



УДК 631.52:636:632.954

О. А. Кравец, Н. Я. Погребняк,
Е. Н. Шиша, С. В. Лопато, Ю. Ю. Глеба

ТРАНСФОРМАЦИЯ РАЗЛИЧНЫХ СОРТОВ КАРТОФЕЛЯ И АНАЛИЗ ПОЛУЧЕННЫХ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ

С помощью *Agrobacterium tumefaciens* трансформировали листовые диски, сегменты стеблей и мини-клубней различных сортов картофеля. Использовали генетические конструкции, содержащие ген неомицинофосфотрансферазы II и мутантный ген ацетолактатсинтазы арабидопсиса. Получены трансгенные растения картофеля сортов Дезирее и Луговской, что подтверждено блотинг-гибридизацией по Саузерну.

Введение. Картофель — одна из важнейших сельскохозяйственных культур — является постоянным объектом исследований. Это объясняется его ценностью для многих отраслей народного хозяйства. Получение высоких и устойчивых урожаев полноценных и здоровых клубней невозможно без правильной и своевременной защиты картофеля от вредителей, болезней и сорняков.

Применение методов генетической трансформации позволяет выращивать растения картофеля с такими ценными свойствами, как устойчивость к вирусной инфекции и гербицидам [1—4].

В экспериментах по трансформации картофеля использовали различные типы эксплантатов: срезы клубней [5—7], диски мини-клубней [8], листовые диски [1, 9, 10], сегменты стеблей [11].

Целью нашей работы было изучение возможности трансформации нескольких ценных и широко распространенных в отечественном сельском хозяйстве сортов (Луговской, Темп, Прикульский ранний и Остара). Мы проверили различные типы эксплантатов, выявляя наиболее подходящий для трансформации материал. Кроме того, был использован хорошо изученный и пригодный для трансформации сорт Дезирее [1, 10].

Трансформацию осуществляли с помощью «обезоруженного» штамма *Agrobacterium tumefaciens*. Применяли конструкции на основе плазмиды *pBIN19*, содержащие мутантный ген ацетолактатсинтазы арабидопсиса, несущий устойчивость к гербицидам (имидазолинонам).

Материалы и методы. Растительный материал. Растения картофеля сортов Луговской, Темп, Прикульский ранний, Остара, Дезирее выращивали в асептических условиях на среде Мурасиге и Скуга (МС) [12]. Для экспериментов по трансформации использовали листовые диски и сегменты стеблей 1,5—2-месячных растений, а также сегменты мини-клубней. Последние получали на среде МС с добавлением 6% сахарозы и 2,5 мг/л кинетина в условиях полной затемненности в течение 1,5 месяцев [13].

Растения табака *Nicotiana tabacum* SR-1 выращивали в асептических условиях на среде МС. Для экспериментов по трансформации использовали листовые диски 1—1,5-месячных растений.

Введение плазмидных векторов в *A. tumefaciens*. В качестве плазмидных векторов применяли две конструкции на основе *pBIN19* [14], содержащие ген неомицинофосфотрансферазы II и мутант-

© О. А. Кравец, Н. Я. Погребняк, Е. Н. Шиша, С. В. Лопато, Ю. Ю. Глеба, 1992

ный ген ацетолактатсинтазы арабидопсиса— *pAC350* и *pAC351*. С помощью метода прямой трансформации [15] конструкции переносили в штамм *A. tumefaciens* C58C1Rif^R p(MP90). Для подтверждения факта переноса данных конструкций в *A. tumefaciens* из него выделяли плазмидную ДНК [15]. Полученной ДНК трансформировали *Escherichia coli* (штамм JM83) и вновь выделяли плазмидную ДНК. Осуществляли рестрикцию плазмидной ДНК с помощью *Bam*HI, электрофорез в агарозном геле и сравнивали выделенную из *E. coli* плазмидную ДНК с исходной.

Трансформация и селекция. Агробактерию выращивали на среде MinA с 50 мг/л канамицина на качалке при температуре 26—28 °С в течение 24—30 ч (до достижения лог-фазы роста — 10⁹ кл/мл).

Картофель трансформировали по методу Де Блок [1] с некоторыми модификациями. Сегменты стеблей, мини-клубней и листовые диски помещали в чашки Петри, содержащие 10 мл жидкой среды S2. В каждую из них добавляли по 50 мкл суспензии агробактерии, достигшей лог-фазы роста. После 2—3 сут кокультивирования эксплантаты отмывали средой S2 с 500 мг/л цефотаксима и помещали на агаризованную селективную среду S3, содержащую 50 мг/л канамицина и 500 мг/л цефотаксима, а затем последовательно переносили на S5 и S7. Образовавшиеся побеги проверяли на способность к корнеобразованию и росту на среде МС с 50 мг/л канамицина и 150 мг/л цефотаксима.

Табак трансформировали по методу Хорша [17] с использованием листовых дисков. Полученные после трансформации побеги высаживали для корнеобразования на среду МС, содержащую 100 мг/л канамицина и 150 мг/л цефотаксима.

Тест на канамицинустойчивость. Все растения после экспериментов по трансформации проверяли на способность к каллусообразованию в присутствии канамицина: сегменты стеблей помещали на поверхность агаризованной среды PS-10 (минеральная основа по МС с добавлением 3 мг/л 2,4-Д, 0,3 мг/л кинстина и 2,5 % сахарозы), содержащей 100 мг/л канамицина.

Блотинг-гибридизация по Саузерну. ДНК из растений картофеля и табака выделяли по методу Деллапорта [18], расщепляли рестриктазой *Eco*RV, фракционировали в 1 %-й агарозе и переносили на нейлоновые фильтры [15]. В качестве зонда использовали *Hind*III-*Bam*HI-фрагмент плазмиды *pGA472* размером 2 тыс. п. н. В других случаях в качестве зонда применяли *Bam*HI-фрагмент плазмиды *pAC351* размером 0,8 тыс. п. н. Фрагменты метили ³²P по методу Фейнберг [19] с помощью набора Random Primed DNA Labelling Kit («Boehringer Mannheim», Германия) до удельной активности 10⁻⁹ имп/мин⁻¹·мкг⁻¹.

Результаты и обсуждение. Конструкции *pAC350* и *pAC351* были интродуцированы в *A. tumefaciens* C58C1Rif^R (*rMP90*), их наличие в данном штамме и идентичность исходным подтверждали с помощью рестрикционного анализа и электрофореза.

Для проверки конструкций *pAC350* и *pAC351* трансформировали табак. Листовые диски кокультивировали с *A. tumefaciens* в течение 2 сут, затем отмывали и помещали на регенерационную среду, содержащую 100 мг/л канамицина и 500 мг/л цефотаксима. 25 дисков использовали для трансформации с помощью *A. tumefaciens*, несущей *pAC351*. После селекции и регенерации получены пять растений табака, растущих и образующих корни в присутствии 100 мг/л канамицина. Блотинг-гибридизацией по Саузерну с использованием в качестве зонда фрагмента плазмиды *pGA472* (2 тыс. п. н.) доказана трансгенная природа этих растений. Результаты анализа трех независимых трансгенных растений табака по сравнению с контролем (нетрансформированное растение) представлены на рис. 1, а. Для трансформации табака с помощью *A. tumefaciens*, несущей *pAC350*, использовали 20 листовых дисков; через 1,5—2 месяца были получены три трансгенных растения.

Таким образом, на модельном объекте трансформация проходила достаточно эффективно при использовании обеих генетических конструкций.

В экспериментах по трансформации различных сортов картофеля также применяли обе генетические конструкции. Листовые диски, сегменты стеблей и мини-клубней после кокультивирования помещали на селективную среду S3 с 50 мг/л канамицина и 500 мг/л цефотаксима. Через 4—6 недель на отдельных эксплантатах образовывалась компактная зеленая каллусная ткань, хорошо растущая в присутствии канамицина, причем это наблюдалось у всех изучаемых сортов. В соответствии с методикой Де Блок эксплантаты последова-

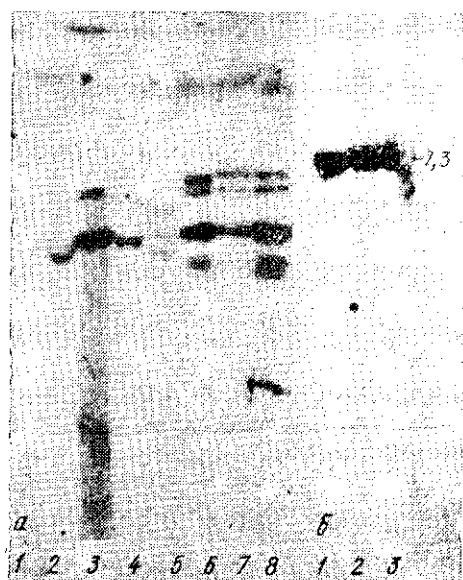


Рис. 1. Блотинг-гибридизация по Саузеру. Обработка рестриктазой *EcoRV* и фракционирование в 1%-й агарозе; а (зонд — фрагмент *pGA472* размером 2 тыс. п. н., меченный ^{32}P): 1 — ДНК нетрансформированного растения табака; 2—4 — ДНК трех независимых линий (1, 2, 4) табака, трансформированных с помощью *pAC351*; 5 — ДНК нетрансформированного растения картофеля; 6—8 — ДНК трех независимых линий (7, 18, 55) картофеля сорта Луговской, трансформированных с помощью *pAC351*; б (зонд — *BamHI*-фрагмент плазмиды *pAC351* размером 0,8 тыс. п. н., меченный ^{32}P): 1—3 — ДНК трех трансгенных линий (7, 18, 55) картофеля сорта Луговской, трансформированных с помощью *pAC351*

тельно переносили на селективные среды S5 и S7. Результаты этих экспериментов представлены в таблице. Через 3—4 месяца были получены регенеранты. У некоторых сортов не удалось добиться регене-

Сравнение эффективности использования различных типов эксплантатов для трансформации картофеля с помощью *A. tumefaciens*, несущей конструкции *pAC350* и *pAC351*

Сорт	Тип эксплантата	Количество эксплантатов	Количество зеленых каллусов на среде с 50 мг/л канамицина	Общее количество регенерантов на среде с 50 мг/л канамицина	Количество линий, укореняющихся на среде с 50—100 мг/л канамицина
<i>pAC351</i> Остара	с.с.	83	—	—	—
	л.д.	77	—	—	—
	м.к.	64	16	13	—
Дезирее	с.с.	75	—	—	—
	л.д.	93	—	—	—
Темп	с.с.	110	16	—	—
	л.д.	84	5	—	—
Прикульский ранний	с.с.	67	4	—	—
	л.д.	78	—	—	—
Луговской	с.с.	81	15	13	5
	л.д.	61	14	4	4
	м.к.	10	3	—	—
<i>pAC350</i> Дезирее	с.с.	88	15	15	7
	л.д.	68	—	—	—

Примечание. с.с. — сегменты стеблей; л.д. — листовые диски; м.к. — сегменты мини-клубней.

рации при использовании данной методики. По нашему мнению, для этих сортов (Темп, Приекульский ранний) необходимо оптимизировать условия селекции и регенерации, исходя из их индивидуальных особенностей.

Все регенеранты высаживали на среду МС, содержащую 50 мг/л канамицина. В этих условиях полностью ингибируется рост и образование корней у нетрансформированных (контрольных) растений. В результате оказалось, что 7 линий сорта Дезирее и 9 линий сорта Лу-

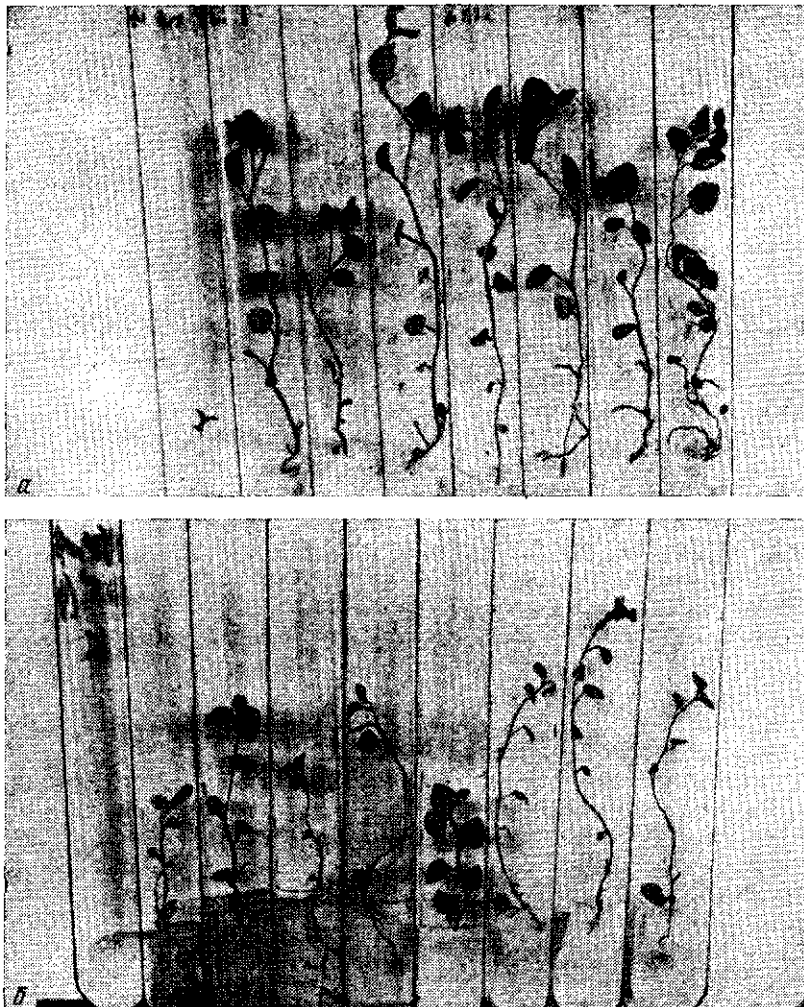


Рис. 2. Трансгенные растения картофеля, растущие в присутствии 50 мг/л канамицина, по сравнению с контролем: а - сорт Дезирее (трансформация с помощью *pAC350*; слева направо: контроль, линии 3, 4, 5, 12, 13, 14, 15); б - сорт Луговской (трансформация с помощью *pAC351*; слева направо: контроль, линии 2, 5, 6, 9, 18, 46, 47, 51)

говской обладали способностью нормально расти и образовывать корни в присутствии 50 мг/л канамицина (рис. 2). По морфологии они не отличались от нетрансформированных растений.

Был проведен тест на каллусообразование в присутствии 100 мг/л канамицина: сегменты стеблей нетрансформированных и полученных после трансформации растений картофеля (сорт Луговской и Дезирее) высаживали на среду для каллусообразования, содержащую 100 мг/л канамицина. Через 3—4 недели эксплантаты растений после трансформации (7 линий сорта Дезирее и 9 линий сорта Луговской) образовали каллус, тогда как нетрансформированные растения были не способны к каллусообразованию в присутствии канамицина.

Таким образом, из всех изучаемых сортов (Приекульский ранний, Остара, Луговской и Тсмп) наиболее подходящим для трансформации оказался сорт Луговской. Эффективность трансформации у сортов Луговской и Дезирее была сходной.

Сравнивая различные типы эксплантатов, мы пришли к выводу о том, что наилучшая ткань для трансформации картофеля — сегменты стеблей (диаметр стебля должен быть не менее 2 мм).

Конструкции *pAC351* и *pAC350*, используемые в данных экспериментах, содержали ген неоминифосфотрансферазы II и мутантный ген ацетолактатсинтазы арабидопсиса. Для доказательства интеграции этих генов в геном картофеля применяли блотинг-гибридизацию по Саузерну.

Суммарную ДНК каждой из полученных после трансформации линий, а также нетрансформированного растения обрабатывали рестриктазой *EcoRV*, фракционировали в 1 %-й агарозе, переносили на нейлоновые фильтры Sartolon и гибридизовали с *HindIII-BamIII*-фрагментом плазмиды *pGA472* (2 тыс. п. н.). Результаты представлены на рис. 1, а.

ДНК растений, полученных после трансформации, гибридизуется с зондом, тогда как в контроле сигнал отсутствует.

Кроме того, в качестве зонда использовали *BamHI*-фрагмент плазмиды *pAC351* (0,8 тыс. п. н.) (рис. 1, б). Все трансгенные растения давали гибридизационный сигнал. Также была доказана трансгенная природа растений картофеля сорта Дезирее, трансформированных с помощью *A. tumefaciens*, несущей *pAC350* (данные не опубликованы).

Таким образом, данные блотинг-гибридизации по Саузерну свидетельствуют об интеграции генов, ответственных за устойчивость к канамизину и гербицидам, в геном растений картофеля.

В результате экспериментов по трансформации с помощью *A. tumefaciens*, несущей конструкции *pAC350* и *pAC351*, получены трансгенные растения табака и картофеля.

Summary. Kanamycin resistant plants of *Solanum tuberosum* L. (cv. Lugovskoy, Desiree) and *Nicotiana tabacum* SR-1 were obtained following the cocultivation of stem segments and leaf discs with *Agrobacterium tumefaciens*. A disarmed binary vector system containing the neomycin phosphotransferase (NPT II) gene and gene encoding mutant acetolactate synthase (ALS) from *Arabidopsis thaliana* was used. Transformation was initiated by the ability of stem segments to initiate callus on medium containing 100 mg/l kanamycin and Southern blot analysis.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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.
2. Глагоцкая Т. П., Щербатенко И. С., Сидоров В. А. и др. Трансгенные растения картофеля, обладающие устойчивостью к вирусной инфекции // Докл. АН УССР.—1990.—№ 10.—С. 57—59.
3. Abstracts VIIIth Int. Congr. on plant tissue and cell culture.—Amsterdam, 1990.—426 p.
4. Newell G. A., Rozman R., Hinchee M. A. et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Solanum tuberosum* L. cv. Russet Burbank // Plant Cell. Repts.—1991.—10, N 1.—P. 30—34.
5. Hoekema A., Huisman M. J., Molendijk L. et al. The genetic engineering of two commercial potato cultivars for resistance to potato virus X // Bio/Technology.—1989.—7, N 3.—P. 273—278.
6. Sheerman S., Bevan M. W. A rapid transformation method for *Solanum tuberosum* using binary *Agrobacterium tumefaciens* vectors // Plant Cell Repts.—1988.—7, N 1.—P. 13—16.
7. Stiekema W. J., Heidekamp F., Louwerse J. D. et al. Introduction of foreign genes into potato cultivars Bintje and Desiree using *Agrobacterium tumefaciens* binary vector // Ibid.—P. 47—50.

8. *Ishida B. K., Snyder G. W., Belknap W. R.* The use of *in vitro*-grown microtuber discs in *Agrobacterium*-mediated transformation of Russet Burbank and Lemhi Russet potatoes // *Ibid.*—1989.— 8, N 6.— P. 325—328.
9. *Tavazza R., Tavazza M., Ordas R. J. et al.* Genetic transformation of potato (*Solanum tuberosum*): an efficient method to obtain transgenic plants // *Plant Sci.*—1988.— 59, N 2.— P. 175—181.
10. *Wenzler H., Mignery G., May G., Park W.* A rapid and efficient transformation method for the production of large numbers of transgenic potato plants // *Ibid.*—1989.— 63, N 1.— P. 79—85.
11. *Twell D., Ooms G.* The 5 flanking DNA of a potato gene directs tuber specific expression of a chimaeric gene in potato // *Plant Mol. Biol.*—1987.— 9, N 4.— P. 365—375.
12. *Murashige T., Scoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.*—1962.— 15, N 13.— P. 473—497.
13. *Bourgue J. E., Miller J. C., Park W. D.* Use of an *in vitro* tuberization system to study tuber protein gene expression // *In vitro cell. and develop. biol.*—1987.— 23, N 5.— P. 381—386.
14. *Bevan M. W.* Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation // *Nucl. Acids Res.*—1984.— 12, N 22.— P. 8711—8721.
15. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д.* Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.— 479 с.
16. *Koncz C., Schell J.* The promoter of T_L-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector // *Mol. and Gen. Genet.*—1986.— 204, N 2.— P. 383—396.
17. *Horsch R. B., Fry J. E., Hoffman N. L. et al.* A simple and general method for transferring genes into plants // *Science.*—1985.— 227.— P. 1229—1231.
18. *Dellaparte S. L., Wood J., Hicks J. B.* A plant DNA miniprep. Version II // *Plant Mol. Biol. Rep.*—1983.— 1.— P. 19—21.
19. *Feinberg A. P., Vogelstein B.* A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity // *Anal. Biochem.*—1984.— 137, N 2.— P. 266—267.

Ин-т клеточ. биологии и генет. инженерии АН Украины, Киев

Получено 18.06.92