

Оригинальные работы

Н.А. МАТВЕЕВА, В.П. МОМОТ,
А.М. ШАХОВСКИЙ, Н.В. КУЧУК

Институт клеточной биологии и генетической инженерии
НАН Украины, Киев

РЕГЕНЕРАЦИЯ ЦИБРИДНЫХ РАСТЕНИЙ *LYCOPERSICON* *PERUVIANUM* × (*SOLANUM RICKII*) С ТРАНСФОРМИРОВАННЫМИ ХЛОРОПЛАСТАМИ



*В результате эксперимента по γ-слиянию мезофильных протопластов хлорофиллдефектного мутанта *Lycopersicon peruvianum* и транспластомного растения *Solanum rickii* на селективной среде, содержащей антибиотики спектиномицин и стрептомицин, были получены гибридные растения, имеющие трансформированные хлоропласты *S. rickii* и ядерный геном *L. peruvianum*, что подтверждено результатами ПЦР-анализов.*

© Н.А. МАТВЕЕВА, В.П. МОМОТ, А.М. ШАХОВСКИЙ,
Н.В. КУЧУК, 2005

ISSN 0564–3783. Цитология и генетика. 2005. № 6

Введение. В настоящее время генетическая инженерия высших растений является одним из наиболее эффективных методов для получения растений с новыми свойствами. Успехи в разработке методов «прямой» трансформации позволили осуществлять перенос генетической информации не только в ядро, но и в хлоропласты растительных клеток. По сравнению с ядерной хлоропластная трансформация имеет ряд несомненных преимуществ, что связано с особенностями развития растений. Так, экспрессия гена в хлоропластах дает возможность накопления существенно большего количества белкового продукта по сравнению с переносом того же гена в ядерную ДНК [1]. Материнское наследование цитоплазматических генов у большинства сельскохозяйственных культур затрудняет перенос с пыльцой чужеродных генов и таким образом предотвращает их неконтролируемое распространение, а также способствует экологической безопасности [2]. Трансформация хлоропластной ДНК в отличие от ядерной осуществляется по способу гомологичной рекомбинации. Строгая специфичность по месту встраивания переносимого гена дает возможность избежать влияния так называемого неконтролируемого эффекта положения или «молчания» перенесенных генов. Полистронный тип экспрессии при трансформации хлоропластов позволяет вводить в растительную клетку несколько генов одновременно.

Одним из методов «прямого» переноса генов в растительные клетки является метод биолиственной трансформации. Его суть заключается в обстреливании растительных клеток микрочастицами вольфрама или золота, на которые нанесены молекулы ДНК [3, 4]. Метод биолиственной трансформации позволил достичь значительных успехов в трансформации ядерного генома растений. Таким методом были получены трансгенные растения многих видов (например, табака, риса, кукурузы, сои и др.). Однако получение транспластомных растений в отличие от ядерных трансформантов все еще остается достаточно сложной задачей. Это связано с наличием большого количества хлоропластов в растительных клетках. Устойчивая трансформация возможна лишь в том случае, когда все копии хлоропластной ДНК имеют встроенный ген, что может быть достигнуто путем длительного отбора на селективных сре-

дах. На сегодняшний день имеется лишь несколько сообщений о получении растений с трансформированными пластидами *Nicotiana tabacum* [5], *Arabidopsis thaliana* [6], *Solanum tuberosum* [7], *Lycopersicon esculentum* [8], *Lesquerella fendleri* [9], *Petunia hybrida* [10]. Нами были получены трансформированные растения *Solanum rickii*, имеющие в хлоропластах ген устойчивости к стрептомицину и спектиномицину [11]. Таким образом, круг видов, у которых получены растения с трансформированными хлоропластами, весьма ограничен. Одной из возможностей решения проблемы получения транспластомных растений может быть использование метода соматической гибридизации. Этот метод позволяет получать растения с новыми признаками, причем сконструированные соматические гибриды могут иметь наборы генов, которые не удастся получить с помощью полового скрещивания. При использовании в качестве реципиента чужеродных генов мезофильных протопластов пластомных хлорофиллдефектных мутантов, а в качестве донора как облученных, так и необлученных протопластов (облучение приводит к инактивации ядра и нарушению процесса клеточного деления, γ -слияние) можно осуществить перенос хлоропластов из клеток доноров и вести селекцию по признаку выявления растущих зеленых колоний. Слияние протопластов достаточно легко трансформируемых растений, которые имеют в хлоропластной ДНК встроенный чужеродный ген, и протопластов культурных растений, трансформация которых затруднена, позволяет решить проблему пластомной трансформации и создавать ценные сельскохозяйственные растения с необходимыми признаками.

Целью нашей работы было получение новых трансформированных растений путем слияния мезофильных протопластов хлорофиллдефектного мутанта *L. peruvianum* и транспластомного растения *S. rickii*.

Материалы и методы. Растительный материал. В эксперименте были использованы полученные нами трансформированные растения *Solanum rickii*, имеющие в хлоропластах ген *aadA* (устойчивость к стрептомицину и спектиномицину), и пластомный хлорофиллдефектный мутант Lp3-alb *Lycopersicon peruvianum*

var. *dentatum* Dup. линии 3767, полученный в Институте клеточной биологии и генетической инженерии [12].

Растения выращивали в асептических условиях на среде MS [13] без гормонов при 16-часовом световом фотопериоде, температуре 22–24 °С. Размножали растения черенкованием на той же среде.

Выделение и слияние протопластов, культивирование продуктов слияния. Мезофильные протопласты выделяли по методике [14]. Слияние протопластов проводили по модифицированной методике [15]. Протопласты растений-доноров облучали γ -лучами в дозе 500 Гр (Co^{60}).

Культивирование продуктов слияния осуществляли в жидкой культуральной среде KM8p [16] с добавлением антибиотиков стрептомицина и спектиномицина по 200 мг/л каждого.

Селекцию гибридных колоний проводили на основе их способности к биосинтезу хлорофилла на среде, содержащей антибиотики.

Для индукции морфогенеза были использованы среды ST [17, 18] с гормонами 1 мг/л зеатина и 1 мг/л гибберелловой кислоты; PRM [19] с гормонами 2 мг/л бензиламинопурина и 0,2 мг/л индолилуксусной кислоты; измененная ТМ4 [20] (макросоли MS, 1 мг/л зеатина и 1 мг/л гибберелловой кислоты) в двух модификациях — с 30 и 2,5 г/л сахарозы. Регенеранты укореняли на безгормональной среде MS с антибиотиками.

Выделение и молекулярный анализ ДНК. Тотальную растительную ДНК для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) выделяли согласно протоколу [21]. Для подтверждения присутствия гена *aadA* использовали пару праймеров 5'-ATTTTGCCGGTACTGC GCTG-3' (1) и 5'-TGCTGGCCGTACATTTGT ACG-3' (2), специфичных к внутренней части гена *aadA*. Размер амплифицированного с помощью этих праймеров продукта составляет 523 п.н. Температура отжига — 65 °С, длительность реакции синтеза фрагмента — 1 мин при 72 °С.

Природу хлоропластной ДНК гибридных растений, полученных после слияния, изучали исследованием рестриктных спектров ПЦР-амплифицированного фрагмента хлоропластного генома. Анализировали участок,

включающий гены *rps7* и *trnV*, с использованием праймеров 5'-GGGAGTTACTCCACGTAT TGC-3', специфичного гену *rps7*, и 5'-CAGGC TCGAACTGATGACTTC-3', специфичного гену *trnV*. Амплифицированный фрагмент обрабатывали рестриктазой BglIII. Продукты реакции разделяли с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле.

При анализе ядерной ДНК сравнивали спектр фрагментов, амплифицирующихся с использованием двух 5'-TCCTCCTCCTCC TCC3' праймеров.

Результаты исследований и их обсуждение. В качестве донора трансформированных хлоропластов были использованы полученные нами с помощью метода биолиственной трансформации транспластомные растения *S. rickii*, имеющие в хлоропластном геноме гены устойчивости к стрептомицину и спектиномицину (рис. 1). Транспластомные растения длительно культивировались на среде, содержащей 200 мг/л стрептомицина и 100 мг/л спектиномицина, при этом стабильно сохраняли зеленую окраску.

Для того чтобы осуществить перенос трансформированных хлоропластов *S. rickii* и получить трансформированные цибриды *L. peruvianum* × (*S. rickii*), был использован метод γ -слияния с растениями пластомного хлорофиллдефектного мутанта Lp3-alb *Lycopersicon peruvianum* var. *dentatum* Dup. линии 3767, любезно предоставленного В.А. Рудасом. Такая схема слияния позволила вести эффективную селекцию для отбора цибридов по признаку роста зеленых колоний на среде, содержащей стрептомицин и спектиномицин. Одновременное введение антибиотиков должно предотвращать ошибочный отбор спонтанных мутантов.

Слияние облученных протопластов *S. rickii* и хлорофиллдефектного мутанта *L. peruvianum* проводили согласно методике Menczel et al. [15] с модификациями. Продукты слияния культивировали на среде KM8P, к которой спустя 3 нед были добавлены антибиотики стрептомицин и спектиномицин (по 200 мг/л каждого). Через 2 мес после слияния было отобрано около 200 микроколоний, имеющих слабую зеленую окраску. При дальнейшем культивировании на среде STA с антибиотика-

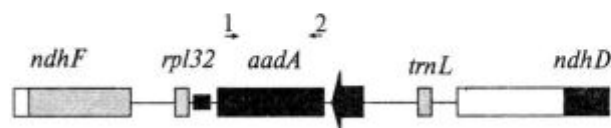


Рис. 1. Векторная конструкция, использованная для получения транспластомных растений *Solanum rickii*. Стрелками отмечено расположение праймеров 1 и 2

ми часть зеленых колоний погибла. Это может быть связано с несбалансированностью генома гибридных клеток или с влиянием облучения на хлоропластный геном, а также с недостаточным функционированием малого количества трансформированных пластид в гетеропластидной гибридной клетке и направленной сегрегацией пластид.

На среде STA с антибиотиками через 3 мес после слияния было отобрано 140 зеленых колоний. Для индукции регенерации использованы среды STC, PRM, TM4-30 (30 г/л сахарозы) и TM4-2,5 (2,5 г/л сахарозы). Эти среды выбраны исходя из того, что, как нами показано ранее, среда STC была подходящей для индукции регенерации растений *S. rickii* [11], на среде PRM также возможна регенерация *S. rickii* [22], а среда TM4 используется для регенерации растений рода *Lycopersicon* [23]. Применением этих сред создавались некоторые культурально-физиологические преимущества для роста клонов, имеющих ядерный материал *S. rickii* или *L. peruvianum*. При культивировании микроколоний на среде PRM наблюдался значительный рост каллусной ткани, но регенерация отсутствовала. Выращивание зеленых колоний на среде STC приводило к их гибели. Таким образом, можно было предположить, что эти клоны являлись асимметричными гибридами дикого типа либо не имели ядерного материала *S. rickii*. Культивирование на среде TM4-30 (30 г/л сахарозы) колоний, полученных после слияния, позволило получить растения-регенеранты у 10 % клонов через 8 нед. При использовании среды TM4-2,5 (2,5 г/л сахарозы) индекс регенерации оказался ниже (5 %), однако при последующем увеличении количества сахарозы до 30 г/л через 2 нед у 100 % клонов наблюдали регенерацию растений (рис. 2). Таким образом, последовательное культивирование гиб-



Рис. 2. Регенерация гибридных растений при последовательном культивировании на средах ТМ4-2,5 и ТМ4-30



Рис. 3. Хлорофиллдефектный мутант *L. peruvianum* (а), зеленое трансформированное растение *S. rickii* (б) и гибридное растение *L. peruvianum* × (*S. rickii*) (в)

ридных клонов на средах ТМ4-2,5 и ТМ4-30, а также увеличение количества сахарозы позволило значительно повысить эффективность регенерации гибридных растений. Все растения, полученные из зеленых клонов, имели

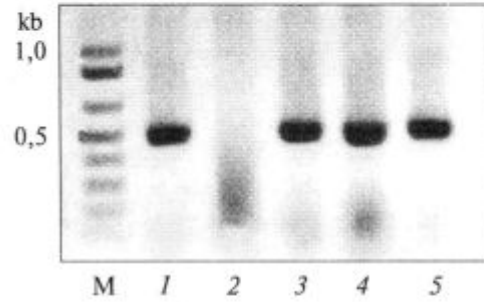


Рис. 4. Электрофореграмма результатов ПЦР-анализа суммарной ДНК гибридных растений (праймеры 1 и 2) на присутствие гена *aadA*: М — маркер; 1 — плазмидная ДНК; 2 — нетрансформированное растение; 3–5 — гибридные растения

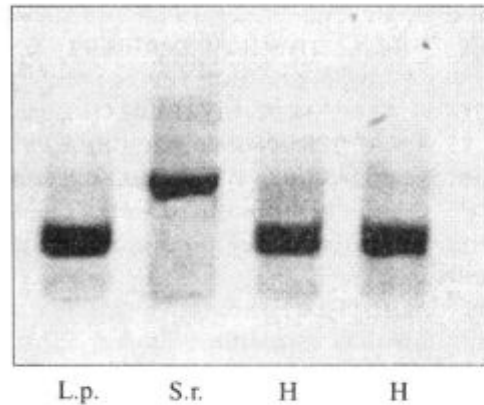


Рис. 5. ПЦР-анализ ядерной ДНК гибридных растений. Сравнивали спектр фрагментов, амплифицирующихся с использованием двух 5'-TCCTCCTCCTCCTCC-3' праймеров: L.p. — *L. peruvianum*; S.r. — *S. rickii*; Н — гибриды

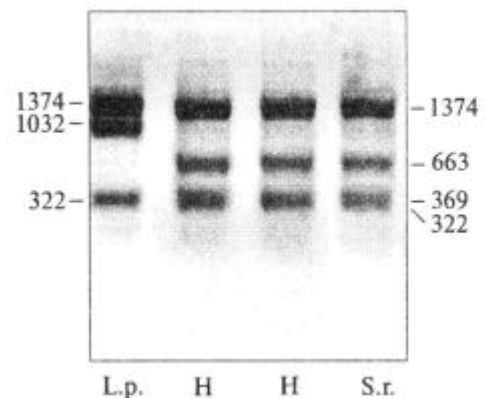


Рис. 6. Молекулярный анализ хлоропластной ДНК гибридных растений. Амплифицированные фрагменты *rps 7-trnV* хлоропластной ДНК обрабатывали рестриктазой BglII: L.p. — *L. peruvianum*; S.r. — *S. rickii*; Н — гибриды

зеленую окраску при росте на среде с 100 мг/л спектиномицина и 200 мг/л стрептомицина (рис. 3). Поэтому использованную для селекции и регенерации схему с одновременным введением в культуральную среду двух антибиотиков на ранней стадии культивирования можно считать эффективной для получения гибридных растений, имеющих трансформированные пластиды с геном устойчивости к стрептомицину и спектиномицину.

Получено более 100 растений, которые регенерировали из протоклонов. Проведенный ПЦР-анализ суммарной ДНК гибридных растений свидетельствует о присутствии гена *aadA* (рис. 4). При исследовании ядерного генома гибридов с помощью ПЦР-анализа (рис. 5) было показано сходство ядерной ДНК всех проанализированных гибридных растений с ядерной ДНК *L. peruvianum*. Молекулярный анализ хлоропластной ДНК этих растений подтвердил наличие у них пластома *S. rickii* (рис. 6).

Таким образом, проведенные анализы позволяют считать растения, полученные в результате слияния мезофильных протопластов хлорофиллдефектного мутанта *L. peruvianum* и транспластомного *S. rickii*, цитоплазматическими гибридами, имеющими ядро *L. peruvianum* и хлоропласты трансформированного *S. rickii*.

В результате проведенных исследований была показана принципиальная возможность переноса трансформированных хлоропластов из *S. rickii* (дикого вида рода *Solanum*) в *L. peruvianum*, который по филогенетическому положению близок к культурным видам. Это позволяет предположить, что такая схема может быть использована и для получения транспластомных растений культурных сортов томатов и картофеля.

В эксперименте в качестве донора трансформированных хлоропластов были использованы полученные нами трансформированные растения *S. rickii*. Конструкция, использованная нами при трансформации хлоропластов *S. rickii*, имела последовательности ДНК пластома табака. Поэтому можно было ожидать неполной гомологии этого участка хлоропластной ДНК для *S. rickii*. Такая неполная гомология участков хлоропластной ДНК конструкции и хлоропластной ДНК *S. rickii* могла приводить к более сложной схеме встраивания нашего век-

тора в геном хлДНК. Это предположение нами было ранее доказано [11] с использованием метода двухступенчатого ПЦР-анализа. Дополнительным доказательством встраивания использованной конструкции именно в хлоропластный геном должно было явиться получение гибридных растений при слиянии мезофильных протопластов трансформированных растений *S. rickii* с инактивированным γ -облучением ядром с мезофильными протопластами хлорофиллдефектных растений. Поскольку отбор полученных гибридных растений проводился по двум признакам — позеленению и росту на селективной среде, появление зеленых растений свидетельствовало о наличии в гибридах хлоропластов *S. rickii*, а нормальный рост на селективной среде с антибиотиками стал возможен только при наличии в геноме хлоропластов использованной для трансформации конструкции. Регенерация в нашем эксперименте на селективной среде зеленых растений, имеющих ядерный геном *L. peruvianum* и хлоропласты *S. rickii*, указывает на хлоропластную локализацию использованного для трансформации *S. rickii* гена. Таким образом, эти данные полностью подтверждают сделанный нами ранее вывод о хлоропластной локализации гена *aadA* в использованных в нашем эксперименте транспластомных растениях *S. rickii*.

SUMMARY. The hybrid plants with transformed plastids were regenerated after PEG fusion of chlorophyll-deficient *Lycopersicon peruvianum* leaf mesophyll protoplasts and leaf mesophyll protoplasts of *Solanum rickii*, which were previously genetically transformed and as the result were resistant to streptomycine and spectinomycine. The hybrid callus selection was based on the inability of the *Lycopersicon peruvianum* minicalli to have the green coloration and on the inability of gamma-preirradiated *Solanum rickii* protoplasts to divide. The hybrids were identified on the base of PCR analyses of nuclear and plastid DNA.

РЕЗЮМЕ. В результаті експерименту по γ -злиттю мезофільних протопластів хлорофільдефектного мутанту *Lycopersicon peruvianum* та транспластомної рослини *Solanum rickii* на селективному середовищі, що містило антибіотики спектиноміцин та стрептоміцин, було отримано гібридні рослини, які мають трансформовані хлоропласти *S. rickii* та ядерний геном *L. peruvianum*. Ці дані було підтверджено результатами ПЦР-аналізів.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Staub J.M., Maliga P. Accumulation of D1 polypeptide in tobacco plastids is regulated via the untranslated region of the psbA mRNA // EMBO J. — 1992. — 12. — P. 601—606.
2. Daniell H., Datta R., Varma S., Gray S., Lee S.B. Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome // Nature Biotechnol. — 1998. — 16. — P. 345—348.
3. Klein T.M., Wolf E.D., Wu R., Sanford J.C. High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells // Nature. — 1987. — 327. — P. 70—73.
4. Vain P., Keen N., Murillo J., Rathus C., Nemes C., Finer J. Development of the particle inflow gun // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. — 1992. — 33. — P. 237—246.
5. Svab Z., Hajdukiewicz P., Maliga P. Stable transformation of plastids in higher plants // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1990. — 87. — P. 8526—8530.
6. Sikdar S.R., Serino G., Chaudhuri S., Maliga P. Plastid transformation in *Arabidopsis thaliana* // Plant Cell Rep. — 1998. — 18. — P. 20—24.
7. Sidorov V.A., Kasten D., Pang S.Z., Hajdukiewicz P.T.J., Staub J.M., Nehra N.S. Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker // Plant J. — 1999. — 19 (2). — P. 209—216.
8. Ruf S., Hermann M., Berger I.J., Carrer H., Bock R. Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit // Nature. Biotechnol. — 2001. — 19 (9). — P. 870—875.
9. Skarjinskaia M., Svab Z., Maliga P. Plastid transformation of *L. fendleri*, an oilseed Brassicaceae // Transgenic Res. — 2003. — 12. — P. 115—122.
10. Zubko M., Zubko E., Van Zuilen K., Meyer P., Duy A. Stable transformation of petunia plastids // Transgenic Res. — 2004. — 13. — P. 523—530.
11. Матвеева Н.А., Шаховский А.М., Кучук Н.В. Генетическая трансформация хлоропластной ДНК *Solanum rickii* // Цитология и генетика — 2005. — 39, № 5. — С. 3—8.
12. Рудас В.А. Получение пластомных хлорофиллдефектных мутантов // Цитология и генетика. — 1994. — 28, № 2. — С. 42—48.
13. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture // Phys. Plant. — 1962. — 15. — P. 473—497.
14. Сидоров В.А., Пивень Н.М., Глеба Ю.Ю., Сытник К.М. Соматическая гибридизация пасленовых. — Киев: Наук. думка, 1985.
15. Menczel L., Nagy F., Kiss Z., Maliga P. Streptomycin resistant and sensitive somatic hybrids of *Nicotiana tabacum*+ *Nicotiana knightiana*: Correlation of resistance to *Nicotiana tabacum* plastids // Theor. Appl. Genet. — 1981. — 59. — P. 191—195.
16. Kao K.N., Michayluk M.R. Nutrient requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media // Planta. — 1975. — 126. — P. 105—110.
17. Shepard J.F., Totten R.E. Mesophyll cell protoplasts of potato // Plant Physiol. — 1977. — 60. — P. 313—316.
18. Shepard J.F. Abscisic acid-enhanced shoot initiation in protoplast-derived calli of potato // Plant Sci. Lett. — 1980. — 18. — P. 334.
19. Ratushnyak Y.I., Piven N.M., Rudas V.A. Protoplast culture and plant regeneration in *Lycium barbarum* L. // Plant Cell Tiss. Org. Cult. — 1989. — 17. — P. 183—190.
20. Shahin E.A. Totipotency of tomato protoplasts // Theor. Appl. Genet. — 1985. — 69. — P. 235—240.
21. Murray M.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA // Nucl. Acids Res. — 1980. — 8. — P. 4321—4325.
22. Kochevenko A.S., Ratushnyak Y.I., Gleba Y.Y. Protoplast culture and somaclonal variability of species of series *Juglandifolia* // Plant Cell Tiss. Org. Cult. — 1996. — 44. — P. 103—110.
23. Ratushnyak Y.I., Latypov S.A., Samoylov A.M., Piven N.M., Gleba Y.Y. Introgressive hybridization of tomatoes by «gamma-fusion» of *Lycopersicon esculentum* Mill. and *Lycopersicon peruvianum* var *dentatum* Dun. Protoplasts // Plant Sci. — 1991. — 73. — P. 65—78.

Поступила 11.05.05