

Научно-исследовательская работа

Биология

**АПРОБАЦИЯ МЕТОДОВ АГРОБИОТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ
МОБИЛИЗАЦИИ ГЕРМОПЛАЗМЫ БЕГОНИИ**

Выполнила:

Ивашкина Мария Дмитриевна

Учащаяся 11 класса

ГБОУ гимназия №52 Приморского района Санкт-Петербурга,

Россия, г. Санкт-Петербург

Руководитель:

Рахмангулов Руслан Султанович

Старший научный сотрудник лаборатории постгеномных исследований

Всероссийского института генетических ресурсов растений имени

Н.И.Вавилова, кандидат биологических наук,

Россия, г. Санкт-Петербург

Введение

Цветоводство является одной из наиболее развитых отраслей растениеводства, занимающаяся выращиванием растений для получения цветов на срезку для букетов, высадки в садах, для внутреннего украшения помещений. Среди множества цветов особое место занимает бегония, которая стала объектом данного исследования.

Несмотря на разнообразие окрасок, бегонии синего и фиолетового цвета не существует. Лепестки бегонии накапливают только антоцианы на основе пеларгонидина и цианидина, в основном пеларгонидин и цианидин 3,5-диглюкозид. У бегонии отсутствуют фиолетовые или синие сорта цветов из-за отсутствия антоцианов на основе дельфинидина, обычно являющихся основными компонентами фиолетовых и синих цветов, поскольку бегонии не содержат флавоноида 3',5'-гидоксилазы (F3'5'H), ключевого фермента для биосинтеза дельфинидина. Решить эту проблему можно с помощью современных методов агробιοтехнологии. Ожидается, что экспрессия гена F3'5'H в бегонии приведет к образованию дельфинидина и, таким образом, к новой окраске цветка с голубым оттенком.

Целью данной работы является изучение генетического потенциала бегонии для дальнейших селекционных работ.

Задачи:

1. Изучить способы получения синей окраски лепестков с помощью методов агробιοтехнологии
2. Ввести в культуру *in vitro* различные экспланты бегонии
3. Выделить ДНК бегонии из растительного материала
4. Поставить ПЦР с праймерами к гену DFR

Основная часть

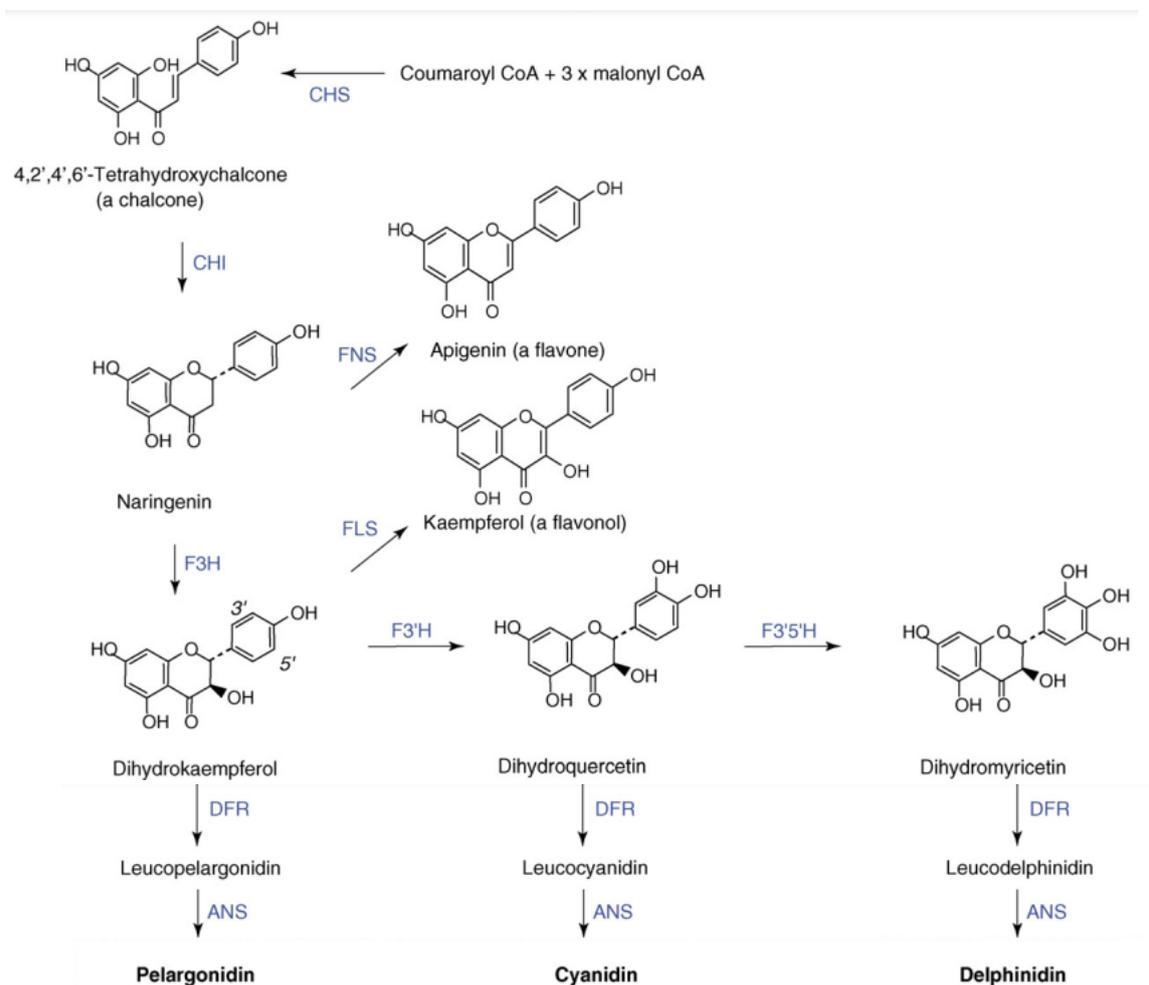
Получение синей окраски

Производство дельфинидина в лепестках является наиболее популярным способом изменения цвета на сине-фиолетовый, потому что его биосинтез регулируется одним ферментом F3'5'H.

Характер гидроксирования В-кольца антоцианов играет ключевую роль в определении цвета. Вторичный метаболит дигидрокаэмпферол (ДНК) может быть гидроксирован в положении 3' для получения дигидрокверцетина (ДНҚ) и в положении 3' и 5' для получения дигидромирицетина (ДНМ) (рис. 1).

ДНҚ приводит к образованию антоцианов на основе цианидина, способствующих красному и розовому цвету цветов. Производство ДНМ приводит к образованию антоцианов на основе дельфинидина.

Рисунок 1, Путь биосинтеза флавоноидов



Источник Tanaka Y, Ohmiya A. Seeing is believing: engineering anthocyanin and carotenoid biosynthetic pathways. *Curr Opin Biotechnol.* 2008;19(2):190-197.

Ферменты цитохрома P450: флавоноид 3'-гидроксилаза (F3'H) (ген CYP75B) и флавоноид 3'-5'-гидроксилаза (F3'5'H) (ген CYP75A), - катализируют эти гидроксирования, и поэтому их присутствие или отсутствие у разных видов

растений способствует многим изменениям цвета лепестков, наблюдаемым в природе (Tanaka Y., Brugliera F., 2013).

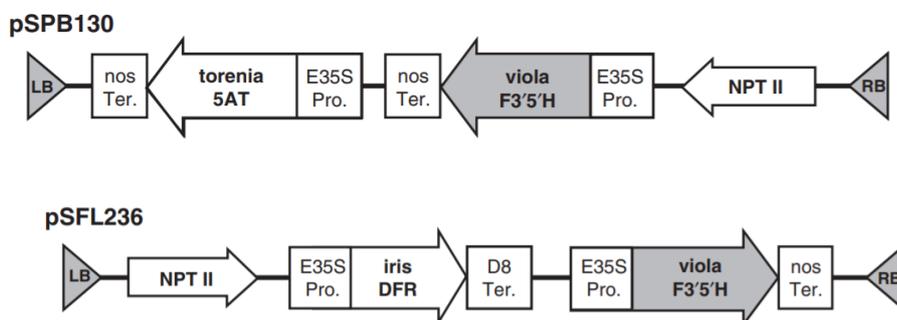
Ключевым ферментом биосинтеза дельфинидина является F3'5'H. КДНК, кодирующие F3'5'H, первоначально были выделены из петунии (Holton T., et al., 1993) и баклажана (Toguri T., et al., 1993) и в настоящее время выделены из различных видов растений (Tanaka Y., Brugliera F., 2013).

Восстановление дигидрофлавонолов до лейкоантоцианидинов катализирует дигидрофлавонол-4-редуктаза (DFR), который является НАДФН зависимой редуктазой. Субстратная специфичность DFR часто определяет, какие антоцианидины накапливает растение. Например, DFR *Iris*×*hollandica* не использует дигидрокаэмпферол в качестве субстрата, что подходит для преобразования метаболического потока в сторону биосинтеза дельфинидина, когда такой DFR совместно экспрессируется с геном F3'5'H.

Функциональная замена DFR исходного растения на DFR ириса совместно с трансформацией каллусов с помощью *Agrobacterium tumefaciens*, содержащей вектор PSPB130, была проведена у нескольких сортов розы в исследовании Yukihiisa et al. Результаты показали, что дополнительная экспрессия гена DFR ириса (вектор PSFL236) увеличивала содержание дельфинидина.

Поэтому замена DFR бегонии на DFR *Iris*×*hollandica* вместе с модификацией геном F3'5'H является одним из возможных методов получения синей окраски цветка.

Рисунок 2, Схематическое представление векторов



Источник: Yukihiisa K., Masako F., et al. (2007) Engineering of the Rose Flavonoid Biosynthetic Pathway Successfully Generated Blue-Hued Flowers Accumulating Delphinidin Plant Cell Physiol. 48(11): 1589–1600

Изучение генетического потенциала бегонии

Введение эксплантов в условия *in vitro*

Для введения бегонии в культуру *in vitro* и последующего микрোকлонального размножения требуется пройти несколько этапов:

1. Приготовление питательной среды, содержащей микро- и макроэлементы, витамины группы В, сахарозы, фитогормонов для стимуляции роста (цитокинов и ауксинов).
2. Выбор растения-донора, изолирование и дезинфекция эксплантов, получение стерильного материала;
3. Стимуляция дифференцировки клеток фитогормонами, получение и укоренение размноженных побегов с последующей адаптацией их к почвенным условиям

Для введения в *in vitro* были взяты листья и почки двух образцов с белой и розовой окраской цветов.

Для приготовления питательной среды была взята среда Мурасиге-Скуга (МС) макро МС 50 мл/л, микро МС 1 мл/л, раствор витаминов 1мл/л, агар-агар 6 г/л, сахароза 20 г/л, ВАР (6 бензиламинопуринов) 0.5 мл/л, хелат железа 10 мл/л, а также Зеатин (Зеа) 0,1 мл/л для среды №2 и TDZ (Тидиазурон) 0,1 мл/л для среды №3. рН раствора составила 5.8

Перед введением в условия *in vitro* листья и стебли были промыты под проточной водой для удаления загрязнения и произведена многоступенчатая стерилизация: моющим средством в течении 5 минут, 70% раствором этилового спирта в течении 1 мин. После этого половина эксплантов с были промыты в условиях ламинар-бокса АСЕ (действующее вещество – натрия гипохлорит (NaOCl)) концентрацией 0,03%, другая половина – с H₂O₂ в течении 10 минут. Далее была произведена трёхкратная промывка стерильной дистиллированной водой в течении 5 минут.

Листья и стеблевые экспланты были высажены в питательную среду.

В результате наилучшие показатели по количеству живых эксплантов (50%) выявлены при стерилизации листьев белой бегонии АСЕ и H₂O₂. 25%

живых стеблевых эксплантов введенных в *in vitro* белой бегонии были получены при стерилизации H₂O₂. Можно сделать вывод, что использованные варианты стерилизации эксплантов бегонии требуют доработки.

Таблица 1, результаты введения в условия *in vitro*

Культура	Тип экспланта	Заражен, %	Некрот, %	Чист, %
Бегония белая, H ₂ O ₂	Стебель	75	0	25
Бегония белая, АСЕ	Стебель	100	0	0
Бегония белая, H ₂ O ₂	Лист	0	50	50
Бегония белая, АСЕ	Лист	25	25	50
Бегония розовая	Стебель	100	0	0
Бегония розовая	Лист	100	0	0

Выделение ДНК бегонии из растительного материала

В последующем, была выделена ДНК из зафиксированных листьев бегонии (№1-№6) и листьев спатифиллюма (*Spathiphyllum*) №7 и замиокулькаса (*Zamioculcas*) №8.

Выделение ДНК было проведено по протоколу набора QIAGEN Plant Mini Kit. Отличием набора являются фильтрующие колонки, которые позволяют получать более качественную ДНК.

Были измерены концентрации выделенной ДНК с помощью наноспектрофотометра. С результатами можно ознакомиться в таблице.

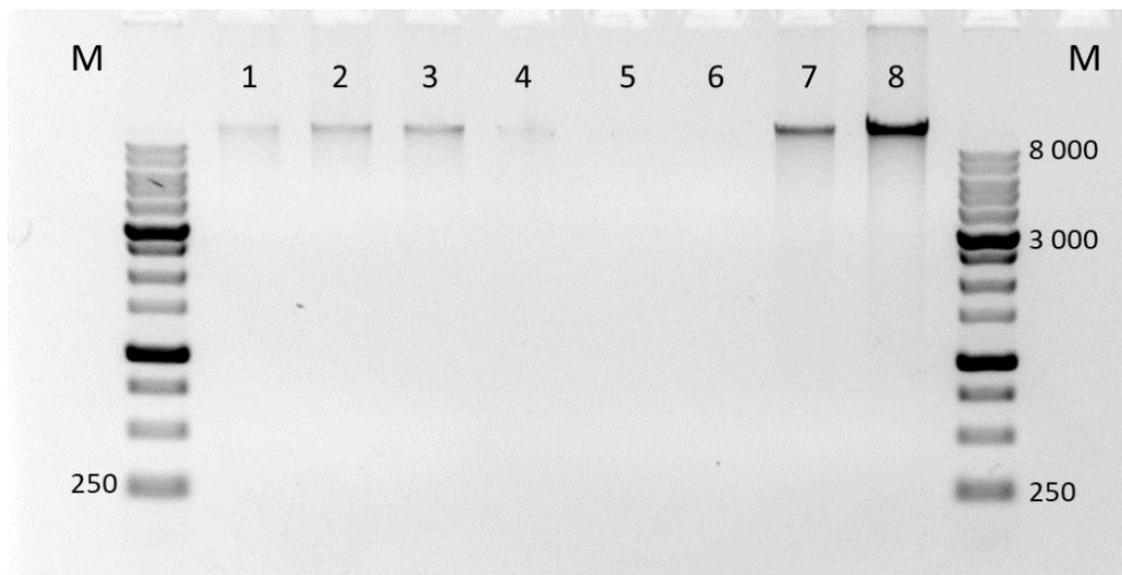
Таблица 2, концентрация выделенной ДНК

№ образца	1	2	3	4	5	6	7	8
Концентрация ДНК, мкг/мкл	2,75	1,55	1,8	1,8	-	-	7,65	14,5

В образце 5 и 6 ДНК выделено не было. Выделенная ДНК бегонии отличается низкой концентрацией, по сравнению с ДНК спатифиллюма и замиокулькаса, но является достаточной для проведения дальнейших работ.

Для визуализации выделенной ДНК был проведен электрофорез.

Рисунок 3, электрофореграмма выделенной ДНК



Полимеразная цепная реакция с праймерами к гену DFR

Проведена полимеразная цепная реакция с праймерами гена DFR (Dihydroflavonol 4-reductase).

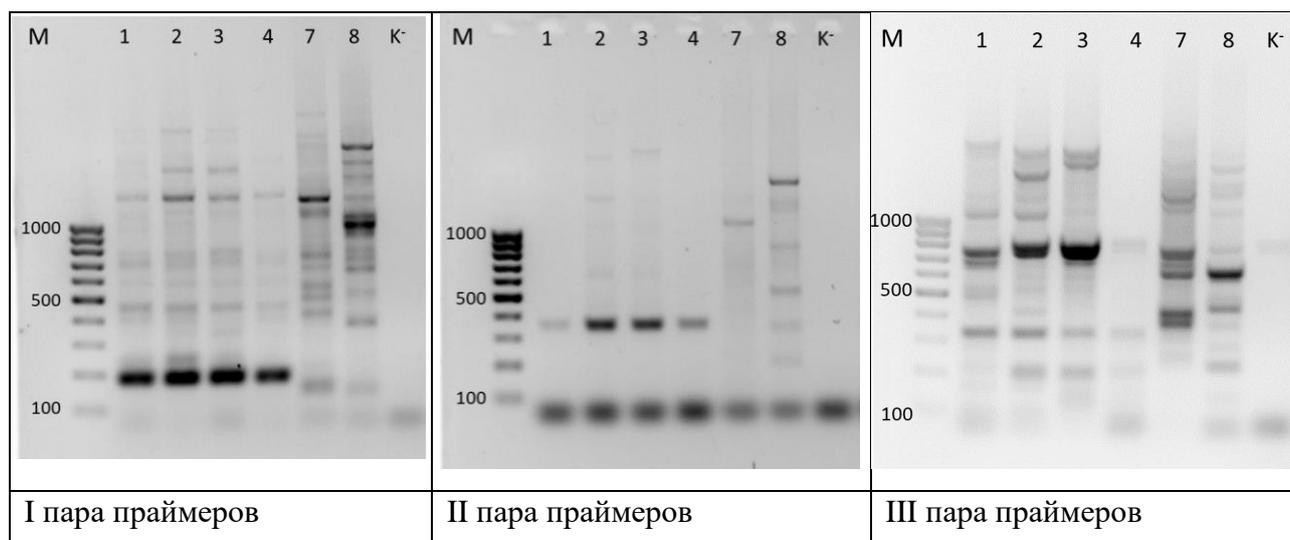
Для приготовления смеси ПЦР на 1 эппендорф было взято 12,5 мкл реакционной смеси БиоМастер HS-TaqПЦР (2×), содержащей высокопроцессивную рекомбинантную TaqДНК-полимеразу, смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов, ПЦР буфер, Mg²⁺, 5 мкл ДНК, вода. Общий объем составил 25 мкл. Использовался режим, приведенный в таблице.

Таблица 3, режим ПЦР

Шаг	Температура, °C	Время инкубации	Количество циклов
Предварительная денатурация	95	1.5 мин	1
Денатурация	95	30 сек	35
Отжиг	53, 55, 57	30 сек	
Элонгация	72	1 мин/т.п.о	
Финальная элонгация	72	7 мин	1

Для визуализации продуктов ПЦР был проведен электрофорез.

Рисунок 4, электрофореграмма продуктов ПЦР



Ожидаемый размер продукта – около 1000 пар оснований. Поскольку геном бегонии не секвенирован, возникает проблема с подбором праймеров. Дизайн праймеров был произведен по близкородственному семейству *Cucurbitaceae*, но последовательность нуклеотидов у бегонии может отличаться, поэтому есть вероятность наработки другого продукта.

По результатам амплификации для дальнейшего изучения интересны фрагменты в 200 пар оснований с 1-ой пары праймеров, со 2-ой пары праймеров – в 360 пар оснований, с 3-й пары праймеров – 730-740 пар оснований.

Заключение

Перед трансформацией каллусов геном F3'5'Н и функциональной заменой DFR бегонии необходимо решить ряд выявленных в ходе работы проблем.

Для успешного введения гермоплазмы бегонии в культуру *in vitro* и последующего формирования каллуса для модификации агробактерией необходимо доработать режим стерилизации эксплантов.

После проведения элюции фрагментов в 200 пар оснований с 1-ой пары праймеров, со 2-ой пары праймеров – в 360 пар оснований, с 3-й пары праймеров – 730-740 пар оснований из агарозного геля необходимо секвенировать ДНК для

уточнения расположения в геноме и выявления функции транскрибируемых белков.

Список литературы

- Breeding N. (2018) Recent advances in the research and development of blue flowers
Naonobu Science 68: 79–87
- Brugliera F, Tao GQ, Tems U, et al. (2013) Violet/blue chrysanthemums--metabolic engineering of the anthocyanin biosynthetic pathway results in novel petal colors. *Plant Cell Physiol.* 54(10):1696-1710
- Chandler, S. and Tanaka, Y. (2007) Genetic modification in floriculture. *Crit. Rev. Plant Sci.* 26: 169–197.
- Davies, K.M. and Schwinn, K.E. (2006) Molecular biology and biotechnology of flavonoid biosynthesis. In *Flavonoids Chemistry, Biochemistry and Applications*. Edited by Andersen, O.M. and Markham, K.R. pp. 143–218. CRC, Boca Raton, FL.
- Holton, T.A., F.Brugliera, D.R.Lester, Y.Tanaka, C.D.Hyland, J.G.T. Menting, C.-Y.Lu, E.Farcy, T.W.Stevenson and E.C.Cornish (1993) Cloning and expression of cytochrome P450 genes controlling flower colour. *Nature* 366: 276–279.
- Takatsu, Y., Hayashi, M. and Sakumao, F. (2000) Transgene inactivation in *Agrobacterium*-mediated chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) transformants. *Plant Biotechnol.* 17: 241–245
- Tanaka, Y., F.Brugliera (2013) Flower colour and cytochromes P450. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 368: 20120432
- Toguri, T., N.Umemoto, O.Kobayashi and T.Ohtani (1993) Activation of anthocyanin synthesis genes by white light in eggplant hypocotyl tissues, and identification of an inducible P-450 cDNA. *Plant Mol. Biol.* 23: 933–946.
- Yukihisa K., Masako F., et al. (2007) Engineering of the Rose Flavonoid Biosynthetic Pathway Successfully Generated Blue-Hued Flowers Accumulating Delphinidin *Plant Cell Physiol.* 48(11): 1589–1600