

## *Оригинальные работы*

УДК 577.21

Е.С. СЫТНИК, А.Ф. ПАРИЙ,  
И.К. КОМАРНИЦКИЙ, Ю.Ю. ГЛЕБА, Н.В. КУЧУК  
Институт клеточной биологии и генетической инженерии  
НАН Украины, Киев

### **АНАЛИЗ ЯДЕРНОГО И МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМОВ У ТРАНСПЛАСТОМНЫХ РАСТЕНИЙ *SALPIGLOSSIS SINUATA*, ПОЛУЧЕННЫХ ПУТЕМ ПЕРЕНОСА ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ПЛАСТИД ОТ ЦИБРИДА *N. TABACUM (+S. SINUATA)***



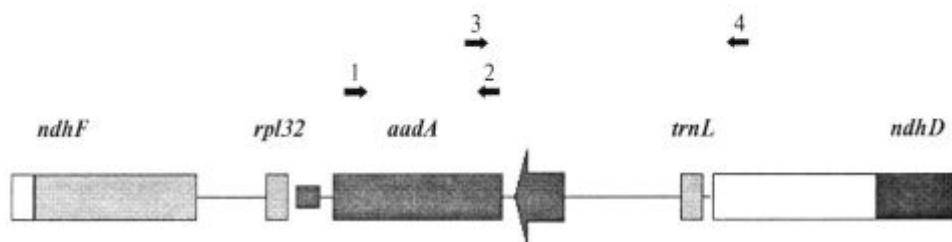
На примере представителя семейства пасленовых *Salpiglossis sinuata* предложен новый подход к созданию пластомных трансформантов. Ранее были получены трансформированные хлоропласты *Salpiglossis sinuata* у цибридных растений табака (*Nicotiana tabacum L.*), несущих пластом *S. sinuata*. Затем хлоропlastы *S. sinuata* со встроенным геном *aadA* и устойчивые к спектиномицину/стрептомицину переносили с помощью соматической гибридизации из облученных суперлетальными дозами радиации протопластов цибридных растений *N. tabacum (+ S. sinuata)* в протопласти *S. sinuata* дикого типа. В результате проведенных экспериментов были получены морфологически сходные с *S. sinuata* растения, устойчивые к спектиномицину/стрептомицину. Молекулярно-биологический анализ показал, что полученные растения содержат трансформированный пластом *S. sinuata*. Анализ теломерных и рибосомальных участков ядерной ДНК не выявил присутствия фрагментов, характерных для табака. Анализ митохондриальной ДНК показал отличие mtДНК полученных растений от обоих родителей.

© Е.С. СЫТНИК, А.Ф. ПАРИЙ, И.К. КОМАРНИЦКИЙ,  
Ю.Ю. ГЛЕБА, Н.В. КУЧУК, 2003

**Введение.** Генетическая трансформация пластомной ДНК привлекает к себе все возрастающее внимание исследователей. Это связано с рядом преимуществ введения чужеродной ДНК в пластом по сравнению с ядерной трансформацией (материнское наследование пластома уменьшает вероятность распространения трансгенов в окружающей среде, многокопийность генов позволяет получать большие количества продукта, полицистронный тип экспрессии дает возможность вводить несколько генов одновременно). В то же время пластомная трансформация намного менее эффективна, чем ядерная, и за исключением табака для нее все еще отсутствуют рутинные, воспроизводимые методики. На сегодняшний день получены хлоропластные трансформанты лишь для нескольких видов высших растений: *N. tabacum* [1], *A. thaliana* [2], *S. tuberosum* [3] и *L. esculentum* [4]. Поэтому существует необходимость создания новых подходов к осуществлению пластомной трансформации.

Успешное получение транспластомных растений связано с возможностями доставки ДНК в клетку и высокой частотой регенерации растений в условиях *in vitro*. Способность к регенерации является одним из наиболее ограничивающих факторов при работе со многими растительными видами, среди которых и большинство сельскохозяйственных. Предлагаемый в настоящей работе подход учитывает это и основывается на таких предпосылках: наличие относительно эффективной методики трансформации для табака, легкость работы с этим растением в культуре *in vitro* и возможность получения цибридных растений с ядром одного вида и цитоплазмой другого. Суть подхода заключается в трансформации хлоропластов интересующих видов растений, функционирующих на фоне ядра легко трансформирующегося вида. Затем трансформированный пластом может быть перенесен из цибридных растений либо в клетки того же вида, либо в другие совместимые виды.

В настоящей работе разрабатывалась модельная система нового подхода к созданию пластомных трансформантов ряда растений. В экспериментах использовались ранее полученные цибридные растения *N. tabacum (+S. sinuata)* [5]. Нами были получены транспластомные растения *N. tabacum (+ S. sinuata)*, несущие ген *aadA* (аминогликозид 3'-аденилинтрансфераза) [6]. Показан перенос трансформированных хлоропластов из цибридов в растения *S. sinuata* дикого



**Рис. 1.** Схема векторной конструкции, использованной для получения транспластомных растений *N. tabacum* (+ *S. sinuata*). Чёрными стрелками указаны расположения праймеров 1, 2, 3 и 4

типа и молекулярно-биологический анализ полученных растений.

**Материалы и методы. Растительный материал.** Цибридные растения *N. tabacum* (+*S. sinuata*) были любезно предоставлены проф. Медеши (Сегедский Биологический центр, Венгрия). Транспластомные формы цибридных растений, несущие ген устойчивости к спектиномицину (*aadA*), получены в Институте клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины. Используемая для генетической трансформации векторная конструкция содержала ген *aadA*, находящийся под контролем промотора 16S рДНК табака, и терминатор гена *rbcL* (большая субъединица РУБИСКО) из пластома *Chlamydomonas reinhardtii*. Селективный ген flankирован 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 (рис. 1).

Растения *S. sinuata* дикого типа и трансгенные растения *N. tabacum* (+*S. sinuata*) выращивали в стерильных условиях при 16-часовом световом дне на безгормональной среде MS [7], размножали черенкованием. Для экспериментов использовали растения 3–4-недельного возраста.

**Выделение протопластов, обработка полизтиленгликолем (ПЭГ) и культивирование клеток.** Для осуществления соматической гибридизации в качестве донорных использовали облученные клетки мезофилла листа транспластомных растений *N. tabacum* (+*S. sinuata*) (500–600 Гр, гамма-лучи, источник — Co<sup>60</sup>, 0,1 Гр/с). В качестве реципиента служили протопласти, выделенные из мезофилла листа растений *S. sinuata* дикого типа. Выделение протопластов проводили согласно методике, принятой в нашей лаборатории. Листья, нарезанные на 1–2 мм полоски перпендикулярно к срединной жилке, помещали на поверхность

ферментного раствора (0,7 % cellulase Onozuka R-10, 0,2 % Macerozyme R-10, 0,5 M раствор маннитола, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, стерилизовать фильтрованием) и инкубировали 12–16 ч в темноте. Протопласти, отделенные с помощью фильтрования через нейлоновый фильтр (диаметр пор 100–150 мкм) от непереваренных остатков листьев осаждали центрифугированием при 100–120 g в течение 7 мин. Осадок ресусцинировали в 0,5 M растворе сахарозы, сверху насыщали 2 мл раствора W5 (9 г NaCl, 18,4 г CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0,8 г KCl, 1 г глюкозы, растворенные в 1 л H<sub>2</sub>O; pH 5,7) и центрифугировали 10–15 мин при 150–190 g. Живые протопласти, образовавшие поясок между растворами сахарозы и W5, собирали и переносили в новые центрифужные пробирки, осаждали центрифугированием (120 g, 7 мин). Отбирали надосадочную жидкость, смешивали протопласти обоих партнеров приблизительно в соотношении 1:1, супензию распределяли каплями на дне пластиковых чашек Петри и проводили обработку ПЭГом, как описано ранее [8].

Клетки культивировали в среде KM8p [9] в течение 10–14 дней, затем разбавляли той же средой, но со сниженным осмотическим давлением (0,3 M глюкозы). Приблизительно через месяц культивирования в жидкой среде колонии переносили на твердую среду MS, дополненную 0,2 M маннитолом, 1 мг/л зеатина и 0,1 мг/л НУК. Последующие пересадки производили на ту же среду MS без маннитола каждые 4 нед до появления зеленых колоний или побегов. Селективные агенты добавляли, начиная со 2–3-й недели культивирования в количестве 100 мг/л спектиномицина, а затем увеличивали концентрацию до 150 мг/л спектиномицина и 150 мг/л стрептомицина.

**Выделение ДНК.** Тотальную растительную ДНК для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) получали следуя протоколу Cheung [10].

**Молекулярный анализ растений *S. sinuata*, полученных в результате соматической гибридизации.** Природу хлоропластной ДНК полученных растений изучали путем исследования рестриктных спектров амплифицированного с помощью ПЦР фрагмента хлоропластного генома. Анализировали участок, включающий гены *trnL* и *ndhD*. Для этого использовали 5'-GTAGACACGCT GCTCTTAGG-3' праймер, специфичный гену *trnL*, и 5'-CGCCAGATGTTCTATGGATAC-3', узвающий ген *ndhD*. Размер амплифицированного продукта должен составлять 1536 п.н. Реакцию проводили в амплификаторе «Терцик ИМ02» («ДНК-технология», Москва). Реакционная смесь содержала следующие количества необходимых для амплификации веществ: 10 mM Tris HCl, pH 9,0, 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 % Triton X-100, 0,1 мкМ каждого праймера, 200 мкМ каждого дезоксинуклеотидтрифосфата, 40 нг ДНК и 0,6 ед. Taq-полимеразы. Общий объем смеси был равен 30 мкл. Отжиг производили при температуре 60 °C в течение 1 мин, реакция синтеза длилась 1,5 мин при 72 °C. Амплифицированный фрагмент обрабатывали рестрикционной эндонуклеазой EcoR1. Продукты реакции разделяли с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле.

Для подтверждения присутствия последовательности чужеродной ДНК в анализируемых растениях использовали две пары праймеров. Праймеры 5'-CACTACATTTCGCTCATCGCC-3' (праймер 1) и 5'-TGCTGGCCGTACATTG TACG-3' (праймер 2) специфичны к внутренней части гена *aadA*. Размер амплифицированного с помощью этих праймеров продукта составлял 479 п.н. Необходимая для них температура отжига — 60 °C, длительность реакции синтеза фрагмента — 1 мин при 72 °C.

Праймеры 5'-GCCAGCAACGTCGGTTCG-3' (праймер 3) и 5'-CGATCGAAAAGGAAATGT GAG-3' (праймер 4) использовали для определения правильного места встраивания чужеродной ДНК. Праймер 3 специчен гену *aadA*, а праймер 4 — высококонсервативному участку пластидной ДНК. Длительность и температура реакции отжига составляли 1 мин и 60 °C. Фрагмент синтезировался 2 мин при 72 °C, и его размер составил 1189 п.н.

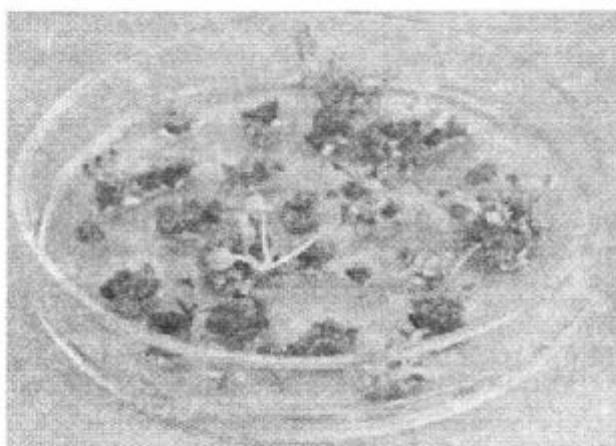
**Анализ митохондриальной ДНК транспластомных растений *S. sinuata*.** Происхождение митохондриальной ДНК растений *S. sinuata* исследовали с помощью анализа рестриктных спектров мито-

хондриальных генов *ndh1*, *ndh4*, *ndh5* и *ndh7*. Для ПЦР амплификации фрагментов этих генов использовали соответственно такие пары праймеров: 5'-GCATTACGATCTGCAGCTCA-3' и 5'-GGAGCTCGATTAGTTCTGC-3' — для *ndh1* (отжиг при 60 °C в течение 1 мин, синтез фрагмента при 72 °C, 2 мин); 5'-CAGTGGGTTGG TCTGGTATG-3' и 5'-TCATATGGGCTACTG AGGAG-3' — для *ndh4* (отжиг при 55 °C в течение 1 мин, синтез фрагмента при 72 °C, 3 мин); 5'-TTTTTCGGACGTTTCTAG-3' и 5'-TTTGG CCAAGTATCCTACAA-3' — для *ndh5* (отжиг при 55 °C в течение 1 мин, синтез фрагмента при 72 °C, 3 мин); 5'-GCTTTACCTTATTCTGATCG-3' и 5'-TGTTCTGGGCCATCATAGA-3' — для *ndh7* (отжиг при 55 °C в течение 1 мин, синтез фрагмента при 72 °C, 2 мин).

Амплифицированный фрагмент гена *ndh1* обрабатывали рестрикционными эндонуклеазами *Msp*1, *Rsa*1, *Eco*R1, *Bam*H1 и *Hind*III; гена *ndh4* — *Msp*1, *Rsa*1, *Dra*1, *Ssp*1; гена *ndh7* — *Mae*III, *Mso*1, *Bam*H1, *Hind*III, *Dra*1; гена *ndh5* — *Eco*R1, *Dra*1, *Ssp*1.

**ПЦР анализ ядерной ДНК транспластомных растений *S. sinuata*.** Анализ выполнен с рядом праймеров, специфичных к различным областям ядерного генома: 1) с помощью двух 5'-TTTAGG GTTTAGGGTTAGGG-3' праймеров получали набор фрагментов теломерных повторностей; 2) сравнивали спектр фрагментов амплифицирующихся с использованием двух 5'-TCCTCCCTCC TCCTCC-3' праймеров; 3) анализировали фрагмент гена 5S rPHK, используемые праймеры — 5'-GGATGGGTGACCTCCC GGGAAGTCC-3' и 5'-CGCTTAACTGCGGAGTTCTGATGGG-3'; 4) проводили анализ рестриктных спектров участка внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS — internal transcribed spacer) ядерной рибосомальной ДНК, амплифицированного с помощью праймеров 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAGG-3' и 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'. Фрагменты обрабатывались рестрикционной эндонуклеазой *Dra*1.

**Результаты исследований и их обсуждение.** Полученные ранее транспластомные растения *N. tabacum* (+*S. sinuata*) были вовлечены в эксперименты по соматической гибридизации с растениями *S. sinuata* дикого типа. Ядра *N. tabacum* инактивировались облучением, а регенерацию побегов растений *S. sinuata* дикого типа останавливали действием антибиотиков. Таким обра-

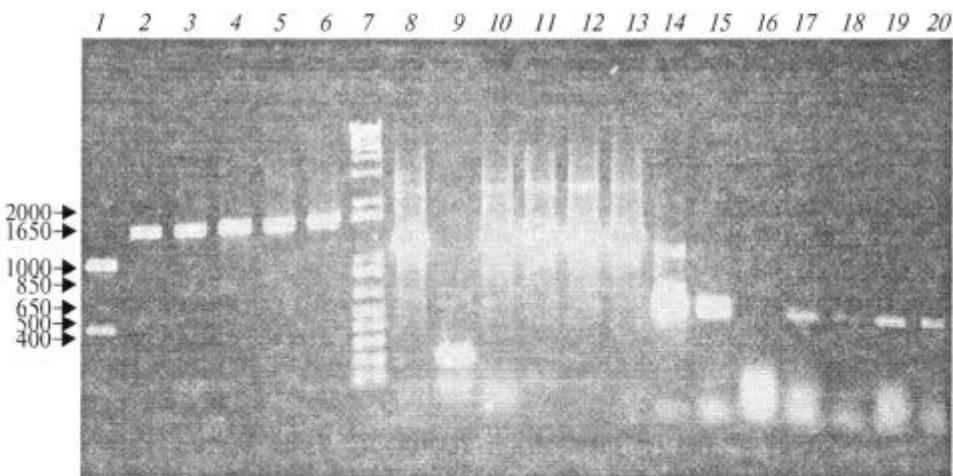


**Рис. 2.** Регенерация на селективной среде клонов, полученных после соматической гибридизации транспластомных цибридов *N. tabacum* (+ *S. sinuata*) и растений *S. sinuata* дикого типа

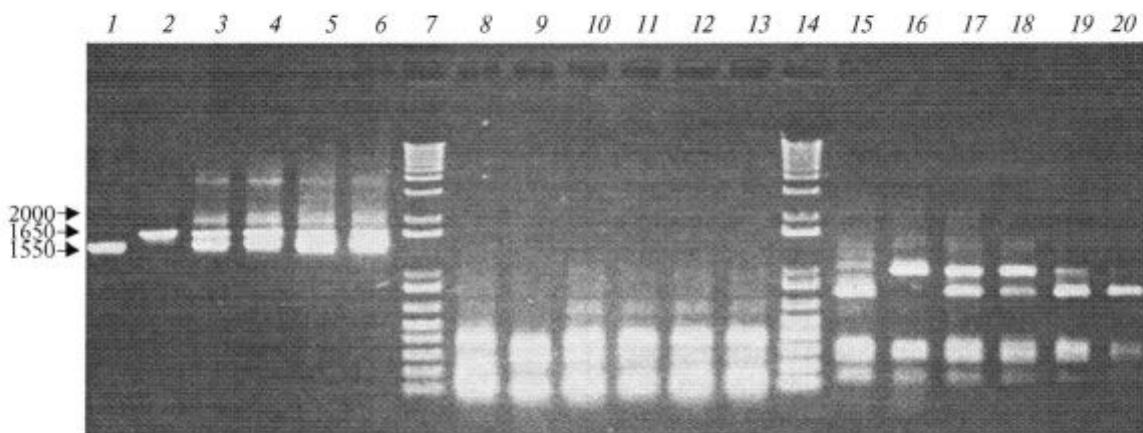
зом, все отобранные зеленые регенеранты предположительно должны были быть растениями *S. sinuata*, несущими трансформированный пластом с геном *aadA*, либо асимметричными гибридами, содержащими часть ядерного материала *N. tabacum*. Успешную регенерацию растений *S. sinuata* можно получить, используя фитогормон зеатин (рис. 2), тогда как применение БАП приводит к

появлению очень большого количества обводненных побегов. Для дальнейшей работы сохранили 10 наиболее хорошо растущих линий. Морфологически все они сходны с растениями *S. sinuata* дикого типа, normally растут и развиваются на селективной среде с концентрациями антибиотиков по 100 мг/л каждого, хотя наблюдается замедленный темп роста по сравнению с развитием на среде без селективного давления. Более высокая концентрация селективных агентов приводила к сильной задержке роста и различным нарушениям морфологии.

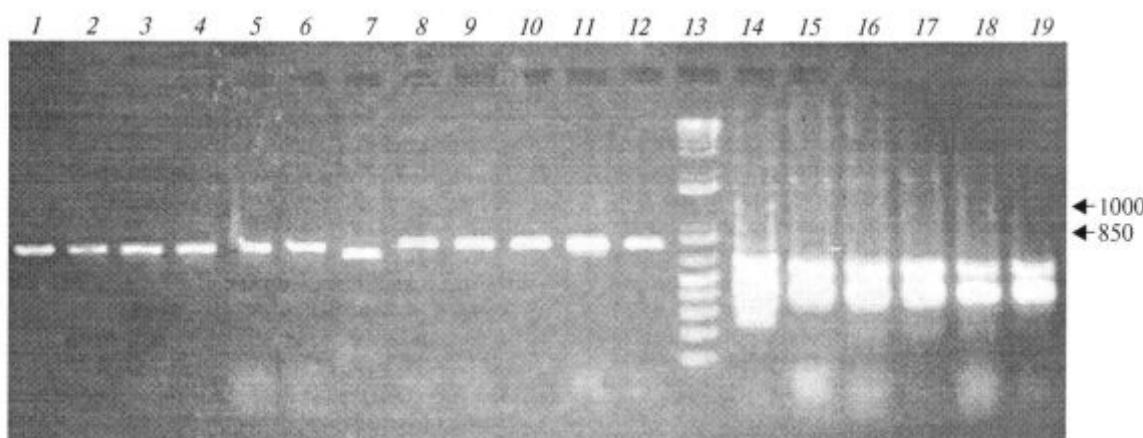
У четырех из отобранных десяти растений был проведен анализ ядерной, хлоропластной и митохондриальной ДНК. ПЦР анализ подтвердил присутствие трансформированного пластома *S. sinuata* у полученных растений (рис. 3). Рестриктные спектры участка митохондриального гена *ndhI* отличались от обоих родителей, что, возможно, объясняется наличием в транспластомных растениях рестриктных фрагментов mtДНК, схожих с соответствующим показателем как у *N. tabacum*, так и у *S. sinuata* (рис. 4). ПЦР и рестриктный анализ нескольких областей ядерного генома не дал фрагментов, характерных для *N. tabacum*; присутствовали только полосы, идентичные поло-



**Рис. 3.** Молекулярный анализ хлоропластной ДНК растений *S. sinuata*, полученных в результате соматической гибридизации: 1–6 – фрагмент между хлоропластными генами *trnL* и *ndhD*, амплифицированный с помощью ПЦР и обработанный рестрикционной эндонуклеазой *EcoRI*. Размер необработанного фрагмента, посчитанный для хлоропластной ДНК табака, равен 1536 п.н.; 7 – 1 Kb Plus DNA Ladder (Gibco); 8–13 – фрагмент, амплифицированный с использованием праймеров 3 (специфичный к гену *aadA*) и 4 (специфичный к участку хлоропластного генома). Размер фрагмента, посчитанный для хлоропластной ДНК табака, равен 1189 п.н. 14–20 – фрагмент, амплифицированный с использованием праймеров, специфичных к гену *aadA* (праймеры 1 и 2). Размер фрагмента – 479 п.н. 1 – *N. tabacum*; 2, 9, 16 – *S. sinuata*, дикий тип; 3, 10, 17 – *S. sinuata*, клон 1; 4, 11, 18 – *S. sinuata*, клон 2; 5, 12, 19 – *S. sinuata*, клон 3; 6, 13, 20 – *S. sinuata*, клон 4; 8, 15 – транспластомный цибрид *N. tabacum* (+*S. sinuata*); 14 – позитивный контроль, плазмида



**Рис. 4.** Анализ рестриктных спектров митохондриального гена *ndh1* у транспластомных растений *S. sinuata*: 1–6 — контроль, не обработанный рестриктазой фрагмент гена *ndh1*, полученный в результате ПЦР. Размер фрагмента, посчитанный для ДНК табака, равен 1550 п.н.; 8–13 — амплифицированный фрагмент гена *ndh1*, обработанный рестрикционной эндонуклеазой *MspI*; 15–20 — амплифицированный фрагмент гена *ndh1*, обработанный рестрикционной эндонуклеазой *RsaI*; 1, 8, 15 — *N. tabacum*; 2, 9, 16 — *S. sinuata*, дикий тип; 3, 10, 17 — *S. sinuata*, клон 1; 4, 11, 18 — *S. sinuata*, клон 2; 5, 12, 19 — *S. sinuata*, клон 3; 6, 13, 20 — *S. sinuata*, клон 4; 7, 14 — 1 Kb Plus DNA Ladder (Gibco)



**Рис. 5.** Анализ ядерной ДНК транспластомных растений *S. sinuata*: 1–6 — контроль, не обработанный рестриктазой, амплифицированный с помощью ПЦР фрагмент внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS — internal transcribed spacer) ядерной рибосомальной ДНК. Размер амплифицированного продукта 644 п.н.; 7–12 — амплифицированный фрагмент внутреннего транскрибируемого спейсера, обработанный рестрикционной эндонуклеазой *DraI*; 14–19 — набор фрагментов, амплифицированных с использованием двух праймеров 5'-TCCTCCTCCTCC-3'. 1, 7, 14 — *N. tabacum*; 2, 8, 15 — *S. sinuata*, дикий тип; 3, 9, 16 — *S. sinuata*, клон 1; 4, 10, 17 — *S. sinuata*, клон 2; 5, 11, 18 — *S. sinuata*, клон 3; 6, 12, 19 — *S. sinuata*, клон 4; 13 — 1 Kb Plus DNA Ladder (Gibco)

сам у *S. sinuata* (рис. 5). Анализы теломерных последовательностей и участка гена 5S rPHK не представлены.

Также был проведен цитогенетический анализ полученных растений (данные не представлены). Дикий кариотип *S. sinuata* содержит  $2n = 44$  хромосомы [5]. В изучавшихся клетках содержался околодиплоидный набор хромосом *S. sinuata*. Общее количество хромосом составляло 44–50. Однозначного вывода о присутствии (отсутствии)

ядерного генетического материала *N. tabacum* в полученных транспластомных растениях *S. sinuata* на основании проведенного исследования сделать нельзя.

Сопоставление данных всех анализов (ПЦР анализ участков ядерной ДНК, подсчет хромосом, сравнение рестриктных спектров митохондриальных генов) позволяет утверждать с большой долей вероятности, что полученные транспластомные растения являются *S. sinuata* по ядерному и хло-

ропластному геному и имеют измененный митохондриом.

Как уже было сказано, существующие методы пластомной трансформации недостаточно эффективны и воспроизводимы. Мы предлагаем новый подход, позволяющий уменьшить некоторые ограничения в получении транспластомных растений, которые связаны с низкой эффективностью регенерации и трансформации. В настоящей работе описано применение этого подхода на примере дикого представителя семейства пасленовых растения *S. sinuata*. В дальнейшем планируется использовать предложенный метод для получения транспластомных растений важных сельскохозяйственных видов. Кроме того, создание транспластомных цибридных растений и перенос трансформированных пластид в различные отдаленные виды с помощью методов соматической гибридизации позволит изучать ядерно-цитоплазматические взаимоотношения и находить совместимые комбинации ядер и пластид различных видов.

**SUMMARY.** New model system of plastid transformation has been proposed using a wild representative of Solanaceae family — *S. sinuata*. Earlier obtained cybrid plants *N. tabacum* (+ *S. sinuata*) were used for transformation experiments by PEG treatment of protoplasts with *aadA* gene that confers resistance to spectinomycin. Transformed *S. sinuata* plastome was transferred from *N. tabacum* (+ *S. sinuata*) cybrid to *S. sinuata* wild type plants by somatic hybridization. Molecular analysis of nuclear and mitochondrial DNA has been performed.

**РЕЗЮМЕ.** На прикладі дикого представника родини Solanaceae рослини *S. sinuata* розробляється новий ефективний підхід до створення пластомних трансформантів. На першому етапі роботи за допомогою методу обробки протопластів поліетиленгліколем в хлоропласти раніше отриманих цибридних рослин *N. tabacum* (+ *S. sinuata*) уводили ген стійкості до спектиноміцину (*aadA*). Після

цього трансгенні хлоропласти *S. sinuata* переносили з цибридних рослин *N. tabacum* (+ *S. sinuata*) в рослини *S. sinuata* дикого типу. Був проведений молекулярний аналіз ядерної та мітохондріальної ДНК отриманих рослин.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Svab Z., Harper E.C., Jones J.D.G., Maliga P. Aminoglycoside-3'-adenylyltransferase confers resistance to spectinomycin and streptomycin in *Nicotiana tabacum* // Plant Mol. Biol. — 1990. — 14. — P. 197–205.
2. Sidkar S.R., Serino G., Chaudhuri S., Maliga P. Plastid transformation in *Arabidopsis thaliana* // Plant Cell Rep. — 1998. — 18. — P. 20–24.
3. Sidorov V.A., Kasten D., Pang S.Z., Hajdukiewicz P.T.J., Stab J.M., Nehra N.S. Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker // Plant. — 1999. — 19. — P. 209–216.
4. Ruf S., Hermann M., Bergers I., Carrer H., Bock R. Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit // Nature Biotech. — 2001. — 19. — P. 870–875.
5. Thanh N.D., Pay A., Smith M.A., Medgyesy P., Marton L. Intertribal chloroplast transfer by protoplast fusion between *Nicotiana tabacum* and *Salpiglossis sinuata* // Mol. Gen. Genet. — 1988. — 213. — P. 186–190.
6. Ситник К.С., Кучук М.В. Отримання транспластомних рослин *S. sinuata* // Вісн. Нau. аграр. ун-ту (подано до друку).
7. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Phys. Plant. — 1962. — 15. — P. 191–195.
8. Menczel L., Nagy F., Kiss Z.R., Maliga P. Streptomycin resistant and sensitive somatic hybrids of *Nicotiana tabacum* + *Nicotiana knightiana*: correlation of resistance to *N. tabacum* plastids // Theor. and Appl. Genet. — 1981. — 59. — P. 191–195.
9. Kao K.N., Michayluk M.R. Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media // Planta. — 1975. — 126. — P. 105–110.
10. Cheung W.Y., Hubert N., Landry B.S. A simple and rapid DNA microextraction method for plant, animal and insect suitable for RAPD and other PCR analyses // PCR Meths. Appl. — 1993. — 3. — P. 69–70.

Поступила 10.07.03