

1990. – 280с.;
5. *Maliga P.* Isolation and characterization of mutants in plant cell cultures // *Ann.Rev.Plant Physiol.* – 1984. – 35. – P. 519-542
 6. *Сергеева Л.Е.* Изменения культуры клеток под действием стресса. – К.: Логос, 2001. – 100 С.
 7. Сергеева Л.Е. Новая среда с ионами бария – альтернативная система для отбора солеустойчивых клеточных линий // *Біотехнологія.* – 2002. - 2. – С.47-52.
 8. *Тищенко Е.Н., Сергеева Л.Е., Михальская С.И., Данильченко О.А.* RAPD- анализ вольфрамустойчивой клеточной линии сои с комплексной толерантностью к осмотикам // *Физиология и биохимия культ. растений.* - 2008. – Т.40. - №4. – С.329-337.
 9. *Паушева З. П.* Практикум по цитологии растений. М.1988. – 280 с.
 10. *Roth E. J, Frazier B L., Aruya N. R. Lark K G.* Genetic variation in an inbred plant: Variation in tissue cultures of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] // *Genetic* - 121 – 1989 - P.359-368.
 11. *Бублик Е.Н., Адонин В.И., Кунах В.А.* Цитогенетическая изменчивость клеточных линий *Ungernia victoris* при выращивании на питательных средах различного состава // *Цитология и генетика.* – 2008. - №1. С.29 -36.
 12. *Чугункова Т.В., Дубровная О.В.* Цитогенетический анализ каллусных культур и растений – регенерантов, полученных из эксплантов сахарной свеклы различной плоидности // *Цитология и генетика.* – 1998. – Т.32, №4. – С.9-15.

Резюме

Показано, що на відміну від вихідного калюсу, в якому виявлено два модальних класи числа хромосом (біля 2x та 4x), у вольфрам-стійкої клітинної лінії спостерігається один модальний клас (біля 4x). Крім того, відмічається тенденція до підвищення рівня плоїдності вольфрамстійкої лінії із збільшенням терміну культивування в умовах *in vitro*.

Показано, что в отличии от исходного каллуса, у которого определено два модальных класса числа хромосом (около 2x и 4x), у вольфрамустойчивой клеточной линии наблюдается один модальный класс числа хромосом (около 4x). Кроме того, отмечается тенденция к увеличению уровня плоидности у вольфрамустойчивой клеточной линии с повышением срока культивирования в условиях *in vitro*.

There were shown that unlike the initial callus with two modal chromosome classes (near 2x and 4x) the tungsten resistant cell line is characterized by single modal chromosome class (near 4x). Besides that tendency towards polyploidy in tungsten resistant cell line with the increasing of cultivation tern in vivo is exhibited.

РУДАС В. А., ШАХОВСЬКИЙ А. М., МОРГУН Б. В., МАТВЄЄВА Н. А., КУЧУК М. В.

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України

Україна, 03680, Київ, вул. Академіка Заболотного, 148, e-mail: rudasv@gmail.com

ОТРИМАННЯ ТРАНСГЕННИХ РОСЛИН КАРТОПЛІ СТІЙКИХ ДО ГЕРБІЦИДУ БАСТА, ЩО МІСТЯТЬ ГЕН *cup11A1* ЦИТОХРОМУ P450sc

Створення сортів культурних рослин з підвищеною продуктивністю та стійкістю до гербіцидів є нагальною вимогою нашого часу. Використання сучасних біотехнологічних методів і, зокрема, генетичної трансформації рослин дозволяє значно скоротити час отримання рослин з бажаними характеристиками.

Метою нашого дослідження було отримання методами генної інженерії рослин картоплі з підвищеною біологічною продуктивністю та стійкістю до гербіцидів. Вибір

гена *bar* для генетичної трансформації зумовлений його високою ефективністю [1], широким застосуванням та наявністю комерційних контактних гербіцидів суцільної дії (Basta, Vialaphos, Glufosinate, Phosphinothricin) до яких він надає стійкість. В свою чергу ген *sup11A1* кодує мітохондріальний цитохром P450_{scs}, який в стероїдогенних тканинах тварин каталізує перетворення холестерину в прегненолон, спільний метаболічний попередник усіх стероїдних гормонів. Стимулюючий вплив ендогенного застосування стероїдних гормонів на проростання пилку тютюну був продемонстрований в 1995 році [2]. Декілька років тому було показано, що трансгенні рослини *Nicotiana tabacum*, які несли ген *sup11A1*, що кодує цитохром P450_{scs} з мітохондрій кори надниркових залоз бика, випереджали рослини дикого типу за швидкістю росту і розвитку надземної і підземної частин, вмістом водорозчинного білку, вуглеводів і крохмалю [3,4,5]. Ці позитивні перетворення відбувалися внаслідок зміни гормонального статусу трансгенних рослин і свідчили про функціональну активність P450_{scs} тваринного походження в рослинах. Іншим можливим позитивним явищем при трансформації рослин геном *sup11A1* може бути поява у трансгенних рослин стійкості до деяких гербіцидів. Було продемонстровано що трансгенні рослини картоплі, які несуть ген *sup1A1* пацюка відрізнялися підвищеною стійкістю до гербіцидів хлортолуруну і метабензтіазуруну [6].

Матеріали і методи

Бактеріальний штам. Для генетичної трансформації картоплі використовували *Agrobacterium tumefaciens* штам GV3101, що несе генетичну конструкцію pCB093 розміром 10960 п.н. На Т-ДНК розміщувалися експресивні касети Pnos-*bar*-Tocs, P35S-*sup11A1*-T35S та P35S-*sgfp*-Tnos.

Рослинний матеріал. В роботі були використані асептично вирощені *in vitro* рослини 6 сортів картоплі (*Solanum tuberosum* L.), а саме: Луговська, Дезіре, Білоруський 12, Ласунак, Слов'янка, Незабудка. Рослини вирощували в пробірках на середовищі МС [7] при температурі 23-25 °С, 16-годинному світловому фотоперіоді та розмножували живцюванням.

Генетична трансформація картоплі. В експериментах використовували по 100 міжвузлів кожного сорту картоплі. Трансформацію і регенерацію рослин здійснювали згідно [8] з деякими модифікаціями. Для селекції трансгенних ліній в середовище додавали 1-4 мг/л фосфінотрицину.

ПЛР аналіз. Для перевірки відсутності агробактеріальної ДНК в отриманих рослинних лініях проводили ПЛР з праймерами на *virD1*. Бактеріальний ген *virD1* розміщений поза Т-ДНК і не переноситься в рослинний геном при трансформації. Для ампліфікації фрагменту цього гена довжиною 432 п.н. використовувалися праймери *virD1*-1, 5'-ATG TCG CAA GGC AGT AAG CCC A-3' та *virD1*-2, 5'-GGA GTC TTT CAG CAT GGA GCA A-3' [9]. Для аналізу *bar* гена використали 2 пари праймерів: 1 пара — 5'-GGA ATT CAT GAG CGG AGA ATT AAG GGA GT-3' та 5'-CAG ATC TCG GTG ACG GGC AGG AC-3', які утворювали фрагмент розміром 911 пн, 2 пара — 5'-GCG GTC TGC ACC ATC GTC AAC-3' і 5'-CAG ATC TCG GTG ACG GGC AGG AC-3', які утворювали фрагмент розміром 494 п.н. Для аналізу гена *sup11A1* використовували пару праймерів 5'-GCC ACA TCG AGA ACT TCC AGA AG-3' та 5'-CTG GTG TGG AAC ATC TTG TAG ACG-3', які утворювали фрагмент розміром 502 п.н. [4].

Виділення сумарної РНК та синтез першого ланцюга кДНК. Сумарну РНК виділяли згідно методики [10]. Матеріалом були листки асептичних рослин вагою біля 200 мг. Концентрацію та чистоту препаратів РНК вимірювали на спектрофотометрі BioPhotometer (Eppendorf) v.1.35.

Проведення зворотньої транскрипції. 1 мкг сумарної РНК попередньо обробленої ДНКазою I, вільною від РНКаз (Fermentas), використовувався як матриця для синтезу першого ланцюга кДНК (зворотнього транскрипту). Синтез проводили за допомогою спеціалізованого набору реактивів компанії Fermentas (#K1612) за

інструкцією фірми-виробника. Для кожної проби РНК проводили дві паралельні реакції — у присутності і у відсутності (негативний контроль) зворотної транскриптази M-MuLV. Для наступної ампліфікації застосовували ті ж самі специфічні до кодуєчої частини гена *cup11A1* цитохрому P450_{scs} праймери, які давали фрагмент розміром 502 п.н.

Результати та обговорення

В результаті експериментів згідно методики [8] трансгенні рослини отримані не були. Спостерігали швидке почорніння експлантів і їх загибель, а також неконтрольований ріст агробактерій. В подальших експериментах використали по 100 експлантів картоплі сортів Луговська і Слов'янка. Обробка експлантів агробактерією здійснювалася так, як і в попередніх експериментах, але була докорінно змінена система селекції трансгенних клітин. Була використана багатоступінчаста система селекції трансгенних клітин, яку здійснювали шляхом поступового підвищення концентрації фосфінотрицину (перші 2 місяці культивування — 1 мг/л, III-IV місяці — 2 мг/л, і надалі — 4 мг/л), нітрату амонію (від 0 до 1,65 г/л) в живильному середовищі (в перший місяць — повна відсутність нітрату амонію в середовищі, II місяць — 1-10 % від концентрації в середовищі МС, III місяць — 50 % від концентрації в середовищі МС, надалі вирощування на середовищі МС (100 %) та збільшенням освітленості експлантів від темряви по повноцінного освітлення (I місяць — темрява, II місяць — розсіяне світло, надалі повне освітлення). Через 5-6 місяців селекції було регенеровано 8 трансгенних рослин картоплі сорту Луговська. 4 із 8 рослин мали аномальну морфологію: утворювали багато пагонів і погано вкорінювалося. Це було добре помітно навіть в умовах *in vitro*. Можливо ці аномалії зв'язані зі зміною гормонального статусу рослин. Остаточні висновки можна буде зробити після вирощування всіх рослин в ґрунті, хромосомного аналізу і більш детального молекулярно-біологічного аналізу всіх рослин.

ПЛР-аналіз на *vir*-район *A. tumefaciens* був негативним для всіх 8 трансгенних рослин, що свідчить про відсутність у них агробактеріального забруднення. Проведений ПЛР-аналіз на ген *bar* з використанням 2 пар праймерів та на ген *cup11A1* цитохрому P450_{scs} з використанням 1 пари праймерів підтвердив інтеграцію цих генів в геном всіх 8 отриманих трансформованих рослин (Рис. 1). Для аналізу експресії *cup11A1* гена на рівні РНК були взяті 2 трансгенні рослини з нормальною морфологією. Аналіз показав наявність мРНК гена *cup11A1* в обох рослинах (Рис. 2), що свідчить про активну транскрипцію. В подальшому планується провести дослідження на виявлення білкового продукту гена.

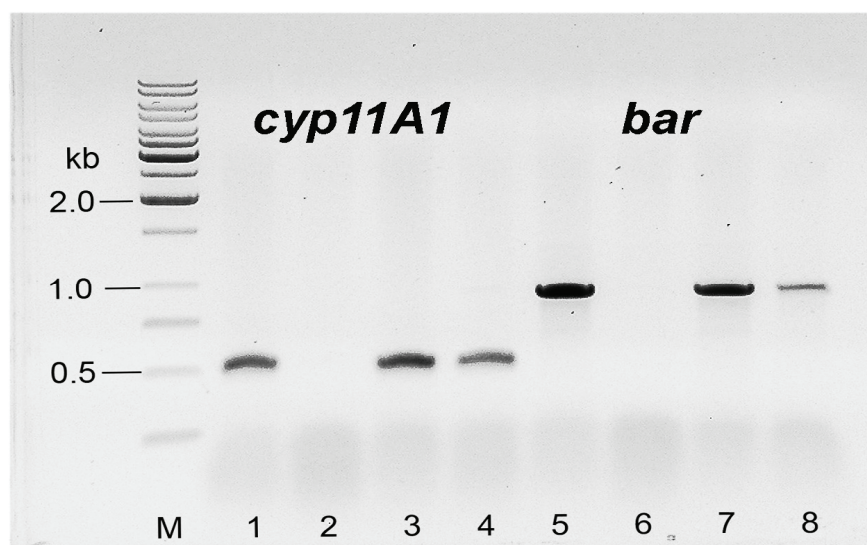


Рис. 1. Результаты ПЛР-анализу на гены *bar* та *суп11А1* растений картофеля сорта Луговська, трансформированных штамом рСВ093: М — ДНК маркер, 1, 5 — плазмидна ДНК в якості позитивного контролю, 3-4, 7-8 — загальна ДНК трансформированных растений картофеля клонів 1 і 2

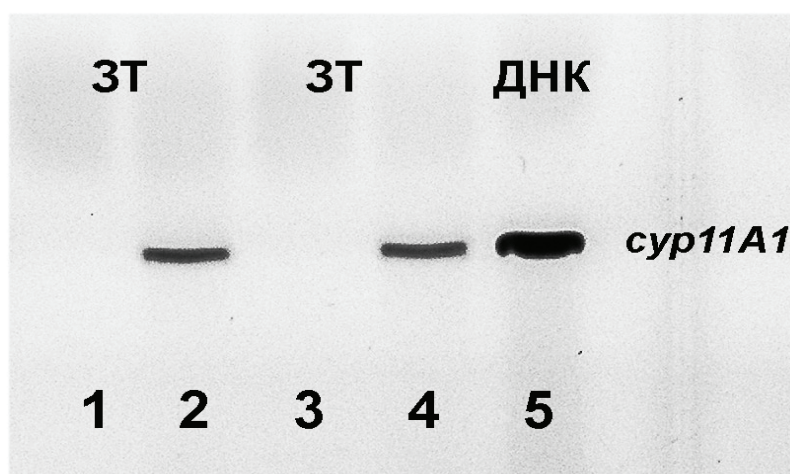


Рис 2. Анализ зворотних транскриптів (ЗТ) і геномної ДНК (ДНК) растений картофеля на ген *суп11А1*: 1, 3 — РНК трансгенных растений № 5 і 8 без додання зворотної транскриптази в якості негативного контролю; 2, 4 — ЗТ з РНК трансгенных растений № 5 і 8 відповідно; 5 — геномна ДНК трансформованої рослини

Висновки

Проведено генетичну трансформацію конструкцією з генами *bar* і *суп11А1*. Регенеровано 8 растений картофеля вдосконаленим методом поступового підвищення концентрації фосфінотрицину і нітрату амонію в живильному середовищі. Хоча фенотипічно рослини різняться, проте було показано, що усі вони інтегрували ген *bar* (стійкість до фосфінотрицину) та ген *суп11А1* цитохрому Р450_{scs}. Молекулярний аналіз 2 растений підтвердив транскрипцію гена цитохрому Р450_{scs}.

Література

1. De Block M., Botterman J., Vandewiele, M., Dockx J., Thoen, C., Gosselé, V., Movva N., Thompson C., Van Montagu M., Leemans J. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme // EMBO J. — 1987. — vol. 6. № 9.— P.2513-2518.
2. Ylstra B., Touraev A., Brinkmann A. O., Heberle-Bors E., Tunen AJV. Steroid hormones stimulate germination and tube growth of *in vitro* matured tobacco pollen // Plant Physiology. — 1995.— vol. 107, № 2. — P.639-643.
3. Бердичевец И.Н., Манешина Т.В., Ярмолинский Д.Г., Спивак С.Г., Шпаковский Г.В., Картель Н.А. Трансформация растений табака рекомбинантной плазмидой рGBP450f экспрессирующей кДНК *суп11А1* цитохрома Р450_{scs} из коры надпочечников быка // Международная конференция «Молекулярная генетика, геномика и биотехнология». — Минск. — 2004.
4. Спивак С.Г. Бердичевец И.Н., Картель Н.А. Трансгенные растения табака, экспрессирующие ген *суп11А1* цитохрома Р450_{scs} животного происхождения // Фактори експериментальної еволюції організмів. — Київ. — 2006. — С.639-644.
5. Спивак С.Г., Морозова Е.В., Бердичевец И.Н., Картель Н.А. Влияние экспрессии гена *суп11А1* цитохрома Р450_{scs} животного происхождения на гормональный статус и фенотип растений табака *Nicotiana tabacum* L. // Гуминовые кислоты и фитогормоны в растениеводстве. — Київ. — 2007.— С.72.
6. Yamada T., Ohashi Y., Ohshima M., Inui H., Shiota N., Ohkawa H., Ohkawa Y. Inducible cross-tolerance to herbicides in transgenic potato plants with the rat *суп1А1* gene //Theor. Appl. Genet. — 2002. — vol. 104. № 2-3.— P.308-314.

7. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol. Plant.* — 1962. — vol. 15, № 3. — P.473-497.

8. Beaujean A., Sangwan R.S., Lecardonnel A., Sangwan-Norreel B.S. *Agrobacterium*-mediated transformation of three economically important potato cultivars using sliced internodal explants: an efficient protocol of transformation // *J. Exp. Bot.* — 1998. — vol. 49, № 326. — P.1589-1595.

9. K.H. Lipp João, Brown T.A. Enhanced transformation of tomato co-cultivated with *Agrobacterium tumefaciens* C58C1Rif^r::pGSFR1161 in the presence of acetosyringone // *Plant Cell Rep.* — 1993. — vol. 12, № 7-8. — P.422-425.

10. Logemann J., Schell J., Willmitzer L. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues // *Anal. Biochem.* — 1987. — vol. 163, № 1. — P.16-20.

Резюме Отримано 8 трансгенних ліній картоплі сорту Луговська після *Agrobacterium tumefaciens*-опосередкованої трансформації штамом, що несе ген *bar* та ген *cyp11A1* цитохрому P450_{scc} кори надниркових залоз бика. 4 із 8 рослин мали аномальну морфологію. Проведений ПЛР-аналіз на гени *bar* і *cyp11A1* підтвердив інтеграцію цих генів в геном всіх отриманих трансформованих ліній. Транскрипція гена *cyp11A1* підтверджена ПЛР аналізом зворотних транскриптів.

Получено 8 трансгенных линий картофеля сорта Луговская после *Agrobacterium tumefaciens*-опосредованной трансформации штаммом, несущим ген *bar* и ген *cyp11A1* цитохрома P450_{scc} из коры надпочечников быка. 4 из 8 растений имели аномальную морфологию. Проведенный ПЦР-анализ на гены *bar* и *cyp11A1* подтвердил интеграцию этих генов в геном всех полученных трансформованных линий. Транскрипция гена *cyp11A1* подтверждена ПЦР-анализом обратных транскриптов.

Eight PPT-resistant potato lines were obtained after *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation with a gene construct carrying *bar* gene and *cyp11A1* gene of cytochrome P450_{scc} from bovine adrenal cortex. Four out of eight plants had abnormal morphology. Integration of foreign genes in genome for all plants was confirmed by PCR analysis. Transcription of *cyp11A1* gene was confirmed by RT-PCR analysis.

САХНО Л.А., МОРГУН Б.В., КИЩЕНКО Е.М., КУЧУК Н.В.

Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины

Украина, 03680, Киев, ул. Академика Заболотного, 148, e-mail: sakhno2007@ukr.net

НАСЛЕДОВАНИЕ ВВЕДЕННЫХ ГЕНОВ *BAR* И *CYP11A1* ЦИТОХРОМА P450_{scc} ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В T₁ ПОКОЛЕНИИ ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ЛИНИЙ ТАБАКА И РАПСА

В последние годы возрастает интерес к введению различных генов цитохрома P450 животного происхождения в геном растений. Это связано с возможностью получения растений с новыми ценными характеристиками: устойчивостью к гербицидам и способностью к ремедиации почв и воздуха за счёт экспрессии генов, участвующих у млекопитающих в метаболизме ксенобиотиков (*cyp1A1*, *cyp2B6*, *cyp2C19*, *cyp2E1*) [1,2,3], а также ускорению темпов роста благодаря синтезу не присущих растительным тканям биологически-активных молекул (*cyp11A1*) [4]. Растения риса [1] способны расти на почвах, содержащих атразин и метолахлор, и накапливать их, очищая почву. Картофель с активным геном *cyp1A1*, полученным из печени крысы, демонстрирует устойчивость к гербицидам хлортолуруну и метабензтиазуруну [2]. Тополя, экспрессирующие ген *cyp2E1* цитохрома P450 из печени кролика, способны поглощать такие ядовитые вещества, как трихлорэтилен,