

УДК 577.21:582.926.2

Н.Л. ЩЕРБАК, В.Б. БЕЛОКУРОВА,
И.К. КОМАРНИЦКИЙ, Н.В. КУЧУК

Институт клеточной биологии
и генетической инженерии НАН Украины, Киев

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ РАСТЕНИЙ *NICOTIANA AFRICANA* MERXM. ПЛАЗМИДАМИ, СОДЕРЖАЩИМИ САЙТЫ РЕКОМБИНАЦИИ *lox*



Предложена эффективная методика генетической трансформации африканского табака *Nicotiana africana* Merxm., вида, который представляет интерес для исследователей как источник цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС) и кодируемой ядром устойчивости к Y-вирусу картофеля, а также как возможный модельный объект. Методами прямой (бомбардировка золотыми частицами) и агробактериальной трансформации получены растения африканского табака *N. africana*, трансформированные плазмидами, которые содержат кодирующую область *bar*-гена без промотора и независимый 35S промотор между *lox*-сайтами системы рекомбинации бактериофага P1 (*lox-bar-35S-lox*), а также ген неомицинфосфотрансферазы II (*prtII*) под контролем *pos* промотора. Трансформированные растения были отобраны по способности расти на селективной среде, содержащей 50 мг/л канамицина. Наличие генов *prtII* и *bar* в геноме трансгенных растений подтверждено с помощью ПЦР анализа. Проведен сравнительный анализ эффективности различных методов трансформации данного объекта.

© Н.Л. ЩЕРБАК, В.Б. БЕЛОКУРОВА,
И.К. КОМАРНИЦКИЙ, Н.В. КУЧУК, 2004

Введение. Представители рода *Nicotiana* широко используются в биотехнологии не только благодаря важным хозяйственным признакам, но и в качестве удобных модельных объектов. Поиск новых возможностей для совершенствования культурных сортов — одна из основных задач генетической инженерии. Поэтому изучение новых видов находит практическое применение, а также является результативным для фундаментальных исследований по изучению генетических особенностей представителей рода *Nicotiana*.

Африканский табак, *Nicotiana africana* Merxm., сравнительно недавно описанный вид [1], единственный известный на сегодняшний день представитель рода *Nicotiana*, обнаруженный в Африке. Систематическое положение этого вида окончательно не выяснено, но предположительно его относят к секции *Sua-veolentes* [2]. Известно, что совмещение цитоплазмы растений этой секции с ядром *N. tabacum* часто приводит к возникновению растений с цитоплазматической мужской стерильностью (ЦМС) [3]. При гибридизации с *N. tabacum* растений *N. africana* также были получены ЦМС растения [4, 5]. Тестирование *N. africana* на устойчивость к возбудителям различных заболеваний у *Solenaceae* показало, что этот вид обладает кодируемой ядром устойчивостью к Y-вирусу картофеля и только в незначительной степени поражается вирусом табачной мозаики (ВТМ) [6]. Эти данные позволяют рассматривать *N. africana* как возможного кандидата для включения в биотехнологические программы по переносу ценных признаков в культурные сорта. Опубликованы работы по регенерации растений *N. africana* из различных эксплантов [7] и протопластов [8]. В то же время нет работ по генетической трансформации *N. africana*, тогда как указанный метод расширяет возможности использования этого малоизученного вида в биотехнологии.

Использование генетических конструкций, содержащих последовательности сайт-специфической системы рекомбинации, позволяет осуществлять перестройки генетического материала трансформированных растений, т.е. производить сайт-специфическую интеграцию [9], контролировать экспрессию генов путем делеции или инверсии сегментов ДНК [10], а также индуцировать хромосомные транслокации [11]. Способность Cre-рекомбиназы ката-

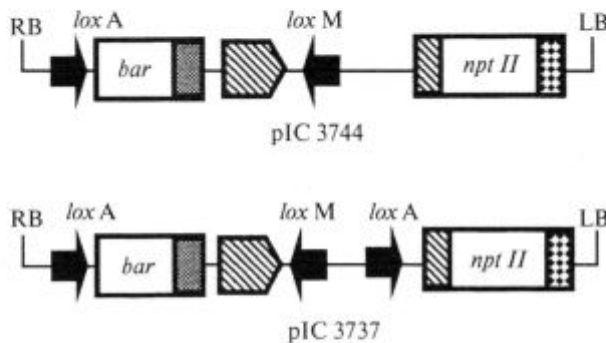


Рис. 1. Схема плазмидных векторов pICH3737 и pICH3744: [затененный квадрат] — 35S промотор; [штрихованный квадрат] — nos промотор; [штрихованный квадрат] — nos терминатор; [затененный квадрат] — ocs терминатор; [треугольник] — lox-сайт

лизировать вырезание участка ДНК между одинаково ориентированными lox-сайтами используется для удаления селективных маркерных генов из генома трансгенных растений [12]. Целью настоящей работы было разработать методы эффективной трансформации *N. africana*, а также получить трансгенные растения *N. africana*, содержащие lox-сайты.

Материалы и методы. *Растительный материал.* Семена *N. africana* были предоставлены Банком зародышевой плазмы растений мировой флоры Института клеточной биологии и генетической инженерии. Стерилизация семян включала погружение в диацид на 7 мин и дальнейшую многократную отмывку стерильной дистиллированной водой. Асептические семена проращивали при 24 °C и 16-часовом фотопериоде на безгормональной среде Мурасиге и Скуга (MS) [13], дополненной сахарозой в концентрации 25 мг/л.

Методы регенерации. Для регенерации растений из листьев и междоузлий использовали методики, предложенные Белокуровой [7]. Методика регенерации растений из корней *N. africana* описана в разделе «Агробактериальная трансформация».

Плазмиды и бактериальный штамм. Для трансформации использовали плазмиды pICH3744 и pICH3737. Плазмида pICH3744 содержит кодирующую последовательность гена устойчивости к фосфинотрицину (*bar*-гена) без промотора и независимый 35S промотор между двумя инвертированными lox-сайтами дикого (*lox A*) и мутированного (*lox M*) типа (*lox A-bar-*

35S-*lox M*), а также ген неомицинфосфотрансферазы II (*nptII*) под контролем *nos* промотора. Различие между этими двумя векторами состоит в том, что pICH3737 содержит дополнительный lox A сайт, находящийся в прямой ориентации по отношению к другому lox A сайту (рис. 1).

Ночную культуру *Agrobacterium tumefaciens* (штамм GV3101) наращивали в 20 мл жидкой среды LB [14], дополненной 50 мг/л карбенициллина и 100 мг/л рифампицина, в течение 48 ч при 24 °C в темноте. Агробактериальную суспензию (5 мл) осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 4000 об/мин. Осадок ресуспендировали в 20 мл жидкой среды MS, содержащей 0,2 мМ ацетосирингон. Полученную суспензию инкубировали 2–3 ч в тех же условиях и затем проводили сокультивацию растительных эксплантов с агробактерией.

Агробактериальная трансформация. Для агробактериальной трансформации использовали корни, листья и междоузлия асептических растений. Корни предварительно инкубировали в течение 3–4 дней на среде для индукции каллуса MS4 (среда MS, дополненная 25 мг/л сахарозы, 2 мг/л 2,4-Д, 1 мг/л НУК, 0,1 мг/л БАП, 0,1 мг/л кинетина). Экспланты помещали в агробактериальную суспензию и инкубировали в течение 0,5–1 ч. Затем экспланты переносили на агаризованную среду MS4 и проводили дополнительное сокультивирование в течение 48–72 ч в темноте при 24 °C. После сокультивирования экспланты отмывали в стерильной дистиллированной воде. Затем корни инкубировали 10–14 дней (до визуализации каллусных тканей в местах поранения корней) на среде MS4, содержащей 500 мг/л цефотаксима. Корневые экспланты с зачатками каллуса переносили на среду для регенерации MSZ (среда MS, дополненная 25 мг/л сахарозы, 40 мг/л аденина, 0,04 мг/л НУК, 1 мг/л зеатина, 0,02 мг/л гибберелловой кислоты), содержащую 50 мг/л канамицина в качестве селективного агента. Междоузлия и листовые экспланты после сокультивирования с агробактерией сразу помещали на среду для регенерации. Среда, содержащая 1 мг/л БАП и 0,1 мг/л НУК, была более эффективной для регенерации растений из листовых эксплантов [7], чем среды с другими комбинациями регуляторов роста. Для междо-

узлий использовали регенерационную среду, содержащую в качестве регуляторов роста 1 мг/л зеатина и 0,5 мг/л НУК. Полученные побеги были перенесены на селективную безгормональную среду MS для укоренения.

Прямая трансформация. Было проведено два эксперимента по прямой трансформации *N. africana* плазмидами pICH3744 и pICH3737, в которых были использованы листья асептически выращенных двухмесячных растений. Выделение плазмиды, приготовление частиц золота и преципитацию плазмидной ДНК проводили согласно стандартным методикам [15]. Для обстрела листья были помещены в чашку Петри на среду MSR (среда MS, дополненная 1 мг/л БАП и 0,1 мг/л НУК). В каждом эксперименте использовали 32 листа. После обстрела листья инкубировали на этой же среде в течение 2 дней, а затем они были нарезаны на сегменты и помещены на среду для регенерации, содержащую селективный антибиотик канамицин в концентрации 50 мг/л. Укоренение регенерантов проводили так же, как и в случае агробактериальной трансформации.

Анализ с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Интеграцию чужеродных генов в растительный геном определяли с помощью ПЦР. Согласно методике, предложенной Cheung et al. [16], проводили выделение ДНК из листьев растений, укоренившихся на селективной среде. Для реакции использовали 40 нг ДНК из каждого образца, 0,5 мкМ каждого из праймеров, 0,8 мкМ трифосфатов, 1 ед. Taq ДНК-полимеразы, 1 × ПЦР реакционного буфера, содержащего 50 мМ KCl, 10 мМ Tris-HCl (pH 9 при 25 °C), 0,1 % Triton X-100 и 0,2 мкМ MgCl₂. Общий объем смеси составил 20 мкл. Для амплификации гена *nptII* использовали праймеры 5'-GAGGCTATTCGGCTATGACTG-3' и 5'-CAAGCTCTTCAGCAATATCACG-3', амплифицирующие фрагмент величиной 640 пн [17]. Для амплификации *bar*-гена использовали праймеры 5'-CCGTACCGAGCCGAGGAAC-3' и 5'-CAGATCTCGGTGACGGGCAGGAC-3', амплифицирующие фрагмент величиной 445 пн. Изолированная ДНК из нетрансформированных растений (отрицательный контроль) и 1 нг плазмидного вектора pICH 3737 (положительный контроль) были амплифицированы с теми же праймерами и при тех же условиях.

Реакцию проводили в амплификаторе «Терцик ИМ02» (фирма «ДНК-технология», Москва). Использовали следующие профили: 94 °C, 1 мин; 55 °C, 1 мин; 72 °C, 1 мин; 33 цикла; в заключение 72 °C, 8 мин для *nptII* гена; 94 °C, 1 мин; 65 °C, 72 °C, 1 мин; 33 цикла; в заключение 72 °C, 8 мин для *bar*-гена. После этого продукты ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле в Tris-фосфатной буферной системе.

Результаты исследований и их обсуждение. Для трансформации растений *N. africana* было использовано несколько методик, каждая из которых позволила получить трансгенные растения, но с разной эффективностью. Эффективность трансформации оценивали как число полученных трансформантов к общему числу растений-регенерантов в эксперименте. Общие результаты трансформации *N. africana* представлены в таблице.

Так, метод агробактериальной трансформации листовых дисков, который обычно используется для трансформации пасленовых, например, *N. tabacum*, *Petunia hybrida* [18], *Lycopersicon esculentum* [19], оказался неэффек-

Эффективность получения трансгенных растений у *N. africana* с помощью различных методов

Метод трансформации и тип эксплантов	Количество			Эффективность трансформации*, %
	экспериментов	регенерантов	трансформированных растений	
Плазмида pICH3744				
Агробактериальная				
листовые диски	13	94	2	2,2
корни	1	65	37	57,0
междоузлия	10	107	3	17,6
Прямая				
листовые диски	1	6	4	66,6
Плазмида pICH3737				
Агробактериальная				
листовые диски	9	48	1	2,1
корни	2	138	73	52,9
Прямая				
листовые диски	1	13	8	61,5

* Оценивали как отношение числа полученных трансформантов к общему числу растений-регенерантов в эксперименте.

тивным для трансформации *N. africana*. Принято считать, что возможность использования этого метода зависит, в числе прочих факторов, от способности эффективно регенерировать побеги из листовых пластинок. Но в нашем случае хотя и были подобраны среды для регенерации растений из листовых эксплантов и междоузлий [7], использование листовых эксплантов в экспериментах по агробактериальной трансформации *N. africana* оказалось неэффективным. Так, после инкубации с *A. tumefaciens* листовых дисков было отобрано 142 зеленых побега, регенерировавших на селективной среде. Однако среди них было выявлено только три трансформанта. При использовании междоузлий в качестве эксплантов эффектив-

ность трансформации была выше и составила 17,6 %.

Более эффективным с точки зрения соотношения регенерация/трансформация был метод прямой трансформации. Через 2 мес после обстрела приблизительно половина эксплантов погибли, а на оставшихся эксплантах сформировались центры регенерации, в которых на протяжении 2–3 мес формировались побеги (рис. 2). Было проведено по одному эксперименту для каждой из плазмид, при этом в одном из них 61,5 %, а в другом 66,6 % регенерантов оказались трансформантами. Однако число регенерантов в этих экспериментах было очень незначительным. Кроме этого, необходимо учитывать, что в экспериментах по прямой трансформации гибнут около 50 % эксплантов. Следовательно, даже при высокой эффективности трансформации число трансформантов, полученных в эксперименте, невелико.

У некоторых видов, таких как *Arabidopsis thaliana*, корни являются более чувствительной культурой для генетической трансформации [20]. Использование корней *N. africana* в качестве эксплантов для агробактериальной трансформации также оказалось эффективным. В этих экспериментах регенерация трансформированных растений проходила через стадию каллуса. При инкубировании корней на среде MS4 было отмечено образование белого каллуса в местах поранения корней. При последующем перенесении этого каллуса на



Рис. 2. Регенерация на селективной среде (канамицин 50 мг/л) растений *N. africana* из листового экспланта после прямой трансформации. Масштабный отрезок 10 мм



Рис. 3. Регенерация растений *N. africana* из трансформированных агробактерией корневых эксплантов: а — образование каллуса на селективной среде через 2 мес после трансформации; б — регенерация растений *N. africana* на селективной среде (канамицин 50 мг/л) из трансформированного каллуса через 4 мес после трансформации. Масштабный отрезок 10 мм

среду для регенерации, содержащую селективный антибиотик, каллус продолжал расти и через 2–3 нед приобретал зеленый цвет. Спустя 4–5 мес после трансформации каллус был покрыт побегами (рис. 3). В результате сокультивирования корней *N. africana* с агробактерией, содержащей плазмиду pICH 3737, было получено 138 регенерантов, из которых 73 укоренились на безгормональной среде MS, дополненной 50 мг/л канамицина. В экспериментах с плазмидой pICH 3744 было получено 65 регенерантов, и укоренилось на селективной среде 37 растений. При сравнении различных методов получения трансгенных растений *N. africana* наибольшее число трансформантов было получено при использовании корней *N. africana* в качестве эксплантов, так как высокая регенерационная способность эксплантов сочетается с высокой эффективностью трансформации (57 и 52,9 %) (таблица).

Полученные растения были проанализированы с помощью ПЦР анализа, который подтвердил наличие генов *bar* и *nptII* в геномах проанализированных растений (рис. 4). В полученных трансгенных растениях *bar*-ген неактивен, так как не имеет промотора. Однако при культивировании трансгенных растений в условиях селективного давления фосфинотрицина (концентрация в среде 5 мг/л) часть растений оказалась устойчивой. Возможно, это объясняется тем, что в конструкции, которая была использована для трансформации, *bar*-ген расположен возле правого бордера Т-района. В работе Koncz et al. [21] по изучению случайного транскрипционного слияния репортерного гена *aph* (3)II в растениях *Arabidopsis thaliana* и табака были использованы конструкции, в которых репортерный ген без промотора находился возле правого бордера. Экспрессию этого гена наблюдали у 25 % трансформантов.

Для наших дальнейших экспериментов было отобрано 10 клонов (7 клонов, трансформированных плазмидой pICH3737, и 3 клон плазмидой pICH3744), чувствительных к фосфинотрицину, в которых наличие *bar*-гена было подтверждено ПЦР анализом. Полученные растения могут быть использованы в дальнейших экспериментах по гибридизации этих растений с трансгенными растениями *N. tabacum* и *Solanum tuberosum* (неопубликованные дан-

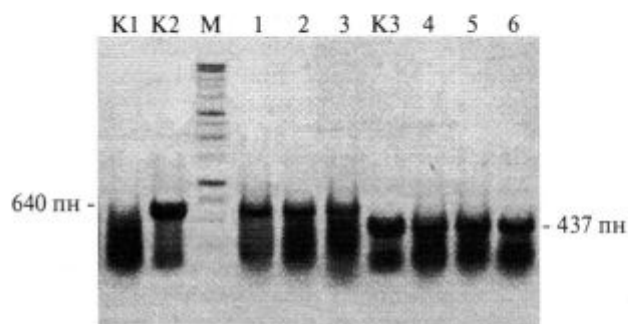


Рис. 4. Результаты ПЦР анализа тотальной ДНК трансгенных растений *N. africana* с использованием праймеров для *bar* и *nptII* генов: М — маркер 1 kb Plus DNA Ladder (Gibco BRL); K1 — отрицательный контроль ДНК нетрансформированного растения *N. africana*; K2 — положительный контроль для *bar*-гена, плазмидный вектор pICH3737; K3 — положительный контроль для *nptII* гена, плазмидный вектор pICH3737; 1–6 — ДНК трех различных растений-регенерантов *N. africana*, устойчивых к канамицину

ные), экспрессирующими ген Cre-рекомбиназы и также содержащими *lox*-сайты. Таким образом, мы предполагаем индуцировать рекомбинацию между *lox*-сайтами, расположенными на хромосомах растений разных видов. Наличие одинаково ориентированных и инвертированных *lox*-сайтов в геноме этих растений дает возможность прохождения рекомбинации несколькими способами. В результате прохождения рекомбинации *bar*-ген попадает под контроль промотора, что позволит в дальнейших экспериментах по гибридизации отбирать растения, в которых произошла рекомбинация, по устойчивости к фосфинотрицину.

SUMMARY. An efficient genetic transformation method for african tobacco *Nicotiana africana* Merxm. has been established. African tobacco is a valuable source for cytoplasmic male sterility (CMS) and nuclear encoded resistance to potato virus Y (PVY). *N. africana* transgenic plants have been obtained using both *Agrobacterium*-mediated and direct transformation of leaf explants with gold particle bombardment using particle inflow gun. Plasmid vectors containing phosphinothricin resistance gene (*bar* gene) coding region without promoter and independent 35S promoter between *lox* sites (*lox-bar-35S-lox*) and *nptII* gene were used. Transgenic plants were selected according to growth capacity on the selective medium containing 50 mg/l kanamycin. PCR analyses of kanamycin-resistant plants confirmed the presence of *nptII* and *bar* genes in their genome. *Agrobacterium*-mediated transformation of root explants has proved to be the most efficient transformation method for *N. africana*.

РЕЗЮМЕ. Запропоновано ефективну методику генетичної трансформації африканського тютюну *Nicotiana africana* Merxm., виду, який є цікавим для дослідників як донор цитоплазматичної чоловічої стерильності (ЦЧС) та стійкості до Y-вірусу картоплі, що кодується ядром, а також як можливий модельний об'єкт. Методами прямої (бомбардування золотими частинками) та агробактеріальної трансформації отримано рослини африканського тютюну *N. africana*, трансформовані плазмідами, що містять кодуєчу ділянку *bar*-гена без промотора і незалежний 35S промотор, між *lox*-сайтами системи рекомбінації бактеріофага P1 (*lox-bar-35S-lox*), та ген неоміцинофосфотрансферази II (*nptII*), під контролем *pos* промотора. Трансформовані рослини були відібрані за здатністю рости на поживному середовищі, що містить 50 мг/л канаміцину. Наявність генів *nptII* та *bar* у геномі трансгенних рослин підтверджено ПЛР аналізом. Проведено порівняльний аналіз ефективності різних методів генетичної трансформації *N. africana*. Найбільш ефективним виявився метод агробактеріальної трансформації кореневих експлантів.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Merxmuller H., Buttler K.P. *Nicotiana* in der africanischen Namib — ein pflanzengeographisches und phylogenetisches ratsel // Mitt. Bot. Munchen. — 1975. — 12. — P. 91–104.
2. *Nicotiana* / Ed. R.D. Durbin : Procedures for Experimental Use. Technical Bulletin 1586. — U.S., Department of Agriculture, 1979. — 124 p.
3. Gerstel D.U. Cytoplasmic male sterility in *Nicotiana* (A Review) // Tech. Bull. — 1980. — № 263. — North Carolina Agricultural Research Service.
4. Kumashiro T., Asahi T., Komari T. A new source of cytoplasmic male sterile tobacco obtained by fusion between *Nicotiana tabacum* and X-irradiated *N. africana* protoplasts // Plant Sci. — 1988. — 55. — P. 247–254.
5. Nikova V.M., Zagorska N.A. Overcoming hybrid incompatibility between *Nicotiana africana* Merxm. and *N. tabacum* and development of cytoplasmically male sterile tobacco forms // Plant Cell, Tissue and Organ Cult. — 1990. — 23. — P. 71–75.
6. Lugas G.B., Gooding J.R., Sasser J.N., Gerstel D.U. Reaction of *Nicotiana africana* to blank shank, granville wilt, root knot, tobacco mosaic virus and potato virus Y // Tob. Sci. — 1980. — 24. — P. 141–142.
7. Белокурова В.Б., Головач И.С., Щербак Н.Л., Кучук Н.В. Регенерация растений *Nicotiana africana* в культуре *in vitro* из эксплантов разного типа и мезофильных протопластов // Цитология и генетика. — 2004. — 38, № 3. — С. 9–15.
8. Rakosy-Tican L., Menczel L. Plant regeneration from cell suspension-derived protoplasts of *Nicotiana africana* // Plant Cell. Tissue and Organ Cult. — 1998. — 54. — P. 93–95.
9. Albert H., Dale E.C., Lee E., Ow D.W. Site-specific integration of DNA into wild-type and mutant *lox* sites placed in the plant genome // Plant J. — 1995. — 7. — P. 649–659.
10. Dale E.C., Ow D.W. Intra- and intermolecular site-specific recombination in plant cell mediated by bacteriophage P1 recombinase // Gene. — 1990. — 91. — P. 79–85.
11. Koshinsky H.A., Lee E., Ow D.W. Cre-*lox* site-specific recombination between *Arabidopsis* and tobacco chromosomes // Plant J. — 2000. — 23(6). — P. 715–722.
12. Puchta H. Marker-free transgenic plants // Plant Cell. Tissue and Organ Cult. — 2003. — 74. — P. 123–134.
13. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. — 1962. — 15. — P. 473–497.
14. Маниатис Т., Фрич Е.Ф., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984. — 521 с.
15. Christou P., McCabe J.E., Swain W.F. Stable transformation of soybean callus by DNA-coated gold particles // Plant Physiol. — 1988. — 87. — P. 671–674.
16. 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 Meth. Appl. — 1993. — 3. — P. 69–70.
17. Demeke T., Huel P., Baga M., Caswell K., Leung N., Chibbar R.N. Transgene inheritance and silencing in hexaploid spring wheat // Theor. Appl. Genet. — 1999. — 99. — P. 947–953.
18. Horsh R.B., Fry J.E., Hoffmann N.L., Eichholtz D., Rogers S.G., Fraley R.T. A simple and general method for transferring genes into plants // Science. — 1985. — 227. — P. 1229–1231.
19. McCormick S., Niedermeyer J., Fry J., Barnason A., Horsh R., Fraley R. Leaf disc transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens* // Plant Cell Rep. — 1986. — 5. — P. 81–84.
20. Valvekens D., Van Montagu M., Van Lusebettens M. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* root explants by using kanamycin selection // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1988. — 85. — P. 5536–5540.
21. Koncz C., Martin N., Mayerhofer R., Koncz-Kalman Z., Korber H., Redei G.P., Schell J. High-frequency T-DNA-mediated gene tagging in plants // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1989. — 86. — P. 8467–8471.

Поступила 27.04.04