

**ФИЛИПЕНКО Е.А., СИДОРЧУК Ю.В., ЗАГОРСКАЯ А.А., ЖАРИКОВ Т.Ю.,
ДЕЙНЕКО Е.В.**

*Институт цитологии и генетики СО РАН, Россия, г. Новосибирск, 630090,
пр-т Лаврентьева, д. 10, e-mail: filipenko@bionet.nsc.ru*

АНАЛИЗ СПЕКТИНОМИЦИН-УСТОЙЧИВЫХ КАЛЛУСНЫХ ЛИНИЙ МОРКОВИ (*DAUCUS CAROTA*), ВЫДЕЛЕННЫХ ПРИ ХЛОРОПЛАСТНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ

Технология получения трансгенных растений включает два принципиальных этапа. Первый связан с переносом и интеграцией чужеродного гена в геном растительной клетки. На втором этапе производится отбор трансформантов (по фенотипическим признакам) на селективных средах. Одним из антибиотиков, часто используемых в качестве селективного агента при создании транспластомных растений (с трансформированным хлоропластным геномом), является спектиномицин, действие которого приводит к нарушению синтеза хлоропластных белков. В этом случае генетическая конструкция, предназначенная для встраивания в хлоропластный геном, содержит ген *aadA*, кодирующий фермент аминогликозид-3'-аденилтрансферазу, который переводит спектиномицин в функционально неактивную форму — 3'-аденилилспектиномицин (1). При отборе на селективной среде с антибиотиком нетрансформированные растения обесцвечиваются, в то время как растения, в геном которых вошел трансген, остаются зелеными.

Длительный период культивирования растительных клеток на селективной среде может сопровождаться возникновением в хлоропластном геноме мутаций, обуславливающих резистентность к антибиотику (2–4).

Растения, обладающие устойчивостью к антибиотику вследствие произошедших в геноме спонтанных мутаций, фенотипически не отличимы от истинных трансгенных растений. Поэтому в работе по получению транспластомных растений необходимо учитывать вероятность появления растений, в пластомах которых появились мутации, и проводить дополнительный молекулярный анализ с целью их выявления и элиминирования.

При биобаллистической трансформации пластома моркови (*Daucus carota* L.) нами были выделены каллусные линии, резистентные к антибиотику спектиномицину. ПЦР-анализ не выявил наличия экзогенной ДНК в их геномах. Полученные результаты свидетельствуют, что устойчивость к антибиотику у каллусных линий моркови могла быть обусловлена спонтанными мутациями, возникшими как в пластидном, так и в ядерном геномах. В связи с этим целью данной работы являлось определение типа мутаций и их локализации в геномах выделенных линий.

Материалы и методы

Материалом для исследований служили устойчивые к спектиномицину каллусные линии, выделенные в ходе экспериментов по биобаллистической обработке каллусных культур клеток моркови плазмидой, содержащей ген устойчивости к спектиномицину *aadA*, и последующем отборе на среде с

добавлением антибиотика спектиномицина (100–500 мг/л). Выделение геномной ДНК проводили с использованием набора для выделения геномной ДНК “Genelute plant genomic DNA miniprep kit” (“Sigma”, США) согласно протоколу. ПЦР анализ проводили в 20 мкл буфера, содержащего 67 мМ трис-НСl (рН 8,9), 16 мМ (NH₄)₂SO₄, 1,5 мМ MgCl₂, 0,01% Твин-20, 100 мкМ дНТФ, 1 ед. активности *Taq*-полимеразы (“СибЭнзим”, Россия). Амплификацию фрагмента хлоропластного гена *rrn16* с 991 по 1245 позиции с праймерами **rr-car-1** 5'-ACAGGTGGTGCATGGCTGACG-3' и **rr-car-2** 5'-GAG GACGGGTTTTGGAGTTAGC-3' осуществляли после предварительной денатурации при 94 °С 3 мин в течение 34 циклов в следующем режиме: 94 °С, 10 с, отжиг праймеров 62 °С, 10 с, элонгация — 72 °С, 15 с. Для контроля качества гидролиза эндонуклеазой *Aat*II амплифицированного фрагмента длиной 254 п.н. при конструировании праймера **rr-car-1** была произведена замена нуклеотида Т (в 1009 позиции гена *rrn16*) на нуклеотид А, которая привела к появлению дополнительного рестрикционного сайта. Амплификацию фрагмента хлоропластного гена *rrn16* с 920 по 1034 позиции после предварительной денатурации при 94 °С 3 мин. В течение 34 циклов в следующем режиме: 94 °С, 10 с, отжиг праймеров 66 °С, 20 с, элонгация — 72 °С, 20 с. Для создания сайта рестрикции *Sal*GI в амплифицированном фрагменте гена *rrn16* длиной 114 н.п. при конструировании праймера **cr-m1** были произведены 2 нуклеотидные замены: Т и С вместо С и Т (в 1015 и в 1016 позициях гена *rrn16*) соответственно: 5' AACACCTTACGGCACGAGTTCGA 3'. Для контроля качества гидролиза эндонуклеазой рестрикции *Sal*GI амплифицированного фрагмента в последовательности праймера **cr-m2** также были произведены нуклеотидные замены G и С вместо С и Т (в 930 и в 932 позициях гена *rrn16*) соответственно: **cr-m2** 5' GAAGAACCTTACCAGGGTCGACA-3'. Все амплификации проводили с добавлением матрицы ДНК в количестве 20–50 нг на амплификаторе “Терцик” (“ДНК-технология”, Россия).

Амплифицированные фрагменты ДНК (200–300 нг) гидролизовали эндонуклеазами рестрикции *Aat*II (амплифицированные фрагменты ДНК с использованием праймеров rr-car1 и rr-car-2) и *Sal*GI (амплифицированные фрагменты ДНК с использованием праймеров cr-m1 и cr-m2). Реакцию гидролиза проводили в объеме 20 мкл в течение ночи при добавлении 10 ед. эндонуклеазы рестрикции на 1 мкг ДНК в температурных условиях и буферах, соответствующих ферментам. Электрофорез фрагментов ДНК проводили в 8%-ном полиакриламидном геле в 0,5 x TBE буфере.

Нуклеотидные последовательности фрагментов ДНК определяли с использованием “ABI PRISM Big Dye Terminator v3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit” (“Amersham”, Великобритания) в Межинститутском центре секвенирования (ИХБиФМ, СО РАН, г. Новосибирск). Анализ первичных последовательностей ДНК проводился с помощью программы BLAST и базы данных GenBank.

Результаты и обсуждение

Известно, что одной из причин возникновения устойчивости к спектиномицину у растений при культивировании на среде с добавлением антибиотика являются мутации, локализованные в двух разных районах хлоропластного гена *rrn16* — замена G на A в позиции 1012 гена и мутации в позициях 1138–1140, в результате чего происходит утрата сайта рестрикции *AatII* (2, 5). Это позволило нам предположить, что причиной устойчивости к антибиотику у выделенных нами каллусных линий моркови могли быть аналогичные мутации.

На основании данных о первичной нуклеотидной последовательности гена *rrn16 D.carota* (6) были сконструированы праймеры, специфичные к двум разным участкам этого гена, что позволило провести поиск мутаций.

ПДРФ анализ позволил выявить наличие мутаций в позиции 1012 гена *rrn16* у 6-ти из 10-ти проанализированных линий (рис. 1). У линий 2, 3, 5, 6, 7, 10 возникновение мутации в позиции 1012 приводило к изменению нуклеотидной последовательности, узнаваемой ферментом *SalGI*. В результате образовывалось два фрагмента — длиной 96 н.п. и 18 н.п. (на рис. 1 короткий фрагмент не виден). Гидролиз эндонуклеазой рестрикции *SalGI* амплифицированного фрагмента ДНК длиной 114 н.п. каллусных линий 4, 8, 9, не имеющих мутаций в позиции 1012 гена, приводил к образованию трех фрагментов — длиной 76 н.п., 20 н.п., 18 н.п. (короткие фрагменты не видны).

Гидролиз эндонуклеазой рестрикции *AatII* амплифицированных фрагментов гена длиной 254 н.п. каллусной линии 4, также как и контрольной линии, приводил к образованию трех фрагментов — длиной 104 н.п., 128 н.п. и 22 н.п. (на рис. 2 не виден). В то же время при гидролизе данным ферментом амплифицированных фрагментов мутантных каллусных линий 1, 8 и 9 образовывалось два фрагмента — длиной 232 н.п. и 22 н.п. (рис. 2).

Для выявления типа мутационных изменений, найденных в двух исследуемых районах гена *rrn16*, и точного определения нуклеотидных позиций мутаций в районе гена 1138-1140 (составляющий сайт *AatII*), были определены первичные нуклеотидные последовательности (полные нуклеотидные последовательности не приведены). Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей гена *rrn16* мутантных каллусных линий и нуклеотидной последовательности каллусной линии, не обладающей устойчивостью к спектиномицину, показал, что у трех исследуемых линий (1, 8, 9) произошла транзиция A1138G. У шести линий произошла трансверсия: у линий 2, 3, 10 — G1012T, а у линий 5, 6, 7 — G1012C.

У линии 4 не было найдено мутаций ни в одном из двух анализируемых районов гена. Известно, что резистентность к антибиотикам обусловлена изменением структуры прокариотического рибосомального комплекса вследствие мутаций в генах, кодирующих не только РНК-компоненты, но и белки рибосом, например, мутацией в гене *rpsE* рибосомного белка S5 (7). Однако в настоящее время еще не определена первичная нуклеотидная последовательность этого гена, локализованного в ядерном геноме, у *D. ca-*

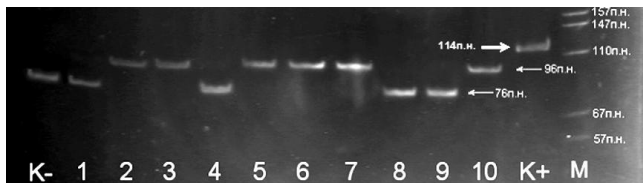


Рис. 1. Электрофорез в 8%-ном полиакриламидном геле амплифицированных фрагментов ДНК, гидролизованых эндонуклеазой рестрикции *SalGI*. В качестве матрицы для ПЦР использовали: 1–10 — ДНК каллусных линий, устойчивых к спектиномицину; “К-” — ДНК контрольного каллуса, не подвергнувшегося биобаллистической обработке, “К+” — ДНК каллуса моркови без последующей обработки эндонуклеазой рестрикции *SalGI*. М — ДНК плазмиды pBluscriptII SK(+), гидролизованная эндонуклеазой рестрикции *MspI*. Короткие фрагменты длиной 20 н.п. и 18 н.п. находятся вне поля рисунка

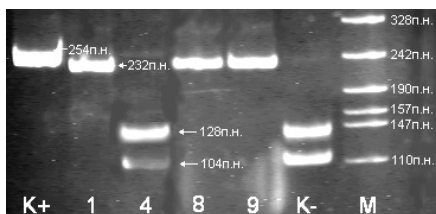


Рис. 2. Электрофорез в 8% полиакриламидном геле амплифицированных фрагментов ДНК, гидролизованых эндонуклеазой рестрикции *AatII*. В качестве матрицы для ПЦР использовали: 1, 4, 8, 9 — ДНК каллусных линий, устойчивых к спектиномицину, “К-” — ДНК контрольного каллуса, не подвергнувшегося биобаллистической обработке; “К+” — ДНК каллуса моркови без последующей обработки эндонуклеазой рестрикции *AatII*. М — ДНК плазмиды pBluscriptII SK(+), гидролизованная эндонуклеазой рестрикции *MspI*. Короткий фрагмент длиной 22 н.п. находится вне поля рисунка

rota. Это значительно усложняет поиск района, в котором потенциально могла произойти мутация, и затрудняет проведение молекулярного анализа.

Сравнительный анализ результатов, полученных в нашем исследовании, для *D.carota*, с известными данными для спектиномицин-устойчивых растений *Lesquerella fendleri* (4) и *Nicotiana* (5) показал, что во всех случаях произошли нуклеотидные замены в одних и тех же сайтах гена *rrn16*, кодирующего 16S рРНК. Необходимо отметить, что найденные нуклеотидные мутации локализованы в небольшом участке гена *rrn16* с 1012 по 1140 позиции, ответственном за образование спирали h34 на 3'конце 16S рРНК, содержащей сайт связывания спектиномицина. (4, 5, 8). Известно, что 16S рРНК играет важную роль в процессе трансляции хлоропластных белков. В случае возникновения мутаций в h34 антибиотик утрачивает способность связываться с рибосомой, что позволяет беспрепятственно синтезироваться хлоропластным белкам (8). Тип мутаций (нуклеотидные замены) и их лока-

лизация в гене *rrn16* объясняются высокой эволюционной консервативностью гена, кодирующего функционально значимый компонент пластидного трансляционного аппарата.

Выводы

1. Установлено, что мутации, являющиеся причиной резистентности к спектиномицину 9 из 10 каллусных линий моркови *Daucus carota*, локализируются в двух разных сайтах — 1012 и 1138-1140 — хлоропластного гена *rrn16*.

2. Показано, что произошедшие мутации представляют собой точковые нуклеотидные замены: у шести линий это трансверсия G1012T или G1012C, а у трех линий — транзиция A1138G. У одной линии причина возникновения устойчивости к спектиномицину не выяснена.

Литература

1. Shaw K.J., Rather P.N., Hare R.S., Miller G.H. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the amino glycoside-modifying enzymes // Microbiol. Res.— 1993.— V.57.— P. 138–163.

2. Svab Z., Maliga P. Mutation proximal to the tRNA binding region of the *Nicotiana* plastid 16S rRNA confers resistance to spectinomycin // Mol. Gen. Genet.— 1991.— V.228.— P. 316–319.

3. Sidorov V.A., Kasten D., Pang S.Z., Hajdukiewicz P.T., Staub J.M., Nehra N.S. Technical advance: stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker // Plant J.— 1999.— V.9.— P. 209–216.

4. Skarjinskaia M., Svab Z., Maliga P. Plastid transformation in *Lesquerella fendleri*, an oilseed *Brassicaceae* // Transgenic Res.— 2003.— V.12.— P. 115–122.

5. Fromm H., Edelman M., Aviv D., Galun E. The molecular basis for rDNA-dependent spectinomycin resistance in *Nicotiana* chloroplasts // EMBO J.— 1983.— V.6.— P. 3233–3237.

6. www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/ORGANELLES/plastids.html.

7. Ramakrishnan V., White S.W. The structure of ribosomal protein S5 reveals sites of interaction with 16S rRNA // Nature.— 1992.— V.358.— P. 768–771.

8. Kubarenko A., Sergiev P., Wintermeyer W., Dontsova O., Rodnina M.V. Involvement of helix 34 of 16S rRNA in decoding and translocation on the ribosome // J. Biol. Chem. 2006.— V.281.— P. 35235–35244.

Резюме

Проведен анализ 10 устойчивых к спектиномицину каллусных линий моркови, полученных в ходе экспериментов по биобаллистической обработке каллусных клеток моркови (*Daucus carota* L.) плазмидой, содержащей ген *aadA* (аминогликозид-3'-аденилтрансферазы), и последующем их отборе на селективной среде со спектиномицином (100–500 мг/л). Показано, что данная резистентность обусловлена спонтанными мутациями, произошедшими в двух разных сайтах хлоропластного гена *rrn16*, кодирующего 16S рРНК. У шести линий произошла трансверсия G1012T или G1012C, в то время как у трех линий — транзиция A1138G. У одной линии причина возникновения устойчивости к спектиномицину не выяснена.

By biobalistic treatment of carrot calli (*Daucus carota* L) with the plasmid contained gene *aadA* (aminoglycoside-3'adenyltransferase) following selection on medium with spectinomycin (100–500 mg/l) 10 spectinomycin-resistant callus lines were obtained and analyzed. The resistance to antibiotic was conferred by spontaneous mutations localized at two different sites of chloroplast gene *rrn16* coding 16S ribosomal RNA. In 6 lines the translocation — G1012T or G1012C — was occurred whereas in 3 lines — transition A1138G was occurred. In one line the reason of spectinomycin-resistance was not ascertained.

**ФОМЕНКО Т.И., КУЗОВКОВА (ЛЕНЕЦ) А.А., БЕРДИЧЕВЕЦ Л.Г.,
РЕШЕТНИКОВ В.Н.**

ГНУ “Центральный ботанический сад НАН Беларуси”,
Беларусь, 220012, Минск, ул. Сурганова, 2В, e-mail: fioraia@nm.ru

ЭФФЕКТ РАЗНОУРОВНЕВОЙ ЭКСПРЕССИИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ β-1,4-ГЛЮКАНАЗЫ В ЛИСТОВЫХ ТКАНЯХ *NICOTIANA TABACUM* НА КАЛЛУСОГЕННУЮ АКТИВНОСТЬ И МОРФОГЕННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ

Благодаря использованию растений-мутантов и трансгенных растений, в последние 20 лет значительно продвинулось понимание механизмов различных физиологических процессов растений, например, фотосинтеза и индуцированной резистентности к патогенам [1]. Вместе с тем, на трансгенных растениях удобно исследовать и проблему влияния чужеродного гена как на генотип и фенотип растения в целом, так и на изменение экспрессии отдельных растительных генов. Подобные работы единичны и поэтому весьма актуальны. Трансгенные растения *Nicotiana tabacum*, экспрессирующие бактериальный ген *cel7*, явились удобной моделью не только для изучения механизмов устойчивости растений к грибам [2], но и влияния на трансген гетерологичного окружения. Целью наших исследований был анализ экспрессии бактериальной β-1,4-глюканазы в листовых тканях табака, а также оценка ее влияния на фитогормональный статус растения и, как следствие, на их каллусогенную активность и морфогенный потенциал. Каллусная ткань растений представляет собой совокупность недифференцированных клеток, которые в определенных условиях могут дать начало клонам дифференцированных клеток. Это означает, что клетки каллусной ткани являются носителями определенных эпигенетических изменений в геноме, отличных от таковых в дифференцированных клетках, и экспрессия трансгена в таких условиях может модифицироваться.

Материалы и методы

Объектами исследований являлись 3 линии трансгенных растений *Nicotiana tabacum*, экспрессирующие бактериальный модифицированный ген *cel7* из анаэробной грамположительной термофильной бактерии *Clostridium thermocellum*. Ген кодирует фермент β-1,4-эндоглюканазу. В растениях ре2 ген *cel7* контролируется слабым конститутивным промотором Tr2' гена нопалинсинтазы и сильным конститутивным промотором 35S вируса мозаики цветной капусты, а также последовательностью, кодирующей сигнальный пептид экстенсина моркови. В линии ре3 ген *cel7* обладает слабым конститутивным промотором Tr2' гена нопалинсинтазы и последовательностью, кодирующей сигнальный пептид экстенсина моркови. Растения ре4 несут ген *cel7* под слабым конститутивным промотором Tr2' гена нопалинсинтазы. Данные растения были получены к.б.н. Василевко В.Т. под руководством проф. Пирузян Э.С. на базе Института молекулярной генетики РАН (г. Москва) [2]. Растения *in vitro* выращивали на 1/2 среде Мурасиге — Скуга (МС) при температуре 22 °С, освещенности 4 тыс.лк. Световой день —