

БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

Пасалари Хоссейн Мохаммад

аспирант

Евтушенко Анатолий Николаевич

д-р биол. наук, профессор

Белорусский государственный университет

г. Минск, Республика Беларусь

АГРОБАКТЕРИАЛЬНАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ КАРТОФЕЛЯ

Аннотация: в результате исследования методом агробактериальной трансформации при использовании стеблевых эксплантов авторами был получен трансгенный картофель. Методом ПЦР была подтверждена трансгенность регенерантов.

Ключевые слова: агробактерия, трансформация, регенерация, ПЦР

Генная инженерия или перенос гена представляет собой процесс, в котором конкретная часть чужеродной ДНК, содержащий новый ген или копии нескольких генов, искусственно вставляется в генный организм с использованием лабораторных методов. Встроенный чужеродный ген и организмы, получающие ген, в очереди называются трансгеном и трансгенными организмами. С помощью генной инженерии соответствующие гены из любого генома, в том числе растений, животных или микроорганизмов могут переносить в растения [1; 2; 5]. Трансгенные растения широко используются в фундаментальных исследованиях по биологии, особенно в молекулярной биологии и молекулярной генетике. Генномодифицированные растения нашли широкое применение в сельском хозяйстве, медицине и других областях [1; 8].

Этапы получения стабильно трансформированных растений:

а) выбор генов, которые будут вводиться в геном, и подготовка вектора для их переноса в геном растения; б) введение вектора в растительные клетки методом, наиболее подходящим для определенного вида растения или выбранного

экспланта; в) отбор трансформантов, а также подтверждение наличия и экспрессии введенных генов в геноме растения; г) проверка наследуемости встроенного гена [8].

Тотипотентность.

Одним из важных свойств растений является способность к регенерации *in vitro* из недифференцированных соматических тканей с получением нормальных, фертильных организмов. Это свойство позволяет получать генномодифицированные растения через культуру тканей. Используя свойства регенерированных клеток, которые получили плазмиды, будут получаться взрослые растения, которые не только имеют любые и нужные гены, но они также могут переносить их к будущим поколениям [8].

Ввиду способности *A. tumefaciens* трансформировать клетки растений, бактерия сейчас активно используется для привнесения генетической информации с целью генетической модификации растений. *A. tumefaciens* способна трансформировать как двудольные растения, так и некоторые однодольные растения, и некоторые микроскопические грибки. Поэтому были разработаны специальные векторы на основе Ti-плазмиды с удалёнными генами фитогормонов и опинов (разоруженной плазмиды) для привнесения чужеродной генетической информации в геном растений с целью получения растений с любыми нужными признаками. В связи со стабильностью встроенных генов, повышением эффективности переноса гена и переноса больших фрагментов ДНК, методика агробактериальной трансформации является одним из самых эффективных методов в растительной трансформации [1; 4; 6].

Методы работы.

Трансформацию проводили вектором PZH 485 и PZH 501, сконструированными на кафедре молекулярной биологии БГУ, несущим селективный ген *nptII* устойчивости к антибиотику канамицину и целевой ген *aroA Dickeya dadantii* с одной мутацией, который кодирует измененную енолпирувилшикиматфосфат синтазу, что определяет устойчивость к гербициду глифосату. Для проведения экспериментов по агробактериальной трансформации картофеля, использовали

штаммы *Agrobacterium tumefaciens* AGL0 и LBA4404. Трансформацию агробактерий проводили методом замораживания-оттаивания [7]. Клетки бактерий культивировали на стандартной агаризованной среде LB при температуре 28°C. В среду добавляли антибиотики тиментин (150 мг/л) для избирательного роста агробактерий и канамицин (25 мг/л) как селективный маркер. Отбор клонов проводился методом ПЦР. Полученные агробактериальные штаммы с необходимыми плазмидами использовались для трансформации растений картофеля.

Трансформация растений картофеля.

Для трансформации картофеля были выбраны сорта Одиссей, Скарб и Ветразь. Для переноса плазмид в агробактерии была проведена прямая трансформация агробактерии методом замораживания-оттаивания [7]. Трансформация стеблевых эксплантов картофеля проводилась на проростках 4-недельного возраста (только первые 6 междоузлий, начиная от верхушки). Агробактерии выращивали в течение 12–15 часов в термостате (28°C) на среде УЕВ без антибиотиков (ночная культура), экспланты инкубировали в 30 мл жидкой УЕВ, содержащей 1:10 ночной культуры агробактерий в течение 15 мин., затем подсушивали на стерильном фильтре (не пересушивать) и помещали на чашки Петри со средой СИМ1(соли MS, витамины по Морелю, сахароза 30 г/л, БАП (6-бензиламинопурин), 1 мг/л, 0,1 мг/л НУК (нафтилуксусная кислота), агар 7 г/л pH 5,8). После 2 дней кокультивации (чашки с эксплантами накрыть листом бумаги) экспланты помещали на среду СИМ1, содержащую 150 мг/л тиментина и 25 мг/л канамицина. После 7 дней культивации экспланты переносили на среду СИМ1(соли MS, витамины по Морелю, сахароза 30 г/л, 1 мг/л БАП (6-бензиламинопурин), 0,1 мг/л гибберелиновая кислота, агар 7 г/л pH 5,8) с добавлением антибиотика тиментина в концентрации 150 мг/л и селективного агента (канамицина в концентрации 50 мг/л). В дальнейшем экспланты переносили на свежую среду СИМ1 каждые 2 недели до появления побегов [2; 3; 9]. Для повышения эффективности каллусогенеза использовали контрастную стимуляцию: помещали чашки с эксплантами в темноту на 2 суток при температуре 24–25°C, переносили на неделю

на свет (5000 Лк) на 25°C с фотопериодом 16/8 часов, далее экспланты переносили на свежую среду SIM1 каждые 2 недели до появления побегов. растения, для образования корней, высаживали на среду MS с добавлением 150 мг/л тиментина, 0,1 мг/л НУК и антибиотика канамицина. После 1–2 пассажей переносили на автоклавированную почву.

Результаты исследования.

В ходе проведения агробактериальной трансформации растений картофеля сорта Скарб, было получено 4 трансгенных регенеранта с векторной конструкцией p485 и 3 трансгенных регенеранта с векторной конструкцией p501, для сорта Одиссей 5 трансгенных регенерантов с векторной конструкцией p485 и 6 трансгенных регенерантов с векторной конструкцией p501 и для сорта Ветразь 4 трансгенных регенеранта с векторной конструкцией p485 и 5 трансгенных регенерантов с векторной конструкцией p501, укоренившихся на среде с канамицином. Первичные трансформанты, проявившие способность образовывать корневую систему в присутствии канамицина, были отобраны для дальнейших исследований. Из данных растений была выделена ДНК для проведения ПЦР.

Таблица 1

Эффективность трансформации различных сортов картофеля белорусской селекции

Сорт	Трасформировано эксплантов плазмидой PZH 485	Трасформировано эксплантов плазмидой PZH 501	Число трансформантов с PZH 485	Число трансформантов с PZH 501	% транс-генов PZH 485	% транс-генов PZH 501
Одиссей	15	15	5	6	33.3	40
Скарб	15	15	4	3	26.6	20
Ветразь	15	15	4	5	33.3	20

Молекулярный анализ полученных растений.

Наличие гена *aroA* в геноме растений анализировали с помощью реакций амплификации с праймерами 5'-GCCGAATCCCTGACGTTACAACC-3' и 5'-CCGGCTGCCTGGCTAATCCGCGC-3', с которыми синтезируется фраг-

мент размером 750 п.н. Реакционная смесь включала 1 мкл геномной ДНК каждого образца, 1 мкл кДНК создана тотальной РНК каждого образца, по 2 мкМ каждого из праймеров, 2 мМ смеси четырех дезоксинуклеотидтрифосфатов, 5 единиц/мкл Таq полимеразы в однократном реакционном буфере. Общий объем смеси составлял 15 мкл. Программа амплификации: денатурация 94°C 4 мин.; 30 циклов: 94°C 30 с; 55°C 1 мин.; 72°C, 1 мин. 30 с.; заключительный цикл – 7 мин. при 7 °C. Продукты ПЦР анализировали при помощи электрофореза в 1%-ом агарозном геле в трис-ацетатной буферной системе.

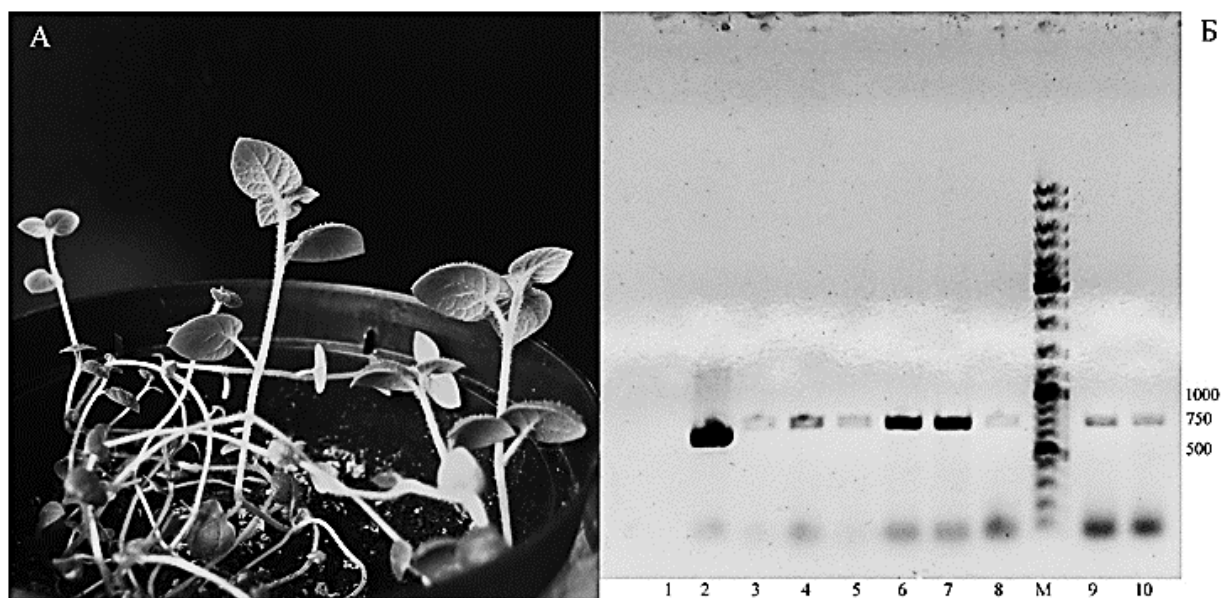


Рис.1. А–Трансформированные растения картофеля, выросшие на канамицине; В–Электрофореграмма ПЦР продуктов с праймерами к гену *aroA*, полученных с ДНК и кДНК, выделенной из трансформированного картофеля. Дорожки 1 и 2 (положительный контроль, отрицательный контроль и плазмидная ДНК PZH 501), 3–7 – образцы днк, 8, 9, 10 – образцы кДНК, –М – маркерная ДНК (1 kb DNA ladder Mix, Fermentas)

Одной из целей генной инженерии является получение растений с ценными признаками для сельскохозяйственного производства. Агробактериальная трансформация является одним из самых эффективных методов переноса генов в растения в связи со стабильностью встраиваемых конструкций и высокой частотой переноса.

Нами была проведена агробактериальная трансформация трех сортов картофеля двумя генетическими конструкциями с геном *aroA* (таблица 1). Трансформанты были получены для всех трех сортов картофеля, несколько выше была частота трансформации сорта Одиссей. Полученные трансформанты культивировали до формирования стеблей и корневой системы на среде Мурасиге-скуга с канамицином и тиментином. Тиментин добавляли для подавления роста агробактерий. Сформированные растения переносили сначала в стерильную почву в закрытом сосуде для предохранения от пересыхания, а через неделю культивировали в открытом сосуде при естественном освещении. Для выделения ДНК отбирали листья с середины побегов. ПЦР анализ образцов ДНК выявил во всех растениях фрагмент гена *aroA* размером 750 пар нуклеотидов.

Выводы.

Таким образом, в результате выполненной работы были получены трансгенные растения картофеля белорусской селекции методом агробактериальной трансформации с геном *aroA* устойчивых к гербициду глифосату. Наличие целевого гена в геноме трансформированных растений было подтверждено методом ПЦР. Полученные растения будут использованы для дальнейших исследований и определения уровня устойчивости к неблагоприятным факторам.

Список литературы

1. Бурьянов Я.И. Успехи и перспективы генно-инженерной биотехнологии растений // Физиология растений. – 1999. – Vol. 46. – С. 930–944.
2. Broglie K. Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani* / K. Broglie, I. Chet Holliday, M. Cressman, R. Biddle, P. Knowlton, S. Mauvais, C.J. Broglie // Science. – №254. – 1991. – P. 1194–1197.
3. Conner A.J. Agrobacterium-mediated transformation of New Zealand potato cultivars / A.J. Conner, M.K. Williams, R.C. Gardner, S.C. Deroles, M.L. Shaw, J.E. Lancaster // New Zealand J.Crop and Hort. Sci. – №19. – 1991. – P. 1–8.
4. Захарченко Н.С. Индуцирование процессинга агробактериальной Т-ДНК экссудатами однодольных растений / Н.С. Захарченко, М.А. Каляева, Я.И. Бурьянов // Физиология растений. – 1999. – Т. 46. – Vol. 2. – С. 282–291.

5. Лутова Л.А. Генетическая инженерия растений: свершения и надежды // Соросовский образовательный журнал. – 2000 – Vol. 10. – С. 10–17.
6. Лутова Л.А. Агробактериальная трансформация как способ изменения гормонального метаболизма у высших растений / Л.А. Лутова, З.Б. Павлова, М.И. Иванова // Генетика. – 1999. – Т. 3. – Vol. 2. – С. 165–182.
7. Transfection and transformation of *A. tumefaciens* / M. Holsters [et al.] // M GG. – 1978. – Vol. 163. – P. 181–187.
8. Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия / С.Н. Щелкунов. – Новосибирск: Сибир. Универс., 2004. – 496 с.