

С. В. Стороженко, О. А. Кравец, Н. Я. Погребняк, Ю. Ю. Глеба

## ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ МУТАНТНЫЙ ГЕН АЦЕТОЛАКТАТСИНТАЗЫ ARABIDOPSIS THALIANA

*Растения картофеля сортов Луговской и Дезирее трансформированы конструкциями, содержащими мутантный ген ацетолактатсинтазы *A. thaliana* под контролем мощного конститутивного промотора, в результате кокультивирования различных эксплантов с *Agrobacterium tumefaciens*. С использованием методов Саузерн- и нозерн-блоттинг-гибридизаций показана интеграция гена в состав геномной ДНК и его экспрессия на уровне транскрипции.*

**Введение.** Несколько различных классов гербицидов, таких как сульфонилмочевина [1], имидазолиноны [2] и триазолопиримидины [3], ингибируют фермент ацетолактатсинтазу (AHAS; ALS; ES 4.1.3.18), который является ключевым в биосинтезе аминокислот валина, лейцина и изолейцина. Подобное ингибирование, как правило, приводит к гибели растений.

В последнее время получен ряд растений, устойчивых к сульфонилмочевине [4, 5] и имидазолинонам [6—8]. В большинстве проанализированных случаев устойчивость их была связана с синтезом измененной формы ALS, являющейся менее чувствительной к ингибированию гербицидами [9]. Вскоре были клонированы гены ALS растений, устойчивых к гербицидам. Ли и сотр. клонировали гены двух мутантных линий табака, устойчивых к сульфонилмочевине и имидазолинонам [10]. В первом случае устойчивость была вызвана одной точечной заменой в нуклеотидной последовательности гена. Во втором — двумя. Хогн и сотр. изолировали ген, кодирующий ацетолактатсинтазу мутантного растения *A. thaliana*, и ввели его в табак, выделив устойчивые к гербициду трансгенные линии табака [11].

Введение подобных мутантных генов в ценные сельскохозяйственные культуры является одним из подходов к получению устойчивых к гербицидам растений, что имеет как важное научное значение, так и большую коммерческую ценность.

Цель настоящей работы состояла в получении трансгенных растений картофеля, экспрессирующих мутантный ген ацетолактатсинтазы *A. thaliana*.

**Материалы и методы.** Плазмиды и штаммы. Для трансформации растений использовали плазмиды *pAC350* и *pAC351*, любезно предоставленные д-ром Р. Чалеффом (Sunamid Corporation, США). Плазмиды созданы на базе бинарного растительного вектора и содержат мутантный ген ацетолактатсинтазы *A. thaliana* под контролем мощного промотора.

Основой для наработки плазмидной ДНК служил штамм *E. coli* XL-1 blue. Плазмидную ДНК выделяли по методу щелочного лизиса.

Трансформацию растений осуществляли с помощью штамма *A. tumefaciens* C58C1Rif<sup>R</sup> (*pMP90*) [12].

**Растительный материал.** Растения картофеля сортов Луговской и Дезирее выращивали в асептических условиях на среде Мурагисе и Скуга (МС) [13]. Для трансформации использовали листовые

диски и сегменты стеблей 1,5—2-месячных растений, а также сегменты мини-клубней. Мини-клубни получали на среде МС с добавлением 6 % сахарозы и 2,5 мг/л кинетина в темноте в течение 1,5 месяца.

Введение плазмид в *A. tumefaciens*. Конструкции *pAC350* и *pAC351* переносили в агробактерии с помощью метода прямой трансформации [14]. Для подтверждения факта трансформации из предполагаемых трансформантов выделяли плазмидную ДНК и проводили ее рестрикционный анализ.

Трансформация растений и селекция. Агробактерии выращивали в жидкой среде MinA с 50 мг/л канамицина при встряхивании и температуре 26—28 °С в течение 24—30 ч. Трансформацию проводили по методу Де Блок [15] с некоторыми модификациями. Сегменты стеблей, мини-клубней и листовые диски помещали в чашки Петри, содержащие по 10 мл жидкой среды S2, и добавляли по 50 мкл суспензии агробактерий. После 24—48 ч кокультивирования эксплантаты отмывали в среде S2 с 500 мг/л цефотаксима и помещали на агаризованную среду S3, содержащую 50 мг/л канамицина и 500 мг/л цефотаксима. В других экспериментах эксплантаты погружали в суспензию агробактерий на 10 мин, а затем переносили на поверхность агаризованной среды. Через 2—4 сут эксплантаты отмывали от агробактерий и переносили на селективную среду S3. Каждые 2—3 недели эксплантаты переносили на свежую селективную среду. В соответствии с методикой Де Блок последовательно использовали среды S5 и S7.

Тест на каллусообразование в присутствии канамицина. Сегменты стеблей растений, полученных после трансформации, а также контрольных растений помещали на агаризованную среду SC-10 (минеральная основа по МС с добавлением 3 мг/л 2,4-Д, 0,3 мг/л кинетина и 2,5 % сахарозы), содержащую 100 мг/л канамицина.

Блоттинг-гибридизация по Саузерну. Суммарную растительную ДНК выделяли с использованием СТАВ [16].

10 мкг растительной ДНК обрабатывали рестриктазой *XbaI*, затем фракционировали в 0,7 %-й агарозе. Материал переносили в 25 мМ Na-фосфатном буфере (рН 7,2) в течение ночи на нейлоновые фильтры Sartolop («Sartorius», ФРГ), предварительно обработав гель 0,25 М HCl (20 мин) и 0,4 М NaOH (30 мин). ДНК на фильтре фиксировали облучением ультрафиолетом. Гибридизацию осуществляли в 0,5 М Na-фосфатном буфере, рН 7,2 и 7 %-м DS-Na [17]. В качестве зонда использовали *XbaI*-фрагмент (5,5 тыс. п. н.) плазмиды *pAC351*, содержащий ген ALS с регуляторными элементами. Фрагмент метили  $^{32}\text{P}$  по методу Фейнберга [18] с помощью набора Random Primed DNA Labelling Kit («Boehringer Mannheim», ФРГ) до удельной активности  $10^9$  имп·мин $^{-1}$ ·мкг $^{-1}$ .

Нозерн-блоттинг-гибридизация. Суммарную растительную РНК выделяли по методу, предложенному Керком и сотр. [19].

Электрофорез РНК проводили в 1 %-й агарозе с добавлением формальдегида до концентрации 1,1 М в 10 мМ Na-фосфатном буфере, рН 6,5. Перенос осуществляли в 10×SSC-буфере в течение ночи.

Гибридизацию и последующие отмывки фильтров проводили так же, как в случае блоттинг-гибридизации по Саузерну.

**Результаты и обсуждение.** Первым шагом на пути к получению трансгенных растений являлось введение конструкций *pAC350* и *pAC351* в подходящий штамм агробактерий. Для этого мы использовали штамм *A. tumefaciens* C58C1Rif<sup>R</sup> (*pM90*), несущий «разоруженную» *Ti*-плазмиду (производную плазмиды нопалинового типа *pTiC58*), которая совместима с любым бинарным вектором. Кроме того, этот штамм является более вирулентным по сравнению с аналогичным LBA4404. Конструкции вводили в агробактерии с помощью прямой трансформации. Для подтверждения факта трансформации из предполагаемых трансформантов выделяли плазмидную ДНК и проводили ее рестрикционный анализ (данные не представлены).

При трансформации растений картофеля использовали два варианта кокультивирования эксплантатов с агробактерией: в первом случае кокультивирование проводили в жидкой среде, во втором — смоченные в суспензии агробактерий эксплантаты помещали на поверхность агаризованной среды. Через 2—4 сут, когда на среде образовывалась видимая зона бактерий вокруг эксплантатов, их отмывали

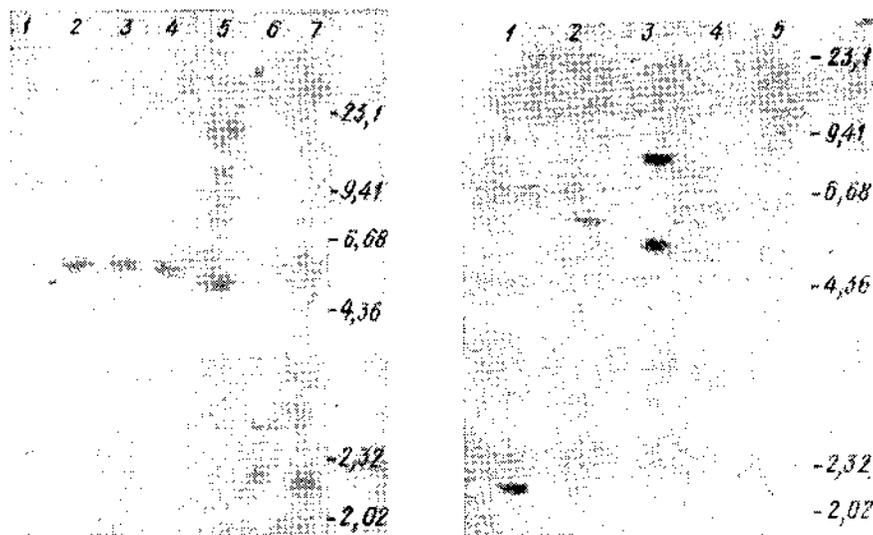


Рис. 1. Блоттинг-гибридизация по Саузерну суммарной ДНК трансгенных линий картофеля: 1 — сорт Дезирее, трансформированный *pAC350*, линия 5; 2, 3 — сорт Луговской, трансформированный *pAC351*, линии 5, 46 соответственно; 4 — нетрансформированное растение; 5 — фрагмент *pAC351*

Рис. 2. Блоттинг-гибридизация по Саузерну суммарной ДНК трансгенных линий картофеля: 1 — нетрансформированное растение; 2, 3, 4, 5 — сорт Луговской, трансформированный *pAC351*, линии 2, 6, 18, 55 соответственно; 6, 7 — сорт Дезирее, трансформированный *pAC350*, линии 12, 15 соответственно

и переносили на селективную среду. В наших экспериментах последний вариант оказался более эффективным.

Через 3—4 месяца после кокультивирования были получены регенеранты. Регенерированные растения высаживали на среду МС, содержащую 50 мг/л канамицина и 150 мг/л цефотаксима. В этих условиях полностью ингибировался рост и образование корней у нетрансформированных контрольных растений. Были отобраны 7 линий сорта Дезирее и 13 линий сорта Луговской, нормально растущие и образующие корни в присутствии 50 мг/л канамицина. Полученные в результате трансформации растения сохраняли характерные фенотипические признаки исходных сортов.

Для дополнительной проверки проводили тест на каллусообразование в присутствии 100 мг/л канамицина: сегменты стеблей нетрансформированных и полученных после трансформации растений картофеля помещали на среду для каллусообразования, содержащую 100 мг/л канамицина. Через 3—4 недели эксплантаты растений после трансформации образовали каллус, тогда как эксплантаты нетрансформированных растений были не способны к каллусообразованию в присутствии канамицина.

Для доказательства интеграции мутантного гена ацетолактатсинтазы в состав геномной ДНК предполагаемых трансгенных растений картофеля использовали метод блоттинг-гибридизации по Саузерну. Суммарную ДНК каждой из полученных линий обрабатывали рестриктазой *XbaI*, фракционировали в 0,7 %-й агарозе, переносили на нейлоновые фильтры и гибридизовали с *XbaI*-фрагментом (5,5 тыс. п. н.) плазмиды *pAC351*, содержащей мутантный ген ацетолактатсинтазы с

регуляторными элементами. Результаты гибридизации представлены на рис. 1, 2. ДНК всех 9 анализируемых линий гибридизуется с зондом, что свидетельствует о наличии в геномной ДНК указанного фрагмента, тогда как в ДНК контрольных растений сигналы отсутствуют. Однако только у 4 из 9 исследованных линий при обработке *Xba*I из геномной ДНК выщепляется фрагмент 5,5 тыс. п. н., соответствующий размерам введенного гена с 5'- и 3'-фланкирующими областями и регуляторными элементами. Это линии 2, 6, 18, 5 сорта Луговской, полученные в результате трансформации плазмидой *pAC351*. Две линии,



полученные после трансформации плазмидой *pAC351*, дают гибридизационный сигнал, соответствующий фрагменту несколько меньшего размера — 5,1 тыс. п. н., что является, по-видимому, результатом перестроек при встраивании Т-ДНК в геном. Все три линии,

Рис. 3. Нозерн-блоттинг-гибридизация суммарной РНК трансгенных линий картофеля: 1 — сорт Дезирае, трансформированный *pAC350*, линия 15; 2, 3, 4, 5 — сорт Луговской, трансформированный *pAC351*, линии 18, 6, 5, 2 соответственно; 6 — нстрасформированное растение

полученные после трансформации плазмидой *pAC350*, дают сигнал, соответствующий фрагменту размером около 2 тыс. п. н. Нам кажется маловероятным, что эта делеция произошла в процессе встраивания Т-ДНК в состав геномной ДНК, скорее, она возникла во время культивирования агробактерии, содержащей *pAC350*.

Для исследования экспрессии на уровне РНК из анализируемых линий выделяли суммарную РНК, фракционировали с помощью электрофореза в агарозном геле в денатурирующих условиях, переносили на нейлоновые фильтры и проводили блоттинг-гибридизацию с тем же зондом, что и в случае блоттинг-гибридизации по Саузерну. Результаты гибридизации представлены на рис. 3. Все четыре линии, содержащие полноразмерный ген с регуляторными элементами, экспрессируют мРНК ожидаемого размера. Нами была исследована одна из линий, полученная после трансформации плазмидой *pAC350* и содержащая неполную копию гена. Как и следовало ожидать, сколько-нибудь существенная экспрессия гена не обнаруживалась, по крайней мере, на уровне чувствительности метода. Этот факт свидетельствует о том, что делеция(и) затронула регуляторные элементы гена, и ожидать устойчивости таких растений к гербициду не приходится.

Таким образом, нами получены трансгенные растения картофеля сортов Луговской и Дезирае, экспрессирующие мутантный ген ацетолактатсинтазы *A. thaliana*. В настоящее время проверяются уровни устойчивости названных растений к сульфонилмочевине и имидазолинонам, что, вероятно, будет опубликовано несколько позже.

С. В. Стороженко, О. А. Кравець, Н. Я. Погребняк, Ю. Ю. Глеба

#### ОДЕРЖАННЯ ТРАНСГЕННИХ РОСЛИН КАРТОПЛІ, ЕКСПРЕСУЮЧИХ МУТАНТНИЙ ГЕН АЦЕТОЛАКТАТСИНТАЗИ *ARABIDOPSIS THALIANA*

##### Резюме

Рослини картоплі сортів Луговської і Дезирае трансформовано конструкціями, які містять мутантний ген ацетолактатсинтази *Arabidopsis thaliana* під контролем потужного конститутивного промотора, в результаті кокультивування різних експланта-

тів з *Agrobacterium tumefaciens*. З використанням методів Саузерн- та Нозерн-блотинг-гібридизацій показано інтеграцію гена до складу геномної ДНК і його експресію на рівні транскрипції.

S. V. Storozhenko, O. A. Kravets, N. Ya. Pogrebnyak, Yu. Yu. Gleba

## ISOLATION OF THE TRANSGENIC POTATO PLANTS EXPRESSING THE MUTANT GENE CODING FOR ACETOLACTATE SYNTHASE FROM ARABIDOPSIS THALIANA

### Summary

Potato plants of Lugovskoy and Desiree cultivars have been transformed with the construction containing mutant gene coding for acetolactate synthase from *Arabidopsis thaliana* by means of cocultivation of different explants with *Agrobacterium*. Using Southern and northern blotting hybridizations an integration of the gene in plant genome and its expression on transcriptional level have been shown.

### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. LuRossa R. A., Scholss J. V. The sulfonylurea herbicide sulfometuron methyl is an extremely potent and selective inhibitor of acetolactat synthase in *Salmonella typhimurium* // J. Biol. Chem.—1984.—259.—P. 8753—8757.
2. Subramanian D. L., Anderson P. C., Stidham M. A. Imidazolinones. Potent inhibitors of acetoxyhydroxyacid synthase // Plant Physiol.—1984.—76.—P. 545—546.
3. Subramanian M. V., Gerwick B. C. Inhibition of acetolactat synthase by triazolopyrimidines. A review of recent developments // Biocatalysis in agricultural biotechnology / Eds. J. R. Whitaker, P. E. Sonnet // Amer. Chem. Soc. Symp. Ser.—1989.—389.—P. 227—228.
4. Chaleff R. S., Ray T. B. Herbicide-resistat mutants from tobacco cell cultures // Science.—1984.—223.—P. 1148—1151.
5. Haughn G. W., Somerville C. Sulfonylurea-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* // Mol. and Gen. Genet.—1986.—204.—P. 430—434.
6. Swanson E. B., Hergesell M. G., Arnoldo M. et al. Microspore mutagenesis and selection: Canola plants with field tolerance to the imidazolinone // Theor. and Appl. Genet.—1989.—78.—P. 525—530.
7. Saxena P. K., King J. Lack of cross-resistance of imidazolinone-resistant cell lines of *Datura innoxia* P. Mill to chlorsulfuron. Evidence for separable sites of action on the target enzyme // Plant Physiol.—1990.—94.—P. 1111—1115.
8. Haughn G. W., Somerville C. A mutation causing imidazolinone resistance maps to the *csr1* locus of *Arabidopsis thaliana* // Ibid.—92.—P. 1081—1085.
9. Mazur B. J., Falco S. C. The development of herbicide-resistant crops // Ann. Rev. Plant. Physiol.—1989.—40.—P. 441—470.
10. Lee K. Y., Townsend J., Tepperman J. et al. The molecular basis of sulfonylurea herbicide resistance in tobacco // EMBO J.—1988.—7, N 5.—P. 1241—1248.
11. Haughn G. W., Smith J., Mazur B., Somerville C. Transformation with a mutant *Arabidopsis* acetolactate synthase gene render tobacco resistant to sulfonylurea herbicides // Mol. and Gen. Genet.—1988.—211.—P. 266—271.
12. Koncz C., Schell J. The promoter of T1-DNA gene 5 controls the tissue specific-expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector // Ibid.—1986.—204, N 3.—P. 383—396.
13. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiol. Plant.—1962.—15, N 4.—P. 473—497.
14. Гловер Д. Клонирование ДНК.—М.: Мир, 1988.—538 с.
15. De Block M. Genotype-independent leaf disc transformation of potato (*Solanum tuberosum*) using *Agrobacterium tumefaciens* // Theor. and Appl. Genet.—1988.—76, N 5.—P. 767—774.
16. Murray M. J., Thompson W. F. Rapid isolation of high molecular weight DNA // Nucl. Acids Res.—1980.—8, N 19.—P. 4321—4325.
17. Chuch G. M., Gilbert W. Genomic sequencing // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1984.—81, N 7.—P. 1991—1995.
18. Feinberg A. P., Volgenstein B. A technique for radiolabelling DNA restriction fragments to high specific activity // Anal. Biochem.—1984.—137, N 5.—P. 266—267.
19. Kirk M. M., Kirk L. D. Translation regulation of protein synthesis, in response to light at a critical stage of Volvox development // Cell.—1985.—41, N 2.—P. 419—428.

Ин-т клеточ. биологии и генет. инженерии  
АН України, Києв

Получено 07.07.93