

Генетическая трансформация *Digitalis purpurea* с помощью *Agrobacterium tumefaciens*

Н. Я. Погребняк, Л. Н. Шиша, С. В. Стороженко, Л. И. Юзефович,
Б. Диттрих¹, Ю. Ю. Глеба

Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины
252143, Киев, ул. Академика Заболотного, 148

¹ Институт фармацевтической биологии Университета Мартина-Лютера
Германия, Галле, Вейнбергвег, 15

Разработан метод трансформации клеток D. purpurea с помощью A. tumefaciens. Получены трансгенные линии D. purpurea, устойчивые к действию антибиотика генетицина. Трансгенная природа этих линий была подтверждена с помощью ПЦР-анализа.

Введение. В настоящее время получено большое количество трансгенных растений, в том числе важных для сельского хозяйства и медицины. Однако для многих растений до сих пор не создана система трансформации. Это касается и очень важного для медицины растения *D. purpurea*. Наиболее часто для кокультивирования с агробактерией используются сегменты растительной ткани (листовые диски, сегменты стеблей и т. п.) Несмотря на имеющиеся в литературе сообщения об успешном использовании при трансформации клеточной суспензии [1—3] и каллусных клеток [4—6], для многих культур эти методы еще недостаточно совершенны. Целью настоящей работы была разработка системы трансформации *D. purpurea*, используя клеточную суспензию и каллусные клетки.

В конструкциях, применяемых для трансформации растений, широко используется ген *prtII*, несущий устойчивость к группе аминогликозидных антибиотиков: канамицину, неомицину, генетицину (G-418) и паромомицину. Подавляющее большинство работ по трансформации описывает получение трансгенных линий, устойчивых к канамицину. Однако для отдельных растений, в том числе и для *D. purpurea*, селекция на канамицине оказалась неэффективной. Поэтому мы решили использовать для селекции трансформантов генетицин.

Материалы и методы. В работе использовали постоянно культивируемые *in vitro* суспензию клеток и каллус *D. purpurea*, полученные ранее в Институте фармацевтической биологии (Галле, Германия). Суспензия клеток росла в жидкой среде NMI, условия культивирования описаны ранее [7], каллус — на агаризованной среде такого же состава. Каждые две недели проводили пересадку на свежую среду. При трансформации использовали конструкции *pBI121* и *pIB16.1*, интродуцированные в *A. tumefaciens* соответственно в C58C1 Rif (*pGV2260*) и LBA 4404 (*pAL4404*). В экспериментах по трансформации агробактерию выращивали на жидкой среде LB с соответствующими антибиотиками на качалке при температуре 26 °С в течение 24—30 ч (до достижения лог-фазы роста 10⁹ кл/мл). Для трансформации использовали несколько методов, в том числе описанные в литературе [1—6] и разработанные нами.

В первой серии экспериментов кокультивирование осуществляли в жидкой среде NMI по методу, известному из литературы [2], в некоторых экспериментах — с небольшими модификациями (в частности, с увеличением в 2—5 раз концентрации растительных клеток и агробактерий). Селекцию также проводили в жидкой среде NMI, содержащей 500 мг/л цефотаксима и 10 мг/л генетицина.

В следующей серии экспериментов для трансформации применяли метод Дрейпера [1] с нашими модификациями. В этих опытах суспензию

клеток фильтровали через капроновый фильтр и собранные таким образом агрегаты клеток (диаметром 2—3 мм) помещали на переносной диск (фильтровальную бумагу), находящийся на поверхности агаризованной среды NMI в чашке Петри. Каждый такой диск (Д 8 см) содержал по 30—40 агрегатов клеток. Через 2—3 дня в каждую чашку Петри добавляли по 200 мкл ночной суспензии агробактерии, разбавленной жидкой средой (1:100), и кокультивировали в течение 5—7 дней. Затем переносные диски помещали на поверхность агаризованной селективной среды, содержащей 500 мг/л цефотаксима и 10—15 мг/л генетицина. Через каждые две недели эти диски переносили на свежую среду такого же состава. В других экспериментах вместо суспензионных клеток мы использовали каллусные клетки (Д 3—5 мм) и концентрации агробактерии увеличивали в 10 раз.

В последующих экспериментах каллусную ткань (7 дней после посадки) нарезали стерильным скальпелем. Этот каллус был разделен на части массой 1 г, к каждой части были добавлены по 100 мкл суспензии агробактерии и тщательно перемешаны. Через 3 дня каллус переносили на селективную среду, содержащую 500 мг/л цефотаксима и 10—15 мг/л генетицина.

Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали ранее разработанные праймеры для амплификации последовательности 35S-промотора [8]. В реакцию добавляли 10—100 нг суммарной растительной ДНК, выделенной с помощью ЦТАБ [9]. Реакцию амплификации осуществляли, как изложено в [8]. После проведения 30 циклов амплификации образцы фракционировали в 2 %-м агарозном геле.

Результаты и обсуждение. Для трансформации *D. purpurea* мы использовали конструкции *pBI121* и *pB16.1*, несущие ген *prtII*. Селекцию проводили на среде, содержащей 10—15 мг/л генетицина. Контрольные клетки на среде с 10 мг/л генетицина погибали в течение первых суток.

В первой серии опытов кокультивирование и селекцию осуществляли в жидкой среде. Эти условия оказались крайне неэффективными: во время кокультивирования в жидкой среде происходила массовая гибель растительных клеток (до 80—90 %), даже в тех экспериментах, когда концентрация агробактерии была невысокой. Селекция в жидкой среде также была неэффективной, практически все растительные клетки погибали. По нашему мнению, отдельным трансгенным клеткам было бы крайне сложно выжить и размножиться в условиях массовой гибели клеток и накопления продуктов распада в жидкой среде.

В некоторых экспериментах перед кокультивированием каллус резали скальпелем. В результате оказалось, что жизнеспособность такого травмированного каллуса резко снижалась, большинство каллусных клеток погибало на следующий день. Таким образом, для *D. purpurea* эта манипуляция является неподходящей.

Затем проводили кокультивирование и селекцию на поверхности агаризованной среды даже в тех случаях, когда для трансформации использовали суспензию клеток. В результате варьирования величины исходного материала и концентрации агробактерии нам удалось подобрать оптимальные условия для трансформации каллуса *D. purpurea*. Наиболее эффективным был следующий метод. Кусочки каллуса (Д 3—5 мм) помещали на фильтровальную бумагу, находящуюся на поверхности агаризованной среды (по 20 штук на чашку). Через два дня разбавленную в 10 раз суспензию агробактерии добавляли в каждую чашку (по 200 мкл). После 5—7 сут кокультивирования в темноте фильтровальную бумагу с каллусными клетками переносили на селективную среду, содержащую 10—15 мг/л генетицина и 500 мг/л цефотаксима. Через каждые две недели клетки переносили на свежую среду такого же состава. Спустя три недели появились первые устойчивые линии *D. purpurea* (рис. 1). Их отделяли от остальной ткани и переносили на свежую селективную среду.

После трансформации каллуса с помощью *A. tumefaciens* C58CI Rif (*pGV2260*), несущей плазмиду *pBI121*, получены 14 линий, устойчивых к генетицину. В случае использования для трансфор-



Рис. 1. Рост трансгенных линий на селективной среде (вверху) по сравнению с контролем

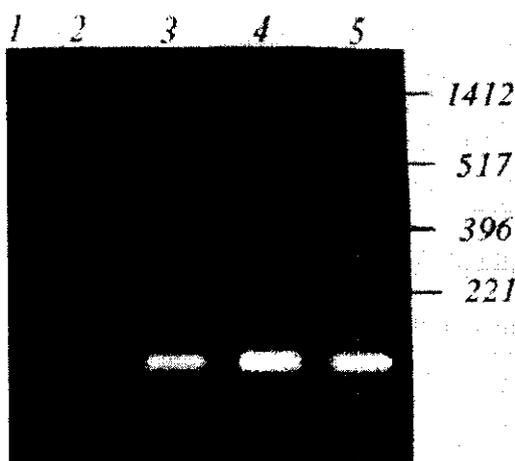


Рис. 2. Результаты ПЦР-анализа: 1 — контроль (нетрансформированные клетки); 2, 3 — линии, полученные после трансформации (конструкция *pB1121*); 4, 5 — то же (конструкция *pB16.1*). Справа указаны размеры маркеров в п. н.

мации LBA 4404 (*pAL4404*), несущей плазмиду *pB16.1*, получены 17 устойчивых к генетицину линий.

Трансформанты анализировали с помощью ПЦР (рис. 2). Все проверенные трансгенные линии дают в результате амплификации фрагменты ДНК требуемого размера. Таким образом была подтверждена трансгенная природа полученных линий.

К настоящему времени в литературе нет сообщений о получении трансгенных линий *D. purpurea*. Разработанный нами подход позволяет с достаточно высокой эффективностью получать трансгенные линии *D. purpurea*.

Н. Я. Погребняк, Л. Н. Шиша, С. В. Стороженко,
Л. І. Юзефович, Б. Діттрих, Ю. Ю. Глєба

Генетична трансформація *Digitalis purpurea* за допомогою *Agrobacterium tumefaciens*

Резюме

Розроблено метод трансформації *D. purpurea* за допомогою *A. tumefaciens*. Отримано трансгенні лінії *D. purpurea*, стійкі до антибіотику генетицину. Трансгенну природу цих ліній підтверджено за допомогою ПЛР-аналізу.

N. Ya. Pogrebnyak, L. N. Shisha, S. V. Storozhenko,
L. I. Yuzefovich, B. Dittrich, Yu. Yu. Gleba

Genetic transformation of *Digitalis purpurea* by *Agrobacterium tumefaciens*

Summary

Agrobacterium-mediated method of transformation of *D. purpurea* has been developed. Transgenic geneticin-resistant *D. purpurea* lines have been obtained. Transgenic nature of these lines have been confirmed by PCR.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Scott R. J., Draper J. Transformation of carrot tissues derived from proembryogenic suspension cells: A useful model system for gene expression studies in plants // *Plant Mol. Biol.*—1987.—8.—P. 265—274.
2. An G. High efficiency transformation of cultured tobacco cells // *Plant Physiol.*—1985.—79.—P. 568—570.
3. Pollock K., Barfield D. S., Robinson S. J., Shields R. Transformation of protoplasts-derived cell colonies and suspension cultures by *Agrobacterium tumefaciens* // *Plant Cell Rep.*—1984.—4.—P. 202—205.
4. Wurtele N. S., Bulka K. A simple, effective method for the *Agrobacterium*-mediated transformation of carrot callus cells // *Plant Science.*—1989.—61.—P. 253—262.
5. Walluin H., Leemans L., Botterman N. Transformation of sugarbeet and evaluation of herbicide resistance in transgenic plants // *Bio/Tech.*—1992.—10, N 3.—P. 12—14.
6. Zhang H., Somerville C. R. Transfer of the maize transposable element *Mu1* into *Arabidopsis thaliana* // *Plant Science.*—1987.—48.—P. 165—173.
7. Diettrich B., Steup C., Neumann D. et al. Morphogenetic capacity of cell strains derived from filament, leaf and root explants of *Digitalis lanata* // *J. Plant Physiol.*—1986.—124.—P. 441—453.
8. Стороженко С. В. Анализ трансгенных растений с помощью полимеразной цепной реакции: пара универсальных праймеров для амплификации последовательности 35S промотора // *Биополимеры и клетка.*—1994.—10.—P. 67—72.
9. Murray M. J., Thompson W. E. Rapid isolation of high molecular weight DNA // *Nucl. Acids Res.*—1980.—8, N 19.—P. 4321—4325.

УДК 577.21

Поступила в редакцию 20.06.96