

УДК 577.114:581.143

ВЛИЯНИЕ АГРОБАКТЕРИАЛЬНЫХ ГЕНОВ *rol* НА СОДЕРЖАНИЕ, СТРОЕНИЕ ПЕКТИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ И АКТИВНОСТЬ ГЛИКАНАЗ В КУЛЬТУРАХ ТРАНСГЕННЫХ КЛЕТОК *Rubia cordifolia*

© 2013 г. Е. А. Пунтер*, О. В. Попейко*, Ю. Н. Шкрыль**, Г. Н. Веремейчик**, В. П. Булгаков**,**, Ю. С. Оводов*

*Институт физиологии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, 167982
e-mail: gunter@physiol.komisc.ru

**Биолого-почвенный институт ДВО РАН, Владивосток, 690022
e-mail: yn80@mail.ru

***Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, 690950
e-mail: bulgakov@ibss.dvo.ru

Поступила в редакцию 08.10.2012 г.

Экспрессия гена *rolB* приводила к увеличению содержания пектинов в клетках марены сердцелистной (*Rubia cordifolia* L.), тогда как включение гена *rolC* вызывало снижение синтеза пектинов, которое зависело от уровня его экспрессии. В результате экспрессии генов *rolA*, *rolB* и *rolC* происходило увеличение содержания арабиногалактана (АГ) в клетках. С увеличением уровня экспрессии генов *rolB* и *rolC* происходило более существенное снижение содержания остатков арабинозы в пектине, что сопровождалось ростом активности α -L-арабинофуранозидазы в клетках. Кроме того, с увеличением уровня экспрессии гена *rolB* увеличивалось количество остатков галактозы в пектине, которое было обусловлено снижением активности β -галактозидазы в клетках. Снижение содержания остатков галактуроновой кислоты в пектине усиливалось в ряду от *rolC* к *rolB* и *rolA* трансгенов. Независимо от типа гена снижалось содержание остатков арабинозы в АГ. С увеличением уровня экспрессии гена *rolB* происходило более существенное снижение содержания остатков арабинозы в АГ.

DOI: 10.7868/S0555109913040065

Пектиновые вещества включают пектиновые полисахариды (гомогалактуронан, рамногалактуронаны I и II, ксилогалактуронан и апиогалактуронан) и сопутствующие арабинаны, галактаны и арабиногалактаны [1]. Эти полисахариды входят в состав клеточных стенок практически всех высших наземных и водных растений и выполняют важные биологические функции [1, 2]. Интерес к ним обусловлен также их высокой физиологической активностью и ценными техническими свойствами. Известно, что биологические функции и физиологическая активность растительных полисахаридов определяется особенностями их строения [3–5]. В связи с этим актуален поиск эффективных источников сырья и методов модификации полисахаридов с целью получения полимеров с заданными структурой и свойствами.

Разработка способов направленного изменения активности ферментов клеточной стенки открывает возможность получения полисахаридов с конкретными ценными свойствами и определенной структурой [6]. Модификация структуры пектиновых веществ в культурах клеток растений под действием агробактериальных генов может

служить одним из подходов для получения полисахаридов с заданным строением и свойствами.

Различные методические приемы клеточной и генетической инженерии стали составной частью современной молекулярной и клеточной биологии, биохимии и биотехнологии, благодаря которым стало возможным получение модифицированных полисахаридов. Для изучения функции пектинов в растениях и взаимосвязи структуры и функции пектиновых веществ применяют два подхода: 1) получение мутантных форм растений с измененной морфологией и строением пектина; 2) экспрессия в растениях чужеродных генов, кодирующих активность гликаназ (гликозидгидролаз) [7–10].

Перспективным направлением является использование для модификации пектиновых веществ регуляторных генов *rol*. Гены *rolA*, *rolB* и *rolC*, выделенные из T-ДНК Ri плазмид почвенных бактерий *Agrobacterium rhizogenes* штамма А4, участвуют в индукции образования “волосатых корней” (hairy roots) в трансформированных растениях, оказывают влияние на рост и развитие растений, а также являются активаторами вто-

ричного метаболизма растений [11, 12]. Известно, что трансформация генами *rolB* и *rolC* различных видов растений вызывала морфологические аномалии, такие, как уменьшение веса растений и длины междоузлий, увеличение разветвленности, уменьшение размера цветков и листьев. Кроме того, трансформация индуцировала образование корней, указывая на ауксинподобный эффект этих генов [13, 14].

Изменение продукции первичных метаболитов растения, в частности полисахаридов и ферментов, при трансформации генами *rol* не изучено. Было только показано, что в культурах клеток женьшеня *Panax ginseng*, трансформированных агробактериальными генами *rolC*, происходило увеличение активности карбогидраз, таких, как α - и β -D-галактозидазы [15] и 1,3- β -D-глюканазы [16]. Данные ферменты действуют на полисахариды растительной клеточной стенки, в частности на структуру боковых цепей пектинов и арабиногалактанов. До настоящего времени не проводились исследования по выяснению роли генов *rol* в регуляции активности гликаназ, особенностей строения и биосинтеза растительных полисахаридов.

В качестве модельной системы были выбраны трансгенные каллусные культуры лекарственного растения марены сердцелистной *Rubia cordifolia* L., экспрессия генов *rol* в которых активировала биосинтез антрахинонов [17].

Цель работы – выяснение роли агробактериальных генов *rol* в регуляции биосинтеза полисахаридов и активности гликаназ растительных клеток.

МЕТОДИКА

Контрольная и трансформированные культуры *Rubia cordifolia* L. Каллусные культуры получены из листьев трехнедельного стерильного микро-растения *Rubia cordifolia* L. [17]. Нетрансформированную культуру, которую использовали в качестве контроля, обозначали R. Все трансгенные культуры марены сердцелистной были получены из листьев того же растения путем агробактериальной трансформации с помощью штамма *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, содержащего гены *rol* в составе бинарного вектора pPCV002 [18], как описано ранее [19]. Трансгенные культуры с низким, средним и высоким уровнем экспрессии генов *rolB* и *rolC* были обозначены RBL, RBM, RBH и RCL, RCM, RCH соответственно. Корнеобразующие каллусная и суспензионная культуры с высокой экспрессией гена *rolC* обозначены RCH-RC (RCH-roots callus) и RCH-RS (RCH-roots suspension) соответственно. *rolA*-трансгенная культура обозначена RA. Трансгенная культура RA4 с совместной экспрессией генов *rol* была получена пу-

тем трансформации диким штаммом *Agrobacterium rhizogenes* A4 [20]. Как контрольная, так и трансгенные культуры обладали стабильными ростовыми характеристиками и были подробно описаны ранее [21]. Условия культивирования и составы сред были идентичны для контрольной и трансгенных культур: каллусы выращивали в колбах Эрленмейера объемом 100 мл при 25°C в темноте на среде W_{B/A} [17], содержащей 0.5 мг/л 6-бензиламинопурина и 2.0 мг/л α -нафтилуксусной кислоты. Каллусы субкультивировали с интервалом 30 сут.

Выделение полисахаридов. Сухую биомассу ищерапывающе экстрагировали в аппарате Сокслета органическими растворителями (метанолом и хлороформом) для удаления низкомолекулярных примесей. Полисахариды из воздушно-сухого остатка биомассы выделяли как описано в работе [22]. В результате получали две фракции полисахаридов: пектин и арабиногалактан (АГ). Содержание полисахаридных фракций представляли в процентах от сухой биомассы, предварительно обработанной метанолом и хлороформом. Эксперименты проводили 3 раза.

Общие аналитические методы. Во фракциях полисахаридов определяли содержание гликуроновых кислот по реакции с 3,5-диметилфенолом в присутствии концентрированной серной кислоты [23], содержание белка определяли методом Лоури. Общее содержание углеводов устанавливали по реакции с фенолом в присутствии серной кислоты [24]. Спектрофотометрические измерения проводили на приборе Ultrospec 3000 (“Pharmacia Biotech”, Великобритания). ГЖХ выполняли на приборе Hewlett-Packard 4890A (“Hewlett-Packard”, США) с пламенно-ионизационным детектором и интегратором HP 3395A на капиллярной колонке RTX-1 (0.25 мм × 30 м) (“Restek”, США), газ-носитель – аргон. Средневесовую (M_w) и среднечисловую (M_n) молекулярную массу полисахаридов определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии, которую проводили, как описано ранее [25]. Образец (2–3 мг) растворяли в 1.0 мл 0.15 М раствора NaCl в бидистиллированной воде и фильтровали. Для анализа использовали хроматографическую систему: насос SD-200 (“Dynamax”, США), колонку Shodex Asahipak GS-620HQ (7.6 мм × 30 см) (“Shimadzu”, Япония) и предколонку Shodex GS-26 7B (7.6 мм × 5 см) (“Shimadzu”, Япония), термостат CTO-10AS (“Shimadzu”, Япония), детектор-рефрактометр RID G136A (“Shimadzu”, Япония). Элюирование проводили 0.15 М NaCl при 40°C со скоростью потока 0.5 мл/мин. Для калибровки колонки использовали декстрансульфаты с молекулярными массами 36–50, 400–600 и 1400 кДа (“Sigma”, США).

Полный кислотный гидролиз. Полисахаридные фракции (по 2.0–2.5 мг) гидролизовали 2.0 М трифторуксусной кислотой (1.0 мл) при 100°C в течение 3–4 ч. Затем гидролизаты упаривали в вакууме с метиловым спиртом до полного удаления трифторуксусной кислоты. В качестве внутреннего стандарта использовали миоинозит (0.5 мг/мл). Моносахариды идентифицировали с помощью ГЖХ в виде соответствующих ацетатов полиолов [26].

Анализ активности гликаназ. Биомассу гомогенизировали в 0.05 М натрий-ацетатном буфере, pH 5.0, соотношение биомасса–буфер 1 : 10, центрифугировали при 10000 g 20 мин. Затем супернатант диализовали 3 сут против 0.05 М натрий-ацетатного буфера, pH 5.0, при 4°C и центрифугировали. В супернатанте определяли активность внутриклеточных ферментов. Агаризованную культуральную среду центрифугировали при 10000 g 20 мин, супернатант диализовали 3 сут против 0.05 М натрий-ацетатного буфера, pH 5.0, при 4°C и снова центрифугировали. В супернатанте определяли активность внеклеточных ферментов.

Активность полигалактуроназы определяли по накоплению редуцирующих сахаров после 10 мин инкубации раствора фермента при 50°C с 1%-ной полигалактуроновой кислотой (“ICN”, США) в 0.05 М натрий-ацетатном буфере, pH 4.6. Образовавшиеся восстанавливающие сахара определяли методом Нельсона–Сомоджи [27]. Калибровочный график строили по D-галактуроновой кислоте. За единицу активности пектиназы принимали такое количество фермента, которое при данных условиях освобождает из полигалактуроновой кислоты 1 мкмоль D-галактуроновой кислоты за 1 мин.

Активность пектинэстеразы (КФ 3.1.1.11) устанавливали титрометрическим определением освобожденных карбоксильных групп в результате гидролиза яблочного пектина (“Sigma”). За единицу активности пектинэстеразы принимали такое количество фермента, которое катализирует гидролиз 1 мкэкв сложноэфирных связей в молекуле пектина за 1 мин при 30°C [28].

Активность α -L-арабинофуранозидазы (КФ 3.2.1.55) и β -галактозидазы (КФ 3.2.1.23) определяли спектрофотометрическим способом при 400 нм с использованием 4-нитрофенил- α -L-арабинофуранозиды и 2-нитрофенил- β -D-галактопиранозиды (“Sigma”) как субстратов соответственно. Калибровочный график строили по *n*-нитрофенолу. За единицу α -L-арабинофуранозидазной и β -галактозидазной активности принимали такое количество фермента, которое расщепляет 1 мкмоль субстрата за 1 мин при pH 4.2 и 30°C [29].

Удельную активность ферментов выражали как отношение единиц активности фермента к 1 мг белка (ед./мг). Эксперименты проводили 3–5 раз.

Таблица 1. Содержание полисахаридов в клеточных культурах *R. cordifolia*, трансформированных генами *rol*

Линия	Выход пектина, %	Выход арабиногалактана, %
R (контроль)	3.4 ± 0.3	1.1 ± 0.1
RA	2.8 ± 0.3	1.1 ± 0.1
RBL	4.3 ± 0.3* ^a	2.2 ± 0.2* ^a
RBM	4.9 ± 0.8* ^a	1.9 ± 0.1*
RBH	2.4 ± 0.7	1.5 ± 0.2*
RCL	3.5 ± 0.1	1.6 ± 0.1*
RCM	2.8 ± 0.3	1.7 ± 0.7
RCH	2.0 ± 0.2*	1.3 ± 0.1
RCH-RS	4.3 ± 0.3*	0.9 ± 0.2
RCH-RC	5.4 ± 0.4*	0.6 ± 0.03*
RA4	4.7 ± 0.8	1.8 ± 0.3*

Примечание. В табл. 1–3 R – нетрансформированная культура – контроль; RA – культура, трансформированная геном *rolA*; RBL, RBM и RBH – культуры трансформированные геном *rolB* с низким, средним и высоким уровнем экспрессии трансгена соответственно; RCL, RCM и RCH – культуры, трансформированные геном *rolC* с низким, средним и высоким уровнем экспрессии трансгена соответственно; RA4 – культура, трансформированная диким штаммом *A. rhizogenes* A4.

* Различия достоверны при сравнении контроля со всеми линиями ($p < 0.05$). ^a Различия достоверны при сравнении *rolB* и *rolC* трансгенов ($p < 0.05$).

Статистический анализ. При статистической обработке данных вычисляли среднее арифметическое значение и среднеквадратичное отклонение. Достоверность оценивали по *t*-критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Содержание пектиновых веществ в трансгенных культурах. Из каллусных культур марены сердцелистной *Rubia cordifolia*, нетрансформированной (контроль) и трансформированных генами *rolA*, *rolB* и *rolC*, а также культуры, трансформированной диким штаммом *A. rhizogenes* A4, экстракцией водой и раствором оксалата аммония были выделены АГ и пектин соответственно. Выход пектина в контрольной линии марены и линии, трансформированной геном *rolA*, составил 3.4 и 2.8% соответственно (табл. 1). Процентное содержание пектина в линиях, трансформированных генами *rolB* и *rolC*, варьировало от 2.4 до 4.9% и от 2.0 до 5.4% соответственно. Содержание пектина в линии, трансформированной диким штаммом *A. rhizogenes* A4, составляло 4.7%. Выход АГ в контрольной линии и линии, трансформированной геном *rolA*, был одинаковым и составлял 1.1%. Процентное содержание АГ в линиях, трансформированных генами *rolB* и *rolC*, варьировало от 1.5 до 2.2% и от 0.6 до 1.7% соответственно, в линии,

трансформированной диким штаммом *A. rhizogenes* A4, составило 1.8%.

Установлено, что выход пектина в трансгенных культурах изменялся в зависимости от типа гена следующим образом: выход был выше в *rolB*, по сравнению с *rolC* трансгенами для линий с низкой (RBL и RCL) и средней (RBM и RCM) экспрессией в 1.2 и 1.7 раза соответственно, в линиях с высокой экспрессией (RBH и RCH) выход не изменялся, в *rolA* трансгене и в культуре RA4, с совместной экспрессией генов *rol*, выход также не изменялся по сравнению с контролем (табл. 1).

Показано, что выход пектина в трансгенных каллусах по сравнению с контролем изменялся в зависимости от уровня экспрессии гена (низкий, средний или высокий) следующим образом: увеличивался в 1.4 раза в *rolB* трансгенах с низкой и средней экспрессией (линии RBL и RBM), снижался в 1.7 раза в *rolC* трансгенах с высокой экспрессией (линия RCH). В корнеобразующих линиях, экспрессирующих ген *rolC* (RCH-RC и RCH-RS), выход пектина увеличивался в 1.3–1.6 раза.

Данные свидетельствуют о том, что экспрессия гена *rolB* приводила к увеличению содержания пектинов в клетках марены сердцелистной (*Rubia cordifolia* L.), тогда как экспрессия *rolC* ингибировала синтез пектинов. Ингибирующий эффект гена *rolC* зависел от уровня его экспрессии: снижение биосинтеза пектина было характерно только для трансгенов марены с высокой степенью экспрессии гена. При появлении признаков дифференциации клеток (образование корней) в трансгенах *rolC* ингибирующий эффект не наблюдался.

Выход АГ изменялся в зависимости от типа гена следующим образом: был в 1.4 раза выше в *rolB*, по сравнению с *rolC* трансгенами для линий с низким уровнем экспрессии, и не изменялся в линиях со средней и высокой экспрессией. Ген *rolA* не оказывал влияние на содержание АГ в трансгенных клетках. Совместная экспрессия генов *rol* в культуре RA4 приводила к увеличению продукции АГ в 1.7 раза по сравнению с контролем.

При изменении уровня экспрессии генов процентное содержание АГ также менялось. Выход увеличивался в 1.4 раза в *rolC* трансгенах с низкой экспрессией (линия RCL) и в 2.0, 1.7 и 1.4 раза в *rolB* трансгенах с низкой, средней и высокой экспрессией соответственно. В корнеобразующей с высокой экспрессией гена *rolC* каллусной культуре (RCH-RC) выход АГ снижался в 1.8 раза. Данные свидетельствуют о том, что экспрессия гена *rolB* оказывала больший стимулирующий эффект на биосинтез АГ в клетках, чем гены *rolA*, *rolC* и трансформация диким штаммом *A. rhizogenes*.

Таким образом, трансформация генами *rol* позволяла увеличить биосинтетическую активность культивируемых клеток растений.

Общая химическая характеристика пектиновых веществ трансгенных культур. Определен моносахаридный состав пектинов трансгенных культур марены сердцелистной, трансформированных генами *rol*, и проведено сравнение с немодифицированной культурой (табл. 2). Показано, что пектины из трансгенных и контрольных каллусов (линия R) марены содержали большое количество остатков D-галактуроносовой кислоты (44–75%), основными нейтральными компонентами были остатки галактозы (5.3–12.2%), арабинозы (2.7–8.2%) и рамнозы (0.8–1.6%) (табл. 2). Соотношение арабиноза/галактоза составляло 1 : (0.9–2.6). В составе полисахарида также были обнаружены в небольшом количестве остатки глюкозы, ксилозы и маннозы.

При трансформации клеток генами *rolB* и *rolC* в линиях со средней (RBM и RCM) и высокой (RBH и RCH) экспрессией в составе пектина по сравнению с контролем (R) наблюдали снижение содержания остатков арабинозы в 1.3 и 1.4–2.4 раза соответственно. В линиях RBH и RCL отмечали увеличение содержания остатков галактозы в 1.6 и 1.3 раза соответственно. У корнеобразующей линии с высоким уровнем экспрессии RCH-RS происходило снижение содержания остатков арабинозы и галактозы в 1.2 и 1.5 раза соответственно по сравнению с контролем. В корнеобразующей линии RCH-RC наблюдали снижение содержания остатков галактозы в 1.4 раза. При сравнении каллусной линии RCH с корнеобразующими линиями RCH-RC и RCH-RS было установлено, что появление признаков дифференциации клеток приводило к увеличению содержания остатков арабинозы в пектине в 2.2 раза. В культурах, трансформированных геном *rolA* и диким штаммом *A. rhizogenes*, количество нейтральных моносахаридных остатков существенно не изменялось. Содержание остатков галактуроносовой кислоты уменьшалось в *rolA*, *rolB*, и *rolC* трансгенах в 1.7, 1.5 и 1.2 раза соответственно, в корнеобразующих *rolC* трансгенах в 1.4–1.7 раза, в культуре, трансформированной диким штаммом *A. rhizogenes*, в 1.7 раза. Практически для всех линий отмечено снижение содержания белка и остатков глюкозы.

При трансформации клеток геном *rolA* и диким штаммом *A. rhizogenes* средневесовая молекулярная масса (M_w) пектина была близка к значению в контроле (табл. 2). В *rolB* трансгенах с низкой и средней экспрессией M_w пектина увеличивалась в 1.1 раза, а в трансгенах с высокой экспрессией снижалась в 1.1 раза. В *rolC* трансгенах с низкой, средней и высокой экспрессией M_w пектина возрастала в 1.1–1.3 раза. В корнеобразующих линиях RCH-RS наблюдали снижение M_w в 1.5 раза, тогда как в RCH-RC отмечалось увеличение M_w в 1.2 раза. Среднечисловая молекулярная масса

Таблица 2. Характеристика полисахаридов, выделенных из каллусных культур *R. cordifolia*, трансформированных генами *rol*

Фракция	Нейтральные моносахариды, %						GalA, %	Белок, %	M _w , кДа	M _n , кДа
	Gal	Ara	Rha	Glc	Xyl	Man				
Пектин										
R-II (контроль)	7.8	6.5	1.5	4.6	0.4	0.1	74.9	3.5	242	43.8
RA-II	8.5	6.5	1.4	1.7*	0.7	0.1	43.6*	0.5*	243	30.4
RBL-II	7.0	7.0	0.8*	1.3*	0.7	0.3	55.0*	3.7	268	22.8
RBM-II	9.0	5.4*	1.2	1.9*	0.6	0.2	49.1*	1.5*	273	30.8
RBH-II	12.2*	4.5*	1.6	2.3*	0.7	0.2	49.8*	3.5	224	28.0
RCL-II	10.4*	7.4	1.3	2.9*	0.5	0.1	68.7*	1.5*	317	30.0
RCM-II	8.3	4.9*	1.2	9.7*	0.7	0.1	61.9*	2.2*	265	27.0
RCH-II	6.8	2.7*	0.9	2.6*	0.6	0.2	67.5*	2.6*	263	26.3
RCH-RS-II	5.3*	5.6*	1.0	5.3*	0.8	0.2	52.2*	2.0*	163	23.5
RCH-RC-II	5.6*	6.3	1.3	0.9*	0.7	0.2	43.0*	2.8*	300	26.7
RA4-II	8.5	8.2	1.0	0.9*	0.6	0.3	44.5*	2.4*	249	28.6
Арабиногалактан										
R-I (контроль)	32.9	11.5	1.4	3.4	4.4	1.0	9.2	10.1	99	12.7
RA-I	36.5	7.2*	0.9	1.9*	2.8	0.5	8.7	7.2*	н.о.	н.о.
RBL-I	30.9	7.1*	0.4*	1.2*	2.8	0.3*	9.3	5.9*	106	22.7
RBM-I	33.5	4.6*	0.5*	4.8	3.7	0.3*	8.1*	3.2*	96	19.1
RBH-I	35.1	3.2*	0.4*	1.3*	2.1*	0.2*	8.5	5.1*	135	16.6
RCL-I	35.3	5.2*	0.3*	1.4*	1.7*	0.2*	9.5	8.2	н.о.	н.о.
RCM-I	36.3	4.7*	0.4*	2.0*	2.3*	0.5*	9.1	8.9	98	17.8
RCH-I	35.3	5.0*	0.5*	1.2*	2.3*	0.2*	7.0*	5.2*	91	16.6
RCH-RS-I	14.5*	14.4*	1.9	2.9	1.1*	0.5	8.6	28.9*	н.о.	н.о.
RCH-RC-I	35.9	6.8*	1.2	2.4	1.9*	0.6	8.1*	3.2*	н.о.	н.о.
RA4-I	32.1	3.7*	0.2*	2.6*	1.7*	0.5	7.3*	6.1*	120	20.0

* Различия достоверны при $p < 0.05$. I – фракции АГ, II – фракции пектина, н.о. – не определено.

(M_n) всех пектинов уменьшалась по сравнению с контролем.

Таким образом, содержание остатков арабинозы и галактозы изменялось под действием генов *rolB* и *rolC*, тогда как в *rolA* трансгене и линии, трансформированной диким штаммом *A. rhizogenes*, таких изменений не было обнаружено. С увеличением уровня экспрессии генов *rolB* и *rolC* происходило более существенное снижение содержания остатков арабинозы в пектине. Кроме того, с увеличением уровня экспрессии гена *rolB* наблюдалось увеличение количества остатков галактозы в пектине марены. Содержание остатков галактуронової кислоты изменялось в зависимости от типа гена следующим образом: снижение количества остатков увеличивалось в ряду от *rolC* к *rolB* и *rolA* трансгенов. Совместная экспрессия генов *rol* в культуре RA4 приводила к снижению количества остатков галактуронової кислоты до уровня *rolA*-трансгенной культуры. Данные сви-

детельствуют о том, что под действием генов *rol* происходило снижение содержания 1,4- α -D-галактуронана в пектиновой макромолекуле. Снижение M_w пектина при высоком уровне экспрессии гена *rolB* указывало на деполимеризацию пектина.

В моносахаридном составе АГ из трансгенных и нетрансгенных каллусов марены доминировали остатки галактозы (14.5–36.5%), арабинозы (3.2–14.4%) и галактуронової кислоты (7–9%) (табл. 2). Соотношение арабиноза/галактоза варьировало от 1 : 1 до 1.0 : 10.9. Остатки ксилозы, глюкозы, рамнозы и маннозы присутствовали в меньшем количестве. В АГ в результате трансформации клеток генами *rolA*, *rolB* и *rolC* наблюдали снижение содержания остатков арабинозы в 1.6, 1.6–3.8 и 2.2–2.5 раза соответственно. В культуре, трансформированной диким штаммом *A. rhizogenes*, отмечено снижение содержания остатков арабинозы в 3.1 раза. С увеличением уровня экспрессии гена *rolB*

Таблица 3. Активность ферментов (ед./мг белка) в клеточных культурах *R. cordifolia*, трансформированных генами *rol*

Линия	β -галактозидаза	α -L-арабинофуранозидаса	Полигалактуроназа	Пектинэстераза
R (контроль)	37.8 \pm 6.6	0	6.6 \pm 0.2	0.8 \pm 0.3
RA	55.7 \pm 7.8*	57.3 \pm 4.9	1.0 \pm 0.2*	2.2 \pm 0.6*
RBL	26.4 \pm 5.6	0	3.4 \pm 0.6*	1.6 \pm 0.3*
RBM	46.1 \pm 8.6	45.8 \pm 1.0	0.9 \pm 0.2*	2.9 \pm 0.7*
RВН	23.8 \pm 0.9*	23.6 \pm 1.2	4.4 \pm 1.1*	1.4 \pm 0.4
RCL	21.9 \pm 2.7*	24.0 \pm 1.0	2.9 \pm 0.4*	1.1 \pm 0.3
RCM	51.3 \pm 14.0	65.6 \pm 21.9	4.9 \pm 0.4*	3.3 \pm 0.8*
RCH	37.9 \pm 7.6	43.7 \pm 16.2	1.4 \pm 0.1*	1.8 \pm 0.3*
RCH-RS	40.0 \pm 1.6	36.0 \pm 7.1	3.2 \pm 0.6*	1.9 \pm 0.2*
RA4	32.6 \pm 7.5	44.2 \pm 11.2	0*	0.8 \pm 0.2

* Различия достоверны при $p < 0.05$.

наблюдали более существенное снижение содержания остатков арабинозы в АГ. В корнеобразующей линии RCH-RS происходило увеличение содержания остатков галактозы в 1.3 раза и снижение остатков галактозы в 2.3 раза. В корнеобразующей линии RCH-RC наблюдали снижение содержания остатков арабинозы в 1.7 раза. Количество остатков галактуроновой кислоты уменьшалось в линиях RA4, RBM, RCH и RCH-RC. Почти для всех линий отмечено снижение содержания белка, а также остатков глюкозы, ксилозы и маннозы.

При трансформации клеток диким штаммом *A. rhizogenes* M_w АГ увеличивалась в 1.2 раза (табл. 2). В *rolB* трансгенах с высокой экспрессией M_w увеличивалась в 1.4 раза, в *rolC* трансгенах также с высокой экспрессией этот показатель уменьшался в 1.1 раза. M_n всех АГ увеличивалась по сравнению с контролем, при этом полисахариды характеризовались высокой полидисперсностью.

Таким образом, независимо от типа гена содержание остатков арабинозы в АГ снижалось и кроме того изменялось в зависимости от уровня экспрессии гена *rolB*.

Активность гликаназ в клетках, трансформированных генами *rol*. Показано, что активность β -галактозидазы в каллусных культурах RBH и RCL снижалась по сравнению с контролем (линия R) в 1.6 и 1.7 раза соответственно, тогда как в линии RA увеличивалась в 1.5 раза (табл. 3). Активность α -L-арабинофуранозидазы в трансгенах возрастала, достигая наибольших значений в линиях со средней экспрессией (RBM и RCM) и в линии RA. Активность полигалактуроназы в трансгенных каллусах снижалась в 1.4–7.2 раза. В результате трансформации клеток марены генами *rolA*, *rolB* и *rolC* наблюдали увеличение активности пектинэстеразы в 2.1–4.3 раза в линиях RA, RBL, RBM, RCM, RCH и RCH-RS. При этом наиболь-

шее увеличение активности наблюдали у линий со средней экспрессией (RBM и RCM).

Ранее было показано, что трансформация геном *rolC* значительно увеличивала активность некоторых карбогидраз и продуцирование их молекулярных форм [14]. В частности, было установлено, что в культурах клеток женьшеня *Panax ginseng*, трансформированных геном *rolC*, происходило увеличение активности α -, β -D-галактозидазы [14] и 1,3- β -D-глюканазы [15]. Однако в трансгенном каллусе марены активность β -галактозидазы увеличивалась только при трансформации геном *rolA*, и снижалась при трансформации генами *rolB* и *rolC*, что, вероятно, связано с использованием в качестве модели каллусных клеток другого вида растения. Кроме того, для трансгенных культур марены выявлено увеличение активности α -L-арабинофуранозидазы и пектинэстеразы.

Данные свидетельствуют о том, что гены *rol* участвуют в регуляции активности гликаназ и эстераз, которые оказывают гидролитическое действие на полисахариды растительных клеток, тем самым, модифицируя их структуру, в частности, строение боковых цепей пектина и АГ. Снижение содержания остатков арабинозы в пектине и АГ, вероятно, связано с ростом активности α -L-арабинофуранозидазы в трансгенных каллусах марены. Увеличение содержания остатков галактозы в пектинах ряда трансгенных линий марены (RBH и RCL) обусловлено снижением активности β -галактозидазы в них. Уменьшение содержания галактуроновой кислоты в пектинах и ряда образцов АГ, скорее всего, не связаны со снижающейся активностью полигалактуроназы в клетках. При трансформации генами *rol* в ряде случаев не наблюдалось зависимости содержания остатков арабинозы, галактозы и галактуроновой кислоты в полисахаридах от активности гликаназ в клетках, что может быть связано с несовпадением наблюдаемого *in vivo* эффекта и выявляемой *in vitro*

активности. Возможно, в условиях *in vitro* отсутствуют некие существенные кофакторы или существуют “запасные формы” ферментов [30]. Кроме того, ранее было показано, что изменение активности карбогидраз в клетках, трансформированных генами *rolC*, является, скорее всего, результатом экспрессии новых изоформ ферментов, а не индукцией существующих ферментов [14].

С появлением дифференциации клеток (корнеобразование) содержание остатков галактозы в пектине и АГ снижалось без изменения активности β -галактозидазы в клетках. Данные свидетельствуют о том, что степень дифференциации клеток имеет значение для уровня галактозы в полисахаридах, но при этом изменение активности β -галактозидазы не может быть объяснено изменением степени дифференциации клеток.

Хотя механизм действия генов *rol* в трансгенных растениях еще не ясен, но некоторые фенотипические изменения могут указывать на биохимический эффект генов на эндогенные гормоны через изменение размера пула ростовых промоторов или ингибиторов (гормональный баланс), или чувствительности к свободным активным гормонам [13]. Данные современных исследований свидетельствуют, что гены *rolC* снижают уровень индолилуксусной кислоты в клетках и ингибируют рост растений [13].

Изменение содержания остатков арабинозы и галактозы в пектине и АГ трансгенов марены, возможно, связано с увеличением чувствительности к ауксину, который, как известно, содействует переносу арабинозы из УДФ-арабинозы в АГ и пектин [31] и участвует в контроле потока УДФ-галактозы в полимеры клеточной стенки [32].

Таким образом, показано, что содержание и моносакхаридный состав полисахаридов в культурах клеток, трансформированных агробактериальными генами *rol*, изменялись в зависимости от типа гена и уровня экспрессии трансгена. Впервые показана связь между изменением активности гликаназ в клетках, трансформированных генами *rol*, и моносакхаридным составом синтезируемых полисахаридов. Механизм действия генов *rol* может заключаться как в регуляции активности гликаназ и эстераз, которые модифицируют структуру полисахаридов, так и в регуляторном эффекте генов на эндогенные гормоны, которые стимулируют перенос УДФ-сахаров в полимеры клеточной стенки. Трансформация генами *rol* оказывает неоднозначное влияние на активность гликаназ и на структуру пектиновых веществ и требуется дальнейшее исследование механизма их действия.

Применение агробактериальной трансформации генами *rol*, по-видимому, позволит изменять структуру полисахаридов, что открывает возмож-

ности получения полисахаридов с измененным строением и свойствами.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований УрО РАН, проект № 12-С-4-1006; программы Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”; гранта Президента РФ МК-3459.2011.4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Оводов Ю.С., Головченко В.В., Гюнтер Е.А., Попов С.В. Пектиновые вещества растений европейского Севера России / Ред. А.В. Кучин. Екатеринбург: УрО РАН, 2009. 112 с.
2. Mohnen D. // *Cur. Opin. Plant Biol.* 2008. V. 11. P. 266–277.
3. Wagner H., Stuppner H., Schafer W., Zenk M. // *Phytochemistry*. 1988. V. 27. P. 119–126.
4. Roesler J., Emmendorffer A., Steinmuller C., Luettig B., Wagner H., Lohmann-Matthes M.-L. // *Int. J. Immunopharmacol.* 1991. V. 13. P. 931–941.
5. Оводов Ю.С. // *Биоорганическая химия*. 1998. Т. 24. С. 483–501.
6. Оводов Ю.С. // *Биоорганическая химия*. 2009. Т. 35. С. 293–310.
7. Sorensen S.O., Pauly M., Bush M., Skjtt M., McCann M.C., Borkhardt B., Ulvskov P. // *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2000. V. 97. P. 7639–7644.
8. Willats W.G.T., McCartney L., Mackie W., Knox J.P. // *Plant Molecul. Biol.* 2001. V. 47. P. 9–27.
9. Oomen R.J.F.J., Doeswijk C.H.L., Bush M.S., Vincken J.-P., Borkhardt B., Broek L.A.M., Corsar J., Ulvskov P., Voragen A.G.J., McCann M.C., Visser R.G.F. // *Plant J.* 2002. V. 30. P. 403–413.
10. Fry S.C. // *New Phytologist*. 2004. V. 161. P. 641–675.
11. Bulgakov V.P., Khodakovskaya M.V., Labetskaya N.V., Chernoded G.K., Zhuravlev Yu.N. // *Phytochemistry*. 1998. V. 49. № 7. P. 1929–1934.
12. Bulgakov V.P. // *Biotechnol. Adv.* 2008. V. 26. P. 318–324.
13. Maurel C., Brevet J., Barbier-Brygoo H., Guern J., Tempe J. // *Mol. Gen. Genet.* 1990. V. 223. P. 58–64.
14. Bettini P., Baraldi R., Rapparini F., Melani L., Mauro M.L., Bindi D., Buiatti M. // *Scientia Horticulturae*. 2010. V. 123. P. 323–328.
15. Bulgakov V.P., Kusaykin M., Tchernoded G.K., Zvyagintseva T.N., Zhuravlev Yu.N. // *Fitoterapia*. 2002. V. 73. P. 638–643.
16. Kiselev K.V., Kusaykin M.I., Dubrovina A.S., Bezverbnny D.A., Zvyagintseva T.N., Bulgakov V.P. // *Phytochemistry*. 2006. V. 67. P. 2225–2231.
17. Bulgakov V.P., Tchernoded G.K., Mischenko N.P., Khodakovskaya M.V., Glazunov V.P., Zvereva E.V., Fedoreyev S.A., Zhuravlev Y.N. // *J. Biotechnol.* 2002. V. 97. P. 213–221.
18. Spena A., Schmuelling T., Koncz C., Schell J.S. // *EMBO J.* 1987. V. 6. P. 3891–3899.
19. Bulgakov V.P., Shkryl Y.N., Veremeichik G.N. // *Methods Mol. Biol.* 2010. V. 643. P. 229–242.

20. Slightom J., Durand-Tardif M., Joanin L., Tepfer D. // J. Biol. Chem. 1986. V. 261. P. 108–121.
21. Shkryl Y.N., Veremeichik G.N., Bulgakov V.P., Tchernoded G.K., Mischenko N.P., Fedoreyev S.A., Zhuravlev Y.N. // Biotechnol. Bioeng. 2008. V. 100. P. 118–125.
22. Günter E.A., Ovodov Yu.S. // Phytochemistry. 2002. V. 59. P. 703–708.
23. Usov A.I., Bilan M.I., Klochkova N.G. // Bot. Marina. 1995. V. 38. P. 43–51.
24. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. // Anal. Chem. 1956. V. 28. P. 350–356.
25. Knutsen S.H., Murano E., Amato M., Toffanin R., Rizzo R., Paoletti S. // J. Appl. Phycol. 1995. V. 7. P. 565–576.
26. York W.S., Darvill A.G., McNeil M., Stevenson T.T., Albersheim P. // Methods Enzymol. 1985. V. 118. P. 3–40.
27. Nelson N. // J. Biol. Chem. 1944. V. 153. P. 37–38.
28. Грачёва И.М., Грачёв Ю.П., Мосичев М.С., Борисенко Е.Г., Богатков С.В., Гернет М.В. Лабораторный практикум по технологии ферментных препаратов. М.: Легкая и пищевая пр-сть, 1982. С. 106–108.
29. Полюгалина Г.В., Череди́ченко В.С., Римарева Л.В. Определение активности ферментов. Справочник. М: ДеЛи принт, 2003. С. 138–140.
30. Горшкова Т.А. Растительная клеточная стенка как динамичная система. М.: Наука, 2007. 429 с.
31. Rubery P.H., Northcote D.H. // Biochim. Biophys. Acta. 1970. V. 222. P. 95–108.
32. Seifert G.J., Barber C., Wells B., Keith R. // Plant Cell. 2004. V. 16. № 3. P. 723–730.

Effect of the *rol* Genes from *Agrobacterium rhizogenes* on the Content and Structure of Pectic Substances and Glycanase Activity in *Rubia cordifolia* Transgenic Cell Cultures

E. A. Gunter^a, O. V. Popeyko^a, Yu. N. Shkryl^b, G. N. Veremeichik^b,
V. P. Bulgakov^{b, c}, and Yu. S. Ovodov^a

^a Institute of Physiology, Komi Science Centre, Urals Branch, Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, 167982 Russia
e-mail: gunter@physiol.komisc.ru

^b Institute of Biology and Soil Science, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, 690022 Vladivostok

^c Far Eastern Federal University, 690950 Vladivostok

Received October 8, 2012

Abstract—The expression of the *rolB* gene was found to increase the pectic yield in *Rubia cordifolia* cells, while the *rolC* gene inhibited the pectin production, which correlated with its expression level. The expression of the *rolA*, *rolB*, and *rolC* genes led to an increase in the content of arabinogalactan (AG) in cells. The increase in the expression of the *rolB* and *rolC* genes resulted in a more significant reduction in the content of arabinose residues in pectin, which was accompanied by an increased activity of α -L-arabinofuranosidase in cells. Moreover, the amount of galactose residues in pectin increased with the enhancement of the *rolB* expression due to a decrease in the activity of β -galactosidase in cells. The content of galacturonic acid residues in pectin from transgenic cultures increased in the following order: *rolC* < *rolB* < *rolA*. The amount of arabinose residues in AG decreased independently of the gene type. The amount of arabinose residues in AG was found to be considerably reduced when the *rolB* expression level was increased.