,9±1,4	9,1±1,4	16,1±0,7	23,3±1,5	36,1±3,1*	0,76±0,06*
M 5.4	0,1	7,0	10,0	20,0	27,0	35,0	0,82
M 7.3	0,2	7,0	10,0	20,0	27,0	38,0	0,83
M 8.4	0,1	1,0	5,0	15,0	21,0	32,0	0,58
M 10.1	0,5	3,0	5,0	15,0	20,0	35,0	0,61
M Среднее	0,2±0,2	4,5±3,0	7,5±2,9	17,5±2,9	23,8±3,8	35,0±2,4*	0,71±0,13*

Примечание – Скарб – растения картофеля исходного сорта Скарб; pBI – растения картофеля трансформированные векторной конструкцией pBI121, F – pBI-F-GOX, LP – pBI-L-GOX, M – pBI-GOXmod; * – достоверно при $P < 0,05$

В качестве критерия урожайности определяли средний вес клубней с одного куста (таблица 5). Установлено, что трансгенные растения картофеля с генами *gox* и *gox-mod* достоверно не отличаются по среднему весу клубней с одного куста от растений контрольной группы. Однако анализируемые

линии растений картофеля отличаются по среднему количеству клубней с одного куста, что может быть связано как с действием целевого гена *gox*, так и являться последствиями процедур по генетической трансформации и влияния гормональных и ростовых факторов.

Таблица 5. – Урожайность трансгенных растений картофеля, трансформированных векторными конструкциями pBI-F-GOX, pBI-L-GOX, pBI-GOXmod и pBI121

Трансформанты растений картофеля	Среднее количество клубней с 1 куста, шт.	Средний вес клубней с 1 куста, г
Скарб	8,6±3,4	579,1±263,3
pBI	11,5±4,2	571,5±192,0
F	16,4±4,6	561,5±191,5
LP	19,9±4,0	618,6±167,5
M	15,7±4,8	517,6±182,5

Примечание – Скарб – растения картофеля исходного сорта Скарб; pBI – растения картофеля, трансформированные векторной конструкцией pBI121, F – pBI-F-GOX, LP – pBI-L-GOX, M – pBI-GOXmod

На основании данных оценки устойчивости растений картофеля к фитофторозу и параметров урожайности отобраны линии LP7.3, LP15.1, LP15.4, LP17.2, F7.1, F12.3, F16.2, F23.3, M5.4, M7.3, M8.4, M10.1, которые могут быть рекомендованы для использования в селекционном процессе с целью получения растений картофеля, характеризующихся повышением уровня устойчивости к поражению фитопатогенами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. В последовательности нативного гена *gox* выявлены редкие для растений картофеля кодоны, которые могут снижать скорость трансляции целевого белка и приводить к уменьшению его содержания в растительных клетках. Установлено, что последовательность нативного гена *gox* содержит 27,4% редких для растений картофеля кодонов, для которых внутриклеточная концентрация изоакцепторных тРНК не более 10% (в 3,1% случаев) и не более 20% (в 24,3% случаев). Проведена оптимизация нуклеотидной последовательности нативного гена *gox P. funiculosum* для эффективной экспрессии в растениях *S. tuberosum*. Получена искусственно синтезированная нуклеотидная последовательность *gox-mod* с

оптимизированным кодоновым составом, но без изменения аминокислотной последовательности его белкового продукта, кодирующая функционально активную форму фермента глюкозооксидазы [5, 10].

2. Созданы векторные конструкции с нативным (pBI-L-GOX и pBI-F-GOX) и модифицированным (pBI-GOXmod) генами *gox* и *gox-mod* под контролем конститутивного 35S РНК CaMV промотора. На основе агробактериального штамма *A. tumefaciens* AGL0 получены агробактериальные трансформанты L-GOX, F-GOX и GOX-mod с векторными конструкциями pBI-L-GOX, pBI-F-GOX и pBI-GOXmod соответственно [1, 2, 5, 6, 10].

3. Методом агробактериальной трансформации листовых дисков растений картофеля сорта белорусской селекции Скарб, используя созданные векторные конструкции pBI-L-GOX, pBI-F-GOX и pBI-GOXmod, получены трансгенные формы растений, устойчивые к селективному маркеру, с трансформационной частотой 0,74–1,2 регенерантов на один эксплант. С помощью молекулярно-генетических и биохимических методов исследования подтверждена интеграция и экспрессия нативного и модифицированного гетерологичных генов *gox* и *gox-mod*. Транскрипционная активность генов *gox* и *gox-mod* выявлена у 44%, 30% и 54% канамицин-устойчивых образцов, трансформированных векторными конструкциями pBI-L-GOX, pBI-F-GOX и pBI-GOXmod соответственно [1 – 6, 8, 11, 13].

4. Разработана система мультиплекс-ПЦР, которая позволяет детектировать наличие целевых гетерологичных генов *gox* и *gox-mod* в геноме растений картофеля. С помощью мультиплекс-ПЦР показано присутствие экспрессионной кассеты с генами *gox* и *gox-mod* в геноме первичных трансформантов растений картофеля, отобранных методом чашечного теста для детекции глюкозооксидазной активности. Разработанная система мультиплекс-ПЦР позволяет проводить отбор и анализ полученных регенерантов и в результате проведения одной реакции определить наличие нескольких целевых последовательностей ДНК [3, 4].

5. Введение нативного и модифицированного генов *gox* и *gox-mod* в растительный геном приводит к синтезу в трансгенных растениях картофеля функционально активной формы фермента глюкозооксидазы. Модификация нуклеотидной последовательности нативного гена *gox* достоверно увеличивает уровень накопления глюкозооксидазы в трансгенных растениях в среднем на 21,1%, и это, в свою очередь, приводит к увеличению концентрации эндогенного пероксида водорода в среднем на 23,2% у трансгенных растений, экспрессирующих модифицированный по кодоновому составу ген *gox-mod* (pBI-GOXmod), по сравнению с

трансгенными растениями, которые экспрессируют нативный ген *gox* (pBI-L-GOX и pBI-F-GOX) [1–5].

6. Экспрессия генов *gox* и *gox-mod* в трансгенных растениях картофеля приводит к повышению устойчивости к фитофторозу, вызываемому фитопатогеном *P. infestans*. Отобранные трансгенные линии (LP7.3, LP15.1, LP15.4, LP17.2, F7.1, F12.3, F16.2, F23.3, M5.4, M7.3, M8.4, M10.1) характеризуются относительно высоким и средним уровнем устойчивости и повреждаются меньше в среднем на 16,6%, чем растения исходного сорта [3, 12].

Рекомендации по практическому использованию результатов

1. Рекомендуется использовать синтезированный ген *gox-mod* с модифицированной нуклеотидной последовательностью и рекомбинантную плазмиду pBI-GOXmod для биоинженерной модификации растений с целью повышения их устойчивости к фитопатогенам [5, 9]. Подана заявка на выдачу патента на изобретение «Синтезированный ген *gox* с модифицированной нуклеотидной последовательностью и рекомбинантная плазида pBI-GOXmod для экспрессии данного гена в растениях картофеля» за № а 20130742 от 12.06.2013.

2. Рекомендуется использовать разработанную методику мультиплекс-ПЦР, позволяющую идентифицировать целевой ген *gox* или *gox-mod*, *nos*-терминатор, ген «домашнего хозяйства» – *actin* и отсутствие агробактериальной контаминации штаммом AGL0 при проведении молекулярно-генетического анализа трансгенных растений картофеля с генами *gox* и *gox-mod* [3].

3. Рекомендуется использовать созданные линии трансгенных растений картофеля в дальнейшем селекционном процессе с целью повышения уровня устойчивости растений картофеля к поражению фитопатогенами, а также для изучения физиолого-биохимических особенностей растений, синтезирующих функционально активную форму фермента глюкозооксидазы [3, 5].

4. Рекомендуется использовать полученные данные в лекционных и практических курсах высших учебных заведений биологического профиля. Результаты исследований внедрены в учебный процесс биологического факультета БГУ в программу лабораторных занятий в рамках спецпрактикума «Методы работы с нуклеиновыми кислотами» для студентов 4 курса специальности «1-31 01 01 Биология» (акт от 9 сентября 2013) и в программу лабораторных занятий по дисциплине «Объекты биотехнологии и их промышленное использование» для студентов 4 курса специальности «1-31 01 01 Биология» (акт от 15 сентября 2014).

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ

Публикации, соответствующие пункту 18 «Положения о присуждении ученых степеней и присвоения ученых званий в Республике Беларусь»

1. **Савчин, Д.В.** Генетическая трансформация растений векторными конструкциями с геном *gox Penicillium funiculosum* / Д.В. Савчин, А.С. Панюш, Н.А. Картель // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. / Ин. генетики и цитологии НАН Беларуси; редкол. А.В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.] Минск: Право и экономика, 2011. – Т. 12. – С. 49–55.

2. **Савчин, Д.В.** Молекулярно-генетический анализ трансгенных растений картофеля с геном *gox Penicillium funiculosum* / Д.В. Савчин, А.С. Панюш, Н.А. Картель // Труды БГУ. – 2011. – Т. 6. – С. 116–120.

3. **Савчин, Д.В.** Создание и анализ трансгенных растений картофеля и табака с геном *gox Penicillium funiculosum* / Д.В. Савчин, А.С. Панюш, Н.А. Картель // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. – 2012. – № 4. – С. 16–19.

4. **Савчин, Д.В.** Разработка технологии отбора и анализа трансгенных растений картофеля с геном *gox Penicillium funiculosum* / Д.В. Савчин, А.С. Панюш, Н.А. Картель // Вестник БГУ. Сер. 2. Химия, Биология, География. – 2012. – № 3. – С. 59–62.

5. Оптимизация кодонового состава грибного гена *gox Penicillium funiculosum* для эффективной экспрессии в растениях *Solanum tuberosum* / **Д.В. Савчин**, Т.Н. Вересова, О.А. Межнина, А.С. Панюш, А.О. Вячеслава, И.В. Голденкова-Павлова // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. – 2015. – № 1. – С. 50–55.

Материалы конференций

6. **Савчин, Д.В.** Создание векторных конструкций с геном *gox Penicillium funiculosum* для генетической трансформации растений картофеля / Д. В. Савчин, А. С. Панюш // Материалы Междунар. науч. конф., посвященной 45-летию основания Института генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, 25-29 октября 2010 г., г. Минск / "Генетика и биотехнология на рубеже тысячелетий", международная научная конференция, Национальная академия наук Беларуси, Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Общественное объединение "Белорусское общество генетиков и селекционеров" ; под ред. А. В. Кильчевский. – Минск : Право и экономика, 2010. – С. 20.

7. Вячеслава, А.О. Серия модульных векторов для клонирования целевых генов и регуляторных элементов с целью обеспечения стабильной и

эффективной экспрессии гетерологичных генов в растениях / А.О. Вячеславова, И.Н. Бердичевец, Х.Р. Шимшилашвили, **Д.В. Савчин**, И.В. Голденкова-Павлова // Ломоносов-2011 [Электронный ресурс] : Материалы Международного молодежного научного форума. – Электрон. дан. и прогр. – М.: МАКС Пресс, 2011. – 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM).

8. **Савчин, Д.В.** Создание и анализ трансгенных форм растений картофеля с геном *gox Penicillium funiculosum* / Д.В. Савчин, А.С. Панюш // Международная научная конференция «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы», Минск, 8–11 октября 2012 г. – С. 21.

Тезисы докладов

9. Серия модульных векторов для клонирования целевых генов и регуляторных элементов с целью обеспечения стабильной и эффективной экспрессии гетерологичных генов в растениях / А.О. Вячеславова, И.Н. Бердичевец, Х.Р. Шимшилашвили, **Д.В. Савчин**, И.В. Голденкова-Павлова // III Всероссийский симпозиум «Физиология трансгенного растения и проблемы биобезопасности». – Москва, 2010. – С. 29.

10. Создание векторных конструкций с геном *gox Penicillium funiculosum* и искусственно синтезированным геном *gox* для генетической трансформации растений / **Д.В. Савчин**, Н.А. Картель, А.О. Вячеславова, И.В. Голденкова-Павлова // материалы XXIII Зимней молодежной научной школы "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии", Москва, 7–10 февраля 2011. – С. 162.

11. **Савчин, Д.В.** Получение и отбор трансгенных растений картофеля с геном *gox Penicillium funiculosum* / Д.В. Савчин, А.С. Панюш, Н.А. Картель // Современные аспекты генетической инженерии растений : материалы Междунар. науч. конф. Киев, 30 мая – 1 июня 2011. – С. 54.

12. **Савчин, Д.В.** Оценка устойчивости трансгенных растений картофеля с геном глюкозооксидазы к фитофторозу и черной ножке / Д.В. Савчин, А.С. Панюш, Н.А. Картель // 2-я Международная школа-конференция молодых ученых «Генетика и селекция растений, основанная на современных генетических знаниях и технологиях», Звенигород, 5–10 декабря 2011 г. – С. 65.

13. **Савчин, Д.В.** Создание и анализ генетически модифицированных растений картофеля с геном глюкозооксидазы / Д.В. Савчин, А.С. Панюш, Н.А. Картель // IV Всероссийский симпозиум: Трансгенные растения: технологии создания, биологические свойства, применение, биобезопасность / Москва, 19-23 ноября 2012. – С. 82.

РЭЗІЮМЭ

Саўчын Дзмітрый Васільевіч

Сістэмы экспрэсіі гетералагічнага гена *gox Penicillium funiculosum* і аналіз іх эфектыўнасці ў генетычна мадыфікаваных раслінах *Solanum tuberosum* L.

Ключавыя словы: глюкозааксідаза, *gox*, *Penicillium funiculosum*, тетраплоідная бульба, *Solanum tuberosum*, трансгенныя расліны, сістэмы экспрэсіі, фітафтароз, *Phytophthora infestans*.

Мэта працы: падвышэнне неспецыфічнай устойлівасці раслін бульбы да фітапатагенаў *Phytophthora infestans* і *Erwinia carotovora* з дапамогай пераносу і экспрэсіі ў іх натыўнага і мадыфікаванага генаў *gox* з *Penicillium funiculosum*.

Метады даследавання: ПЛР, мультыплекс-ПЛР, АТ-ПЛР, секвеніраванне, кланаванне, гель-электрафарэз, спектрафотаметрыя, аграбактэрыяльная трансфармацыя, фітапаталагічная ацэнка, статыстычныя метады.

Атрыманыя вынікі і іх навізна: упершыню праведзена мадыфікацыя натыўнага гена *gox* грыбнага штаму *P. funiculosum* 46.1 у адпаведнасці з частатой выкарыстання кадонаў у раслінах *S. tuberosum*. Атрымана штучна-сінтэзаваная нуклеатыдная паслядоўнасць *gox-mod* з аптымізаваным кадонавым складам, але без змены амінакіслотнай паслядоўнасці яго бялковага прадукта, якая кадуе функцыянальна актыўную форму глюкозааксідазы. Сканструяваны вектарныя сістэмы, якія забяспечваюць эфектыўную экспрэсію натыўнага і мадыфікаванага генаў *gox* у раслінах бульбы.

Упершыню атрыманы трансгенныя расліны бульбы гатунку беларускай селекцыі Скарб з натыўным і мадыфікаваным генамі *gox P. funiculosum*.

Распрацавана і апрабавана сістэма мультыплекс-ПЛР, якая дазваляе праводзіць адбор і аналіз трансгенных раслін з генам *gox*, атрыманых у выніку аграбактэрыяльнай трансфармацыі.

Рэкамендацыі па выкарыстанні: рэкамендуецца выкарыстоўваць створаныя лініі трансгенных раслін бульбы ў далейшым селекцыйным працэсе з мэтай падвышэння ўзроўня ўстойлівасці раслін бульбы да паражэння фітапатагенамі, а таксама для вывучэння фізіёлага-біяхімічных асаблівасцяў раслін, якія сінтэзуюць функцыянальна актыўную форму глюкозааксідазы.

Вобласць выкарыстання: малекулярная генетыка, біятэхналогія раслін.

РЕЗЮМЕ

Савчин Дмитрий Васильевич

Системы экспрессии гетерологичного гена *gox* *Penicillium funiculosum* и анализ их эффективности в генетически модифицированных растениях *Solanum tuberosum* L.

Ключевые слова: глюкозооксидаза, *gox*, *Penicillium funiculosum*, тетраплоидный картофель, *Solanum tuberosum*, трансгенные растения, системы экспрессии, фитофтороз, *Phytophthora infestans*.

Цель работы: повышение неспецифической устойчивости растений картофеля к фитопатогенам *Phytophthora infestans* и *Erwinia carotovora* с помощью переноса и экспрессии в них нативного и модифицированного генов *gox* из *Penicillium funiculosum*.

Методы исследования: ПЦР, мультиплекс-ПЦР, ОТ-ПЦР, секвенирование, клонирование, гель-электрофорез, спектрофотометрия, агробактериальная трансформация, фитопатологическая оценка, статистические методы.

Полученные результаты и их новизна: впервые проведена модификация нативного гена *gox* грибного штамма *P. funiculosum* 46.1 в соответствии с частотой использования кодонов в растениях *S. tuberosum*. Получена искусственно синтезированная нуклеотидная последовательность *gox-mod* с оптимизированным кодоновым составом, но без изменения аминокислотной последовательности его белкового продукта, кодирующая функционально активную форму глюкозооксидазы. Сконструированы векторные системы, обеспечивающие эффективную экспрессию нативного и модифицированного генов *gox* в растениях картофеля.

Впервые получены трансгенные растения картофеля сорта белорусской селекции Скарб с нативным и модифицированным генами *gox* *P. funiculosum*.

Разработана и апробирована система мультиплекс-ПЦР, позволяющая проводить отбор и анализ трансгенных растений с геном *gox*, полученных в результате агробактериальной трансформации.

Рекомендации по использованию: рекомендуется использовать созданные линии трансгенных растений картофеля в дальнейшем селекционном процессе с целью повышения уровня устойчивости растений картофеля к поражению фитопатогенами, а также для изучения физиолого-биохимических особенностей растений, синтезирующих функционально активную форму глюкозооксидазы.

Область применения: молекулярная генетика, биотехнология растений.

SUMMARY

Sauchyn Dzmitry Vasilievich

The expression systems of heterologous gene *gox* *Penicillium funiculosum* and analysis of their efficacy in the genetically modified plants of *Solanum tuberosum* L.

Keywords: glucose oxidase, *gox*, *Penicillium funiculosum*, tetraploid potato, *Solanum tuberosum*, transgenic plants, expression systems, late blight, *Phytophthora infestans*.

Aim of research: increase of nonspecific resistance of potato plants to pathogens *Phytophthora infestans* and *Erwinia carotovora* by transferring and expressing therein of native and modified *gox* genes from *Penicillium funiculosum*.

Method of investigation: PCR, Multiplex PCR, RT-PCR, sequencing, cloning, gel electrophoresis, spectrophotometry, agrobacterium-mediated transformation, phytopathologic assessment, statistical methods.

Obtained results and their novelty: for the first time modification of native *gox* gene of fungi strain of *P. funiculosum* 46.1 was done according to codon usage frequency in *S. tuberosum* plants. Modified *gox-mod* sequence with optimized codon usage frequency for coding of active form of glucose oxidase was obtained. At the same time the aminoacid sequence of protein was not changed. Expression vector systems for effective expression of native and modified *gox* gene in potato plants were developed.

For the first time transgenic potato plants of Belarusian selection “Skarb” with native and modified *gox* *P. funiculosum* gene were obtained.

Multiplex PCR system for selection and analyses of transgenic plants with *gox* gene that were obtained in the result of agrobacterium transformation was developed and tested.

The rate of results use: developed lines of transgenic potato plants are proposed to use for further selection of potato with high level resistance to plant pathogenic fungi and for further investigation of physiological and biochemical characteristics of plants that synthesize active form of glucose oxidase.

Field of application: molecular genetics, plant biotechnology.