



УДК 577.21

В. А. Рудас, А. В. Завгородняя, Н. Н. Череп, Ю. Ю. Глеба

## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ МЕТОДОМ ЛИСТОВЫХ ДИСКОВ ДИКИХ ВИДОВ SOLANUM И LYCOPERSICON

Проводили исследования по генетической трансформации диких видов родов *Solanum* и *Lycopersicon* методом листовых дисков. Получены устойчивые к канамицину растения *L. peruvianum* var. *humifusum*, *L. peruvianum* Mill., *L. pennellii*, *S. aculeatissimum*, *S. sisymbriifolium*, *S. gilo*, *S. mammosum*. У видов *L. peruvianum* var. *dentatum*, *S. rickii*, *S. lycopersicoides*, *S. nigrum*, кроме растений, устойчивых к канамицину, выявлены растения, резистентные к гигромицину, а также к обоим антибиотикам. Результаты анализа активности неомитинфосфотрансферазы (NPTII) подтверждают экспрессию этого гена в трансгенных растениях.

**Введение.** Эффективная селекция соматических гибридов в значительной степени зависит от наличия генетических маркеров у исходных родителевских форм. В последние годы в работах по соматической гибридизации все шире используются трансгенные растения, устойчивые к конкретным селективным агентам, в частности к антибиотикам. Процедура генетической трансформации позволяет получать растения, резистентные к определенным антибиотикам, в  $10^2$ — $10^5$  эффективнее, чем стандартные методики мутагенной обработки.

В настоящее время все большее внимание уделяется работам по генетической трансформации растений диких видов *Solanum* и *Lycopersicon*. Получены трансгенные растения у ряда видов, являющихся донорами хозяйственно ценных признаков для томата, среди них устойчивые к канамицину растения *L. peruvianum* [1], *S. nigrum* [2].

Цель настоящей работы состояла в получении трансгенных растений, устойчивых к канамицину и гигромицину. Объектами исследования служили дикие виды родов *Solanum* и *Lycopersicon* — источники хозяйственно ценных признаков для культурного томата *L. esculentum* и баклажана *S. melongena*.

**Материалы и методы.** Растительный материал. Семена дикорастущих видов томатов *L. peruvianum* var. *dentatum* Dun. (линии 3767, 3772), *L. peruvianum* var. *humifusum* C. H. Mull., *L. peruvianum* Mill., *L. pennellii* Correll. любезно предоставлены нам А. А. Жученко и Н. Ф. Бочарниковой (Ин-т экол. генетики АН РМ, Кишинев, Молдова).

Семена *S. sisymbriifolium* (№ 4 каталога ВИРа), *S. gilo* Radoti (№ 84 каталога ВИРа), *S. aculeatissimum* (№ 53 каталога ВИРа) любезно предоставлены Т. А. Гавриленко (Всерос. ин-т растениеводства им. Н. И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия).

Семена *S. mammosum* L. собраны нами в Эквадоре.

Семена *S. rickii* Corr., *S. lycopersicoides* Dun. любезно предоставлены профессором Ч. Риком (Калифорн. ун-т, Дэвис, США).

Семена *Solanum nigrum* L. собраны нами на территории Смелянского района Черкасской области (Украина).

© В. А. Рудас, А. В. Завгородняя, Н. Н. Череп, Ю. Ю. Глеба, 1993

Хлорофиллдефектные мутанты *L. peruvianum* var. *dentatum* (линия 3767) и *S. nigrum* получены нами ранее [3].

Семена перечисленных видов стерилизовали последовательно в 70 %-м этаноле (1 мин), диоксиде (15—25 мин) и трижды отмывали стерильной дистиллированной водой. Далее высаживали на безгормональную питательную среду, содержащую вдвое разбавленные против исходной прописи макросоли Мурасиге и Скуга (МС) [4], микросоли МС, 100 мг/л мезоинозита, 1 мг/л В<sub>1</sub>, 10 мг/л Na-гуммата, 20 г/л са-



Рис. 1. Регенерация из листовых дисков на среде с канамицином трансгенных побегов хлорофиллдефектного мутанта *S. nigrum*. Диаметр чашки Петри 90 мм

Рис. 2. Регенерация из кусочков стеблей на среде с гигромицином трансгенных побегов *S. lycopersicoides*

харозы и 7 г/л агара. На этой же среде выращивали асептические растения всех диких видов. Растения выращивали при 16-ч фотопериоде, освещенности 1000—3000 лк и температуре 24—27 °С.

Бактериальные штаммы и плазмиды *Agrobacterium tumefaciens*. Штаммы *pGV<sub>11</sub>* и *pGV<sub>11-21</sub>*, несущие плазмиду *pGV2260*, производную октопиновой плазмиды *Ti*, у которой гены синтеза ауксинов и цитокининов замещены бактериальным геном устойчивости к канамицинсульфату и геном β-интерферона человека с сохранением нормальных функций других генов Т-ДНК. Первый штамм любезно предоставлен А. В. Вершининым, второй — М. И. Ривкиным (Ин-т цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск).

Штамм *pGS1166* несет плазмиду *pGV2260*, у которой гены синтеза ауксинов и цитокининов замещены бактериальным геном устойчивости к гигромицину. Штамм любезно предоставлен доктором Дж. Лемансом (Бельгия).

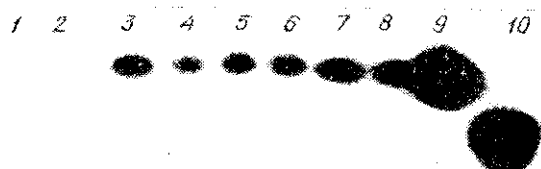
Штамм *pGV3850/pAP2034.355t1* несет плазмиду *pGV3850*, производную нопапиновой плазмиды *Ti*, у которой гены синтеза ауксинов и цитокининов замещены бактериальными генами устойчивости к канамицинсульфату и β-эндотоксина *Bacillus thuringiensis*. Штамм получен от Э. С. Пирузян (Ин-т молекуляр. генетики РАН, Москва).

Все бактериальные штаммы выращивали на среде LB с добавлением необходимых антибиотиков.

Генетическая трансформация видов родов *Solanum* и *Lycopersicon*, опосредованная *A. tumefaciens*. Кусочки листьев или стеблей без почек длиной 0,5—1 см помещали на поверхность агаризованной среды, содержащей соли МС, витамины Гамборга [5], 2,5 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП), 0,2 мг/л нидолил-3-уксусной кислоты (ИУК), 20 г/л сахарозы, 7 г/л агара, и оставляли на рассеянном свете. Через 2 дня кусочки растительных тканей переносили в чашку Петри и смачивали их почной культурой *A. tumefaciens*, разбавленной в 10 раз безгормональной жидкой средой МС. Через 5—10 мин кусочки растительных тканей высушивали стерильной фильтровальной бумагой и возвращали обратно в чашки Петри с той же средой. Через 48 ч растительные ткани переносили на питательную среду того же состава с добавлением 300—400 мг/л клафо-

рана («Хехст», Турция) для элиминации бактерий и 200 мг/л канамицисульфата (Курганский завод медпрепаратов, Россия) для селекции трансгенных линий. В случае использования штамма *pGS1166 A. tumefaciens*, несущего ген устойчивости к гигромицину, в питательную среду добавляли 25 мг/л гигромицина («Serva», ФРГ). Через 2 недели культивирования растительные ткани и образующиеся клеточные ли-

Рис. 3. Определение активности NPTII трансгенных растений *S. rickii* и *S. lycopersicoides*: 1—*S. rickii* (контроль); 2—*S. lycopersicoides* (контроль); 3—*S. rickii* Kan<sup>r</sup> клон № 1; 4—то же, клон № 2; 5—*S. rickii* Hyg<sup>r</sup> клон № 1, Kan<sup>r</sup> клон № 1; 6—*S. rickii* Hyg<sup>r</sup> клон № 1, Kan<sup>r</sup> клон № 1; 7—*S. lycopersicoides* Kan<sup>r</sup> клон № 1; 8—то же, клон № 2; 9—*S. lycopersicoides* Hyg<sup>r</sup> клон № 1, Kan<sup>r</sup> клон № 1; 10—бактериальная культура *A. tumefaciens* pMB90 (HIN)



нии переносили на питательную среду того же состава, но концентрацию клафорана уменьшали вдвое. Для генетической трансформации *S. tamnosum* и *S. sisymbriifolium* использованы другие среды. Трансген-

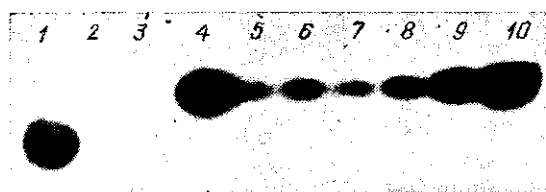


Рис. 4. Определение активности NPTII трансгенных растений *S. nigrum*: 1—бактериальная культура *A. tumefaciens* pMB90 (HIN); 2—*S. nigrum* (контроль); 3—*S. nigrum albina* (контроль); 4—*S. nigrum* Kan<sup>r</sup> клон № 1; 5—то же, клон № 2; 6—*S. nigrum* Hyg<sup>r</sup> клон № 1, Kan<sup>r</sup> клон № 1; 7—*S. nigrum albina* Kan<sup>r</sup> клон № 1; 8—то же, клон № 2; 9—*S. nigrum albina* Hyg<sup>r</sup> клон № 1, Kan<sup>r</sup> клон № 1; 10—*S. nigrum* Kan<sup>r</sup> клон № 3

ные каллусы этих видов получены на среде ЕМС [6], а для образования побегов из трансгенных каллусов использовали среду МС с 3 мг/л БАП.

Растения, устойчивые к обоим антибиотикам, получали повторной генетической трансформацией. Коэффициент трансформации определяли как отношение количества эксплантатов, на которых обнаружены устойчивые каллусы, к общему числу обработанных суспензией *A. tumefaciens* эксплантатов, умноженному на 100 %. Растения, растущие в присутствии антибиотиков, использовали при биохимических анализах для доказательства их трансгенной природы.

Активность неомицинофосфотрансферазы (NPTII) исследовали по методу, описанному ранее [7].

**Результаты и обсуждение.** С помощью метода листовых дисков нами получены трансгенные растения у 9 диких видов родов *Solanum* и *Lycopersicon*. Многие виды характеризовались чрезвычайно высоким коэффициентом генетической трансформации. Для *L. peruvianum* var. *dentatum* (линии 3767, 3772), *S. rickii*, *S. nigrum*, *S. lycopersicoides*, *S. aculeatissimum* коэффициент трансформации составлял 70—90, иногда даже 100 %, причем очень часто на одном листовом эксплантате образовывался независимо один от другого по 2—3 устойчивых к антибиотикам каллуса, из которых впоследствии развивались трансгенные побеги (рис. 1). Для *S. rickii* и *S. lycopersicoides* устойчивые к антибиотикам каллусы с большой частотой получали также при использовании в качестве эксплантатов кусочков стеблей. Так, при заражении 50 стеблевых эксплантатов *S. lycopersicoides* суспензией *A. tumefaciens*, несущей плазмиду *pGS1166*, выявлено 85 каллусов, стойких к гигромицину

(рис. 2). Стабильное получение большого количества устойчивых к антибиотикам каллусов наблюдалось у этих видов при использовании различных штаммов *A. tumefaciens*. Перечисленные виды отличаются высокой регенерационной способностью, и регенерация побегов из трансгенных каллусов отмечена в течение 1—1,5 месяца (см. рис. 1 и 2). Для остальных видов и некоторых разновидностей *L. peruvianum* коэффициент трансформации был намного ниже. Особенно заметны отличия в эффективности трансформации у разновидностей и форм *L. peruvianum*. После обработки 80 экплантатов *L. peruvianum* var. hu-

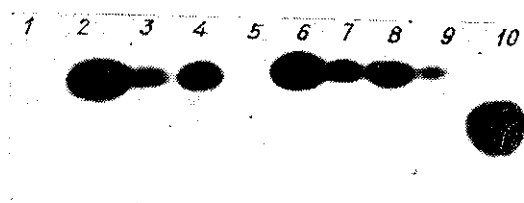


Рис. 5. Определение активности NPTII трансгенных растений *L. peruvianum* и *L. pennellii*: 1 — *L. peruvianum* var. *humifusum* Kan<sup>r</sup> (контроль); 2 — *L. peruvianum* var. *humifusum* Kan<sup>r</sup> клон № 1; 3 — то же, клон № 2; 4 — *L. peruvianum* Mill. Kan<sup>r</sup> клон № 1; 5 — *L. pennellii* (контроль); 6, 7, 8, 9 — *L. pennellii* Kan<sup>r</sup> клоны №№ 1, 2, 3 соответственно; 10 — бактериальная культура *A. tumefaciens* pMB90 (HIN)

*mifusum* суспензией *A. tumefaciens*, несущей плазмиду pGV<sub>11-21</sub>, получены всего два устойчивых каллуса, из которых впоследствии были регенерированы растения. Большая разница в эффективности трансформации наблюдалась между исходной формой дикого типа и альбиносной формой *L. peruvianum* var. *dentatum* (линия 3767). Коэффициент трансформации мутанта-альбиноса составлял всего 4 %, в то время как этот показатель исходной дикой формы составлял 70—90 %. При этом не было обнаружено столь заметной разницы в эффективности трансформации между зеленой и альбиносной формой *S. nigrum*.

Наиболее трудным оказалось получение трансгенных растений *S. sisymbriifolium* и *S. mammosum*. После многочисленных экспериментов с применением различных питательных сред и штаммов *A. tumefaciens* было выявлено лишь по одному трансгенному растению у этих видов.

Анализ активности NPTII подтвердил экспрессию этого гена в растениях, устойчивых к канамицину (рис. 3—5). В дальнейшем планируется исследовать растения, устойчивые к гиромоцину и канамицину, методом ДНК-ДНК-гибридизации по Саузерну.

В результате двухлетней работы нам удалось получить довольно богатую оригинальную коллекцию диких растений, устойчивых к кана-

#### Виды и формы растений, устойчивые к антибиотикам

Вид, форма	Kan	Нуг	Kan+Нуг	
<i>Lycopersicon peruvianum</i> var. <i>dentatum</i> (3767)	+		+	V
<i>L. peruvianum</i> var. <i>dentatum</i> (3772)	+	V	+	V
<i>L. peruvianum</i> var. <i>dentatum</i> (3767) albina	X			
<i>L. peruvianum</i> var. <i>humifusum</i>	X			
<i>L. peruvianum</i> Mill.	*			
<i>L. pennellii</i>	+			
<i>Solanum rickii</i>	+	V	X	V
<i>S. lycopersicoides</i>	+	V	*	V
<i>S. nigrum</i>	+	V	X	V
<i>S. nigrum</i> albina	+	V	X	V
<i>S. mammosum</i>	X			
<i>S. sisymbriifolium</i>	X			
<i>S. aculeatissimum</i>	X			
<i>S. gilo</i>	*			

Примечание. «+» — pGV<sub>11</sub>; «X» — pGV<sub>11-21</sub>; «X» — pGV3850/pAP2034. 355.11; «V» — pGS1166.

мицину, гиромоцину, а также к обоим антибиотикам одновременно (таблица). Растения будут использованы как доноры в опытах по соматической гибридизации с применением  $\gamma$ -облучения. После слияния протопластов культурного вида с облученными протопластами дикого вида, устойчивого к одному или обоим антибиотикам, возможен простой и удобный отбор гибридных колоний при добавлении в питательную среду соответствующих антибиотиков. Особую ценность представляют трансгенные хлорофиллдефектные мутанты *L. peruvianum* var. *dentatum* (линия 3767) и *S. nigrum*. Они являются универсальными партнерами для соматической гибридизации, поскольку селекцию гибридов можно осуществлять даже в отсутствие какого-либо генетического маркера у другого партнера, а также без инактивации протопластов ( $\gamma$ -облучение, обработка моноацетатом и др.).

**Резюме.** Проводилися дослідження з генетичної трансформації двох видів родів *Solanum* і *Lycopersicon* методом листових дисків. Отримано стійкі до канаміцину рослини *L. peruvianum* var. *humifusum*, *L. peruvianum* Mill., *L. pennellii*, *S. aculeatissimum*, *S. sisymbriifolium*, *S. gilo*, *S. mammosum*. У видів *L. peruvianum* var. *dentatum*, *S. rickii*, *S. lycopersicoïdes*, *S. nigrum*, окрім рослин, стійких до канаміцину, одержано також рослини, стійкі до гіроміцину, а також до обох антибіотиків. Результати аналізу активності неоміцинофосфотрансферази (NPTII) підтверджують експресію цього гена в трансгенних рослинах.

**Summary.** Using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation kanamycin-resistant plants of *Lycopersicon peruvianum* var. *humifusum*, *L. peruvianum* Mill., *L. pennellii*, *Solanum aculeatissimum*, *S. sisymbriifolium*, *S. gilo*, *S. mammosum* were obtained. By this procedure plants of *L. peruvianum* var. *dentatum*, *S. rickii*, *S. lycopersicoïdes*, *S. nigrum* resistant to kanamycin, hygromycin as well as resistance to both kanamycin and hygromycin were obtained too. Assay of neomycin phosphotransferase (NPTII)-activity confirmed this chimeric gene expression in the transformed plants.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Bellini C., Chupeau M. C., Guerche P. et al. Transformation of *Lycopersicon peruvianum* and *Lycopersicon esculentum* mesophyll protoplasts by electroporation // Plant Sci.— 1989.— 65, N 1.— P. 63—75.
2. Dix P. J., McKindley C. P., McCabe P. F. Antibiotic resistant mutants of *Solanum nigrum* / Progr. in plant cell. and mol. biol. / Eds. H. J. Nijkamp, L. H. W. Van Der Plas, J. van Aaztrijk. — Kluwer: Dordrecht, 1989.— P. 169—173.
3. Рудак В. А. Получение хлорофиллдефектных и трансгенных растений в семействе *Solanaceae* // Тез. докл. конф. молодых ученых «Актуальные проблемы физиологии растений и генетики (26—28 мая 1992 г., Киев).— Киев, 1992.— С. 139.
4. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiol. Plant.— 1962.— 15, N 3.— P. 473—497.
5. Gamborg O. L., Miller L. A., Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells // Exp. Cell Res.— 1968.— 50, N 1.— P. 151—158.
6. Сидоров В. А., Писень Н. М., Глеба Ю. Ю., Ситник К. М. Соматическая гибридизация растений.— Киев: Наук. думка, 1985.— 132 с.
7. Schreier P. H., Seftor E. A., Schell J., Bohnert H. J. The use of nuclear-encoded sequences to direct the light regulated synthesis and transport of a foreign protein into plant chloroplasts // EMBO J.— 1985.— 4, N 1.— P. 25—32.