

УДК 579.254.2

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

Институт клеточной биологии и генетической инженерии  
НАН Украины, Киев

## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ ХЛОРОПЛАСТНОЙ ДНК *SOLANUM RICKII*



С помощью метода биолиственной трансформации при использовании векторной конструкции, содержащей ген *aadA* (устойчивость к стрептомицину и спектиномицину), получены транспластомные растения *Solanum rickii*. Использование селективного давления сразу же после бомбардирования микрочастицами и одновременное введение двух антибиотиков — стрептомицина и спектиномицина в достаточной концентрации позволило провести успешную селекцию и избежать получения спонтанных мутантов. Трансформированные растения были зелеными, по морфологии не отличались от растений исходного дикого типа, нормально росли при длительном (более 2 лет) культивировании на среде с антибиотиками.

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

ISSN 0564–3783. Цитология и генетика. 2005. № 5

**Введение.** Трансформация хлоропластной ДНК — одно из приоритетных направлений в современной генетической инженерии растений. По сравнению с ядерной трансформацией она имеет ряд несомненных преимуществ, обусловленных особенностями развития растений. Так, материнское наследование цитоплазматических генов у большинства сельскохозяйственных культур затрудняет перенос с пылью чужеродных генов, чем способствует экологической безопасности и предотвращает возникновение трансгенных сорных культур. Поскольку копияемость хлоропластной ДНК в клетках растений намного превышает копияемость ядерной ДНК [1], появляется реальная возможность существенно повысить выход белкового продукта. Полистронный тип экспрессии при трансформации хлоропластов позволяет вводить в растительную клетку несколько генов одновременно. Осуществление хлоропластной трансформации по способу гомологичной рекомбинации и строгая специфичность по месту встраивания переносимого гена дает возможность избежать так называемого неконтролируемого эффекта положения или «молчания» перенесенных генов, что происходит при ядерной трансформации.

Разработка и успешное внедрение метода биолиственной трансформации, суть которого заключается в обстреливании растительных клеток микрочастицами вольфрама или золота с нанесенными на них молекулами ДНК [2–4], вначале позволили достичь значительных успехов в трансформации ядерного генома растений. Таким образом были получены трансгенные растения табака, риса, кукурузы, сои и многих других видов. Однако получение транспластомных растений в отличие от ядерных трансформантов все еще остается достаточно сложной задачей. 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]. Во всех этих работах был использован метод биолиственной трансформации, что может свидетельствовать о его успешном применении для внедрения чужеродной ДНК в хлоропласты.

Мы приводим результаты успешной трансформации хлоропластов еще одного представителя семейства пасленовых — *Solanum rickii*.

**Материал и методы. Растительный материал.** Материалом для исследований служили растения *S. rickii*, выращенные асептически на среде MS [11] в культуральной комнате при температуре 22–24 °С и световом дне 16 ч.

**Получение каллусных тканей и регенерация растений.** Инициацию каллусообразования из сегментов междоузлий размером 10 мм и листовых пластинок проводили на среде MS с добавлением 2 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д), 0,5 мг/л кинетина на протяжении 4–14 сут. Регенерацию растений из полученных каллусных тканей индуцировали при последовательной смене сред — СИМ, содержащей 2 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л зеатина [12], а также ST-1, ST-2 [13, 14] при постоянном селективном давлении (100 мг/л спектиномицина и 200 мг/л стрептомицина). Растения укореняли на среде MS без гормонов, но с добавлением тех же концентраций антибиотиков.

Для получения прямой регенерации растений из листовых пластинок сегменты листьев культивировали на среде MS с добавлением 5 мг/л кинетина (MSK).

**Селекция каллусных тканей и растений.** Для оптимизации условий селекции листовые пластинки культивировали на среде MSK с добавлением различных концентраций антибиотиков спектиномицина гидрохлорида и стрептомицина сульфата (от 50 до 300 мг/л среды); каллусные ткани культивировали на средах СИМ, ST-1, ST-2 с добавлением тех же концентраций антибиотиков. Селективную концентрацию определяли по степени обесцвечивания и наличию/отсутствию регенерации.

**Векторная ДНК.** Была использована плаزمид рСВ033, любезно предоставленная проф. Н. Коор (Мюнхенский университет, Германия). Векторная конструкция содержала ген *aadA*, находящийся под контролем промотора 16S рДНК табака, и терминатор гена *rbcL* (большая субъединица РУБИСКО) из пластома *Clamydomonas reinhardii*. Селективный ген фланкирован участками хлоропластной ДНК, которые включали гены *rpl32* (рибосомальный белок) и *trnL* (тРНК лейцина) табачного пластома, что обеспечивает встраивание гена *aadA* в гомологичную область хлоропластного генома.

**Биолистическая трансформация.** Для получения транспластомных растений *S. rickii* сегменты междоузлий бомбардировали вольфрамовыми частицами 0,9–1,1 мкм, на которые предварительно наносили плазмидную ДНК. Для этого к 50 мкл суспензии частиц добавляли 10 мкл плазмидной ДНК (1 мкг/мл), 50 мкл раствора CaCl<sub>2</sub> (2 М), 20 мкл раствора спермидина (5 М), через 20 мин промывали 70%-ным спиртом и ресуспендировали в 50 мкл абсолютного спирта. Была использована гелиевая пушка, вакуум 0,05 атм, расстояние от сопла насадки до поверхности питательной среды 14 см, давление гелия 8 атм.

**Выделение и молекулярный анализ ДНК.** Тотальную растительную ДНК для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) выделяли согласно протоколу [15].

Для подтверждения присутствия гена *aadA* использовали пары праймеров 5'-ATTTTGCC GGTTACTGCGCTG-3' (1) и 5'-TGCTGGCC GTACATTTGTACG-3' (2), специфичных к внутренней части гена *aadA*. Размер амплифицированного с помощью этих праймеров продукта составлял 523 п.н. Температура отжига — 65 °С, длительность реакции синтеза фрагмента — 1 мин при 72 °С. Для определения локализации гена *aadA* использовали также праймеры 5'-GGAAGGGATATTCGATCGCA-3' (3) и 5'-CGATCGAAAAGGAAATGTGAC-3' (4). При этом праймер 4 специфичен к спейсерному участку, находящемуся за пределами конструкции (рис. 1).

**Результаты исследований и их обсуждение.** Одним из условий, необходимых для успешных работ по получению трансформированных растений, является высокая частота регенерации растений. В связи с этим был разработан протокол для индукции растений из каллусных тканей *S. rickii*. Сегменты стебля и части листьев культивировали на среде MSD в течение

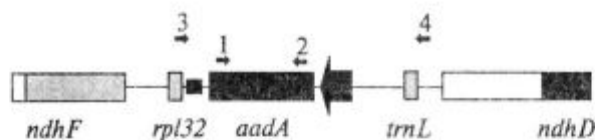


Рис. 1. Векторная конструкция, использованная для получения транспластомных растений *Solanum rickii*. Стрелками отмечено расположение праймеров 1–4

4–14 сут, затем переносили последовательно на среды СИМ и СТ-1. Регенерацию растений наблюдали после перенесения зеленого каллуса на среду СТ-2.

Поскольку использованный нами для трансформации ген несет устойчивость к стрептомицину и спектиномицину (рис. 1), возникла необходимость в определении концентрации антибиотиков, останавливающей рост нетрансформированных культур. Для этого сегменты листьев и каллусные ткани культивировали на средах с концентрацией антибиотиков от 50 до 300 мг/л. Минимально достаточной для селекции была определена концентрация 100 мг/л спектиномицина и 200 мг/л стрептомицина при совместном введении их в культуральную среду. При таких условиях не происходило позеленение каллусных тканей, не наблюдалась регенерация растений, а все пересаженные в такие условия растения становились белыми.

Листовые сегменты и участки стебля бомбардировали вольфрамовыми частицами с нанесенной ДНК и затем культивировали на селективной среде СИМ со 100 мг/л спектиномицина и 200 мг/л стрептомицина. Оба антибиотика были введены в среду одновременно для того, чтобы была возможность визуального (по зеленой окраске) отбора возможных транспластомных растений, а также с целью предотвращения появления спонтанных мутантов, так как спектиномицинустойчивые мутанты как правило оказываются чувствительными к стрептомицину и наоборот [16].

Можно предположить, что клетки, которые находятся в процессе наиболее активного деления на момент биолиственной трансформации, окажутся наиболее восприимчивыми для успешного внедрения чужеродной ДНК. В связи с этим в серии экспериментов были использованы сегменты междоузлий на самом начальном этапе инициации роста каллусной ткани. Для этого части стебля и листовых пластинок размером 5–10 мм помещали на среду MS с добавлением 2 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетина на 4 сут до начала роста каллусной ткани. Бомбардированию микрочастицами с нанесенной ДНК, имеющей гены устойчивости к стрептомицину и спектиномицину, под-

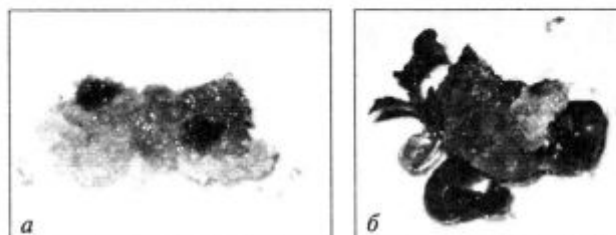


Рис. 2. Трансформированные зоны каллусной ткани на селективной среде (а) и регенерация растений из полученных клонов (б)

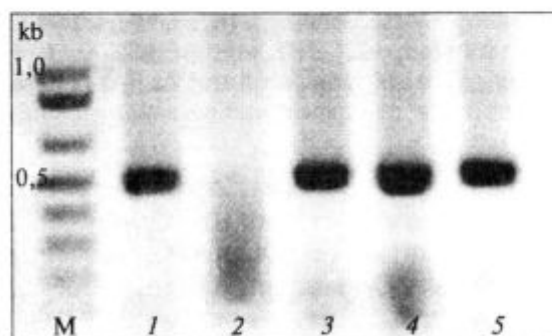


Рис. 3. Электрофореграмма результатов ПЦР-анализа суммарной ДНК трансформированных растений *S. rickii* (праймеры 1 и 2): М — маркер; 1 — плазмидная ДНК; 2 — нетрансформированное растение; 3–5 — трансформированные растения *S. rickii*

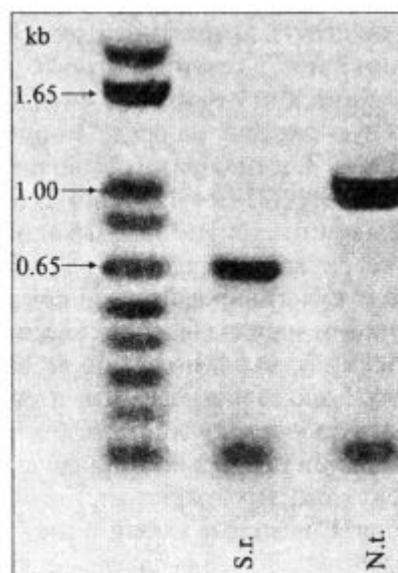


Рис. 4. Амплификация участка *rpL32-trnL* хлоропластной ДНК *S. rickii* и *N. tabacum* с помощью праймеров 5'-GGAAGGGATATTCGATCGCA-3' и 5'-TAA-GAGCAGCGTGTCTACCA-3'

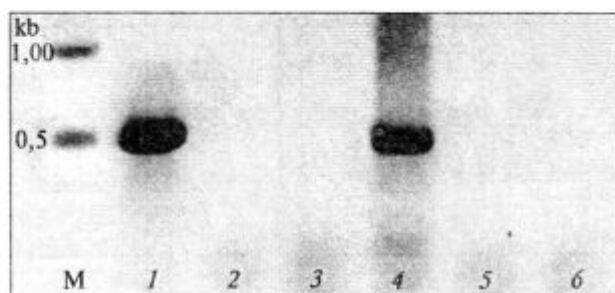


Рис. 5. Электрофореграмма результатов ПЦР-анализа двойной амплификации суммарной ДНК с использованием праймеров 3—4 и 1—2 (пояснения в тексте): М — маркер; 1 — плазмидная ДНК, праймеры 1—2; 2 — негативный контроль (-ДНК), праймеры 1—2; 3—6 — повторная амплификация праймерами 1—2 (линии 3, 5 — контроль; 4, 6 — трансформированное растение)

вергли 25 чашек с сегментами листьев и 20 чашек с сегментами стеблей (5—6 на каждой). Затем экспланты культивировали в течение 3 нед на среде СИМ с одновременным добавлением 100 мг/л спектиномицина и 200 мг/л стрептомицина, на которой наблюдался дальнейший рост калусной ткани. После этого материал переносили на среду ST-1, сохраняя присутствие антибиотиков. Через 2 мес культивирования были выделены две зоны каллуса, имеющие слабую зеленую окраску (остальные объекты оставались светло-желтыми при выращивании на свету). Эти клоны пассировали на протяжении 2 мес, в течение которых проводили систематический отбор зон, имеющих наиболее зеленую окраску на среде в присутствии антибиотиков. Таким образом было получено 7 подклонов — St4-1/1-St4-1/5 и St4-2/1-St4-2/2, которые были интенсивно зелеными и активно росли на селективной среде (рис. 2, а). При их дальнейшем культивировании на среде ST-2 с антибиотиками наблюдалась регенерация растений (рис. 2, б). Было получено 58 растений, из которых 5 оказались белыми, а остальные имели зеленую окраску листьев. Регенерированные растения несколько отличались по степени интенсивности окраски листовых пластинок и стебля. Некоторые имели темно-зеленый стебель и листья, другие — светло-зеленый стебель и темно-зеленые листья или белый стебель и зеленые листья.

Проведенный ПЦР-анализ клонов St4-1 и St4-2 показал наличие слабого сигнала в клоне

St4-1 и отсутствие его для St4-2. Отсутствие сигнала при анализе клона St4-2 в начале культивирования и слабая зеленая окраска клонов St4-1 и St4-2 по сравнению с субклонами после длительного выращивания на селективной среде позволяют предположить гетеропластидный характер трансформации и наличие пластид двух типов — как дикого, так и трансформированного. Длительное селективное давление привело к постепенному частичному вытеснению пластид дикого типа и функционированию трансформированных пластид, что было подтверждено ПЦР-анализом регенерированных растений (рис. 3).

В связи с тем, что для трансформации *S. rickii* была использована конструкция, которая содержит последовательности ДНК пластома табака, можно ожидать неполной гомологии этого участка хлоропластной ДНК с хлоропластной ДНК *S. rickii*. Такое предположение подтвердилось амплификацией участка *trnL-rpL32 N. tabacum* и *S. rickii* (рис. 4). Размер образующихся продуктов этой реакции не совпадает у этих двух видов. Неполная гомология участка хлДНК *N. tabacum*, использованного в конструкции, и соответствующего участка хлДНК *S. rickii*, по-видимому, может приводить к более сложной схеме встраивания нашего вектора в геном хлДНК. Мы предполагали, что встраивание происходит вблизи тех же генов хлДНК *S. rickii*, что и у хлДНК *N. tabacum*, однако само положение может быть не всегда корректным. В итоге прямое подтверждение локализации конструкции (например, с помощью праймеров 1 и 4) оказалось затруднительным.

В связи с изложенным мы использовали другой подход для доказательства включения векторной конструкции в хлДНК *S. rickii* вблизи генов *rpl32* и *trnL*. Предложенный метод состоит из двух последовательных амплификаций. На первом этапе проводили ПЦР с праймерами, специфичными для хлДНК *S. rickii* (праймеры 3 и 4). В результате происходило накопление не только продуктов этой реакции, но и прилегающих последовательностей, которые в случае трансформации могут содержать ген *aadA*. Аликвоту (1 мкл) реакционной смеси из первой ПЦР использовали для повторной ПЦР с праймерами, специфичными к гену

*aadA* (праймеры 1 и 2). Параллельно с этим идентичное количество исходной ДНК трансформированного растения разбавляли в объеме, равном объему реакционной смеси первой ПЦР. В дальнейшем аликвоту такого эквивалентного разбавления (1 мкл, как и в первом случае) использовали в качестве контроля для ПЦР с праймерами 1 и 2. В контрольной реакции не должно происходить образования фрагментов гена *aadA* в связи с разбавлением их до концентрации ниже детектируемого уровня.

Для определения места встраивания гена *aadA* была использована изложенная выше двойная амплификация с применением праймеров 3—4 и 1—2 (рис. 5). После первой амплификации исходной ДНК с праймерами 3 и 4 был использован 1 мкл реакционной смеси для повторной ПЦР с праймерами 1 и 2. Контролем служила аликвота (1 мкл) эквивалентного разбавления. Появление сигнала на ген *aadA* после повторной амплификации (рис. 5, линия 4) и отсутствие сигнала в контроле (рис. 5, линия б) указывают на наличие последовательности гена *aadA* на участке хлДНК, который фланкируется праймерами 3 и 4. Таким образом, можно ожидать, что интеграция гена произошла в прогнозируемом сайте хлДНК вблизи генов *rpl32* и *trnL*.

Пять полученных растений были использованы для регенерации растений второго поколения, а две линии — растений третьего поколения. Для этого был оптимизирован протокол прямой регенерации растений из листовых пластинок. Небольшие части листьев полученных трансформированных растений помещали на чашки Петри со средой MS с добавлением 5 мг/л кинетина, 50 мг/л стрептомицина и культивировали на свету в течение 1 нед, а затем переносили на ту же среду, но с увеличенным количеством антибиотиков (100 мг/л спектиномицина и 200 мг/л стрептомицина). Через 2 мес наблюдали массовую регенерацию растений, причем все они имели нормальную зеленую окраску листьев и стеблей, белые и пестролистные растения отсутствовали. В дальнейшем растения культивировали на среде MS без гормонов с антибиотиками, где они росли и укоренялись. Был проведен ПЦР-анализ полученных таким образом растений второго и третьего поколений, который показал

наличие в хлоропластах всех проверенных растений плазмидной ДНК. Таким образом, путем длительного пассирования каллусных тканей при непрерывном селективном давлении и повторного процесса регенерации растений можно в большей степени добиться вытеснения пластид дикого типа у гетеропластидных трансформированных объектов и максимального функционирования трансформированных пластид.

**SUMMARY.** The biolistic method was used for genetic transformation of *Solanum rickii* chloroplasts with *aadA* gene encoding resistance to streptomycin and spectinomycin. Selective pressure was applied immediately after microbombardment to avoid appearance of mutant lines. The transplastomic *Solanum rickii* plants remained green during two years cultivation on the media supplemented with two antibiotics. There were no morphological differences between the transformed and the wild type plants.

**РЕЗЮМЕ.** За методом білістичної трансформації з використанням векторної конструкції, що містить ген *aadA* (стійкість до стрептоміцину і спектиноміцину), було отримано транспластомні рослини *Solanum rickii*. Селективний тиск одразу після бомбардування мікрочастками та одночасне введення двох антибіотиків — стрептоміцину і спектиноміцину в достатній концентрації дозволили провести успішну селекцію та уникнути появи спонтанних мутантів. Трансформовані рослини мали зелене забарвлення, за морфологією не відрізнялись від рослин вихідного дикого типу, нормально росли при тривалому (понад 2 років) культивуванні на середовищі з антибіотиками.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bendich A.J. Why do chloroplasts and mitochondria contain so many copies of their genome // Bioessays. — 1987. — 6. — P. 279—282.
2. 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.
3. Finer J. J., Vain P., Jones M., McMullen M. Development of the particle inflow gun for DNA delivery to plant cells // Plant Cell Rep. — 1992. — 11. — P. 323—328.
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 // Nat. Biotechnol. — 2001. — **19** (9). — P. 870—875.
  9. Skarjinskaja 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. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture // Phys. Plant. — 1962. — **15**. — P. 473—497.
  12. Romano A., Raemakers K., Visser R. Transformation of potato (*Solanum tuberosum*) using particle bombardment // Plant Cell Rep. — 2001. — **20**. — P. 198—204.
  13. Shepard J.F., Totten R.E. Mesophyll cell protoplasts of potato // Plant Physiol. — 1977. — **60**. — P. 313—316.
  14. Shepard J.F. Abscisic acid-enhanced shoot initiation in protoplast-derived calli of potato // Plant Sci. Lett. — 1980. — **18**. — P. 334.
  15. Murray M.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA // Nucl. Acids Res. — 1980. — **8**. — P. 4321—4325.
  16. Eibl C., Zou Z.R., Beck A., Kim M., Mullet J., Koop H. In vivo analysis of plastid psbA, rbcL and rpL32 UTR elements by chloroplast transformation: tobacco plastid gene expression is controlled by modulation of transcript levels and translation efficiency // Plant J. — 1999. — **19**. — P. 333—345.

Поступила 22.04.05