



№18 575.22

С. Е. И. Зубко, Н. В. Кучук, Л. Г. Туманова,
Н. А. Викошская, Ю. Ю. Глеба, 1990

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ ГОРОХА, ОПОСРЕДОВАННАЯ *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

В работе показана возможность генетической трансформации гороха посредством *A. tumefaciens*. Трансформацию проводили кокультивированием растительных тканей с «shooty»-мутантом *A. tumefaciens* pGV2206; селекцию — на безгормональной среде Гамборга. Отобрано 12 регенерирующих линий, сохраняющих способность куститься на питательной среде, не содержащей фитогормонов, уже более 1,5 года. Из этих линий получены нормализованные побеги. С помощью метода блотинг-гибридизации по Саузерну показано присутствие в ДНК трансгенных растений гена *NPTII* плазмиды pGV2206 *A. tumefaciens*.

Введение. Разработка векторных систем на основе *T1*-плазмид *A. tumefaciens* открыла широкие возможности для переноса различных генов и последовательностей ДНК в геном высших растений [1, 2]. Трансгенные растения используются для выяснения механизмов экспрессии генов, а также являются объектом генетико-селекционных исследований [3, 4]. Хотя круг растений, для которых разработана техника генетической трансформации, постоянно расширяется, многие хозяйственно важные культуры до сих пор остаются за его пределами. К их числу, в частности, относятся некоторые представители семейства бобовых. Основные трудности в решении проблемы генетической трансформации этих видов связаны с недостаточной разработкой способов органогенеза из неорганизованных тканей *in vitro*.

Цель нашей работы предполагала осуществление экспериментов по генетической трансформации гороха, о трансгенных растениях которого до настоящего времени не сообщалось. Нами использован «shooty»-мутант *A. tumefaciens* pGV2206, полученный на основе плазмиды pTIB6S3 путем интеграционного мутагенеза с замещением генов синтеза ауксинов *T*-ДНК последовательностью плазмиды pGV1106, содержащей бактериальный ген устойчивости к канамидинсульфату (*NPTII*) [5]. С использованием этого штамма было индуцировано множественное побегообразование у табака, а затем получены нормализованные трансгенные растения [6, 7].

Материалы и методы. Кокультивирование растительного материала с *A. tumefaciens*. В опытах использовали семена гороха посевного (*Pisum sativum* L., линия 1288, полученная из ВНИИР им. П. Н. Вавилова), которые после поверхностной стерилизации проращивали в асептических условиях на среде Гамборга В5 [8] при температуре 26 °С и освещенности 2000 лк. Кусочки листьев и стеблей 2—3-недельных растений помещали в колбу (100 мл) с 30 мл жидкой питательной среды В5 и добавляли 1 мл свежей почной культуры «shooty»-мутанта *A. tumefaciens* pGV2206. Среда В5 представляет собой модификацию среды В5N [9], в которой отсутствует глутамин и уменьшены концентрации аденина и мезо-инозитола. Инкубацию проводили на шейкере в течение 2 сут при 150 об/мин на рассеянном свете. Аналогично манипулировали с контрольным вариантом (без *A. tumefaciens*). Спустя 48 ч отмывали стерильной водой и слегка подсушенные на фильтровальной бумаге ткани переносили на агаризованную питательную среду В5 с клафораном и карбенциклином

в концентрации 400 мкг/мл. Через 2—3 недели (после образования первичного каллуса) ткани целиком перенесли на лишенную фитогормонов среду В5.

Блоттинг-гибридизацию проводили по методу Саузерна [10], используя в качестве зонда *Bam*III-*Eco*RI-фрагмент (3,3 т. п. о) плазмиды *pCT2T3*, содержащий ген устойчивости к канамицину [10, 11]. Плазмида *pCT2T3* любезно предоставлена Х. Ушимия. Зонд метили ^{32}P в реакции ник-трансляции [10] до удельной активности $3 \cdot 10^6$ нмн·мин $^{-1}$ ·мкг $^{-1}$. ДНК из двух трансформированных линий и контрольного растения гороха линии *I288* выделяли из лиофилизированного листового материала по методу Лихтенштейна и Дрейнера [12]. 4 мкг ДНК гидролизовали рестриктазой *Bam*III и фрагменты разделяли электрофорезом в 1 %-ном агарозном геле в буфере (0,04 М трис-ацетат, 2 мМ ЭДТА, рН 8,0). Для блоттинг-гибридизации использовали нитроцеллюлозный фильтр BA85 («Schleicher and Schuell», ФРГ). Гибридизацию проводили при 68 °С в растворе 10×SSC (1×SSC=0,15 М NaCl, 0,015 М Na-ацетат), 0,1 % Ds-Na, 0,1 % БСА, 0,1 % фикола, 0,1 % поливинилпирролидон, 3 мкг/мл денатурированной ДНК тмуса теленка. После отмывки фильтра [10] его экспонировали с рентгеновской пленкой РТ-1 при —70 °С.

Результаты и обсуждение. Образовавшиеся на среде В5 каллусные ткани культивировали в отсутствие фитогормонов в течение 2—3 месяцев. За это время на каллусах (чаще стеблевого происхождения) начали появляться интенсивно зеленые очаги, которые были перенесены на свежую среду В5 с клафораном и карбенициллином в концентрации 200 мкг/мл. Через некоторое время наблюдали образование кустящихся побегов, а впоследствии — нормальных регенерантов. Всего выделено 12 очагов регенерации. Полученные из них линии сохраняют способность к кущению на безгормональной среде уже более 1,5 года (рис. 1). Протопласты, изолированные из трансформированных побегов, образуют колонии, которые также кустятся на безгормональной среде. В контрольных опытах на средах без фитогормонов морфогенеза не

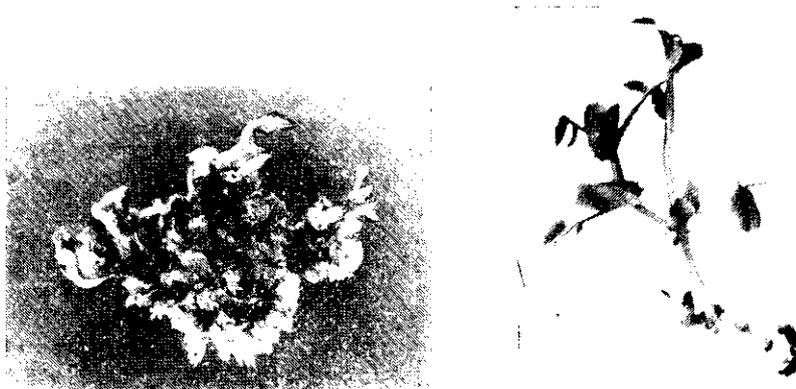


Рис. 1. Образование побегов из трансформированных линий гороха на безгормональной среде

Fig. 1. The formation of shoots from the transformed pea lines on the hormone-free medium

Рис. 2. Нормализованный трансформированный побег гороха

Fig. 2. The normalized transformed pea shoot

наблюдали. А индуцированные в присутствии цитокининов очаги регенерации при перенесении на безгормональную среду не обладали способностью к длительному кущению, со временем они частично превращались в каллус и в дальнейшем некротизировали.

Полученные регенеранты фенотипически неоднородны. У некоторых нарушено апикальное доминирование: вырастая до 2—3 см, побеги начинают интенсивно куститься; некоторые имеют короткие междоузлия; есть линии с плохо развитыми листьями (рис. 2). Большинство побегов независимо от стадии их роста цветет в культуре. Иногда линии завя-

зывают плоды, хотя полноценные семена встречаются редко. Семена хорошо прорастают, образуя корни в культуре, однако попытки переноса их в почву были неудачными. Побеги из «shooty»-регенерантов укореняются с низкой частотой. Их корни очень длинные, тонкие и лишены боковых корешков. Цитологический анализ кончиков корней показал наличие нормального набора хромосом, $2n=14$ (рис. 3). Только в одном случае нам удалось продлить развитие пробирочного растения в почве до цветения и образования плодов. Остальные погибли при пересадке. Более эффективными (около 20 %) оказались прививки регенерантов на подвой согласно описанной методике [13]. Привитые растения нормально развиваются и завязывают плоды.

Повышенная морфогенетическая способность полученных линий гороха обусловлена, по-видимому, интеграцией генов

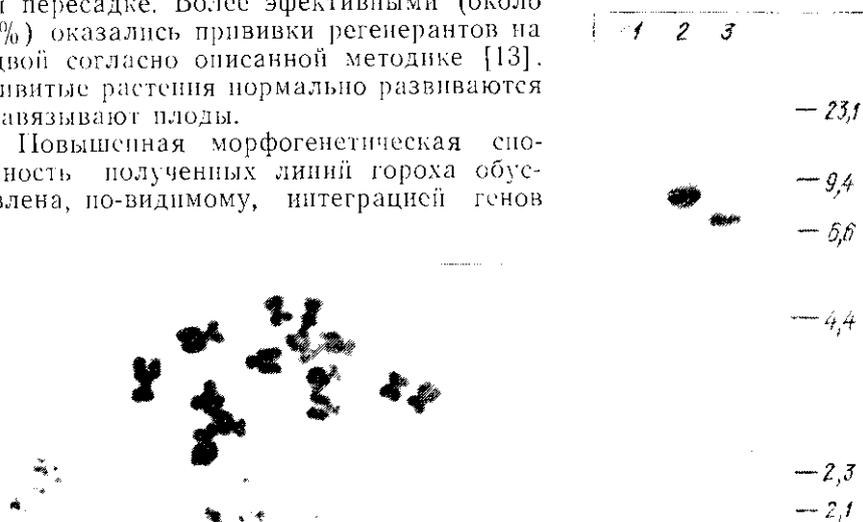


Рис. 3. Метафазная пластинка трансгенного растения гороха ($2n=14$)

Fig. 3. The metaphase plate of the transgenic plant ($2n=14$)

Рис. 4. Блотинг-гибридизация *Bam*HI-фрагментов ДНК трансформированных растений гороха с *Bam*III-*Eco*RI-фрагментом плазмиды *pCT2T3*: 1— контрольное растение; 2— линия А; 3— линия В (размеры даны в т. п. о.)

Fig. 4. Southern blot-hybridization of the *Bam*HI-fragments DNA of the transformed pea with *Bam*III-*Eco*RI-fragment of plasmid *pCT2T3*: 1— control plant, 2— line A, 3— line B

T-ДНК плазмиды *pGV2206*, в первую очередь гена 4 (*tmr*), кодирующего ключевой фермент биосинтеза цитокининов [14], хотя, возможно, определенную роль могут играть и гены с неизвестными функциями — 5, 6а, 7.

Для доказательства интеграции ДНК плазмиды *pGV2206* в геном гороха проводили блотинг-гибридизацию по Саузерну (см. «Материалы и методы»). Ген *NPTII* не содержит сайтов рестрикции для *Bam*III-рестриктазы, именно поэтому ее выбрали для гидролиза ДНК гороха. При гибридизации зондом служил *Bam*HI-*Eco*RI-фрагмент плазмиды *pCT213* (3,3 т. п. о.).

Данные, представленные на рис. 4, служат доказательством интеграции гена *NPTII*, входящего в состав *T*-ДНК плазмиды *pGV2206*, в геном гороха, причем, в случае линии А (2) ген входит в состав *Bam*III-фрагмента (9 т. п. о.), а в случае линии В (3) — в состав *Bam*III-фрагмента (7 т. п. о.). У исходного генотипа гороха никакого положительного сигнала блот-гибридизацией не было обнаружено [1]. Таким образом, можно утверждать, что полученные нами растения гороха действительно являются трансгенными.

Результаты проведенной работы свидетельствуют о возможности значительно улучшить морфогенетический потенциал в культуре *in vitro* у различных видов растений, в том числе и хозяйственно ценных, с использованием генов *T*-ДНК *A. tumefaciens*. Кроме того, открываются новые подходы для изучения возможных путей регенерации растений из дедифференцированных тканей.

GENETIC TRANSFORMATION OF PEA PLANTS MEDIATED
BY AGROBACTERIUM TUMEFACIENS

*E. I. Zubko, N. V. Kuchuk, L. G. Tumanova,
N. A. Vikonskaya, Yu. Yu. Gleba*

Department of Cell Biology and Engineering
of N. G. Kholodny Institute of Botany,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev
Institute of Ecological Genetics,
Academy of Sciences of the Moldavian SSR, Kishinev

Summary

The actively regenerating lines of pea (*Pisum sativum* L.) on the hormone-free B5 medium are selected after cocultivation of shoot and leave segments with the «shooty» mutant of *Agrobacterium tumefaciens* pGV 2206. These lines retain the regeneration ability at least for 18 months. Normalized but phenotypically different shoots are obtained. DNA-DNA hybridization analysis has revealed the presence of the structural *NPT II* gene in the *BamHI*-digested total DNA isolated from pea regenerants. Transgenic shoots grafted on the normal pea plants gave both flowers and seeds.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schell J. St. Transgenic plants as tool to study the molecular organization of plant genes // Science.— 1987.— 237, N 4819.— P. 1176—1182.
2. Пирузян Э. С. Основы генетической инженерии растений.— М.: Наука, 1988.— 340 с.
3. Willmitzer L. The use of transgenic plants to study plant gene expression // Trends Genet.— 1988.— 4, N 1.— P. 13—18.
4. Botterman J., Leemans J. Engineering herbicide resistance in plants // Ibid.— N 8.— P. 219—222.
5. Site-specific mutagenesis of *Agrobacterium Ti* plasmids and transfer of genes to plant cells / J. Leemans, C. Shaw, R. Deblaere et al. // J. Mol. and Appl. Genet.— 1981.— 1, N 1.— P. 149—164.
6. Regeneration of normal and fertile plants that express octopine synthase from tobacco crown galls after deletion of tumor-controlling functions / H. de Greve J. Leemans, J.-P. Hernalsteens et al. // Nature.— 1982.— 300, N 5894.— P. 752—755.
7. Genetic identification of functional of *TL*-DNA transcripts in octopine crown galls / J. Leemans, R. Deblaere, L. Willmitzer et al. // EMBO J.— 1982.— 1, N 1.— P. 147—152.
8. Gamborg O. L., Miller R. A., Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells // Exp. Cell Res.— 1968.— 50, N 1.— P. 151—158.
9. Transformation of *Medicago* by *Agrobacterium* mediated gene transfer / M. Deak, G. B. Kiss, C. Konec, M. Dudits // Plant Cell Repts.— 1986.— 5, N 1.— P. 97—100.
10. Манниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.— 420 с.
11. Expression of a foreign gene in callus derived from DNA-treated protoplasts of rice (*Oryza sativa* L.) / H. Uchimiya, T. Fushimi, H. Hashimoto et al. // Mol. and Gen. Genet.— 1986.— 204, N 2.— P. 204—207.
12. Lichtenstein C. P., Draper J. Genetic engineering of plants // DNA cloning: a practical approach / Ed. D. M. Glover.— Washington: IRL press, 1985.— V. 2.— P. 78.
13. Методические рекомендации по микроклонированию растений гороха в культуре ткани *in vitro*.— М., 1988.— 42 с.
14. Identification of a cloned cytokinin biosynthetic gene / G. F. Barry, S. G. Rogers, R. T. Fraley, L. Brand // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1984.— 81, N 15.— P. 4776—4780.

Ин-т ботаники им. Н. Г. Холодного АН УССР, Киев
Ин-т экол. генетики АН МССР, Кишинев

Получено 12.07.89