

УДК 602.6:58:581.08.573.6

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ *VACCINIUM VITIS-IDAEA* L.

О.В. ЧИЖИК, В.Н. РЕШЕТНИКОВ, Т.В. АНТИПОВА

Государственное научное учреждение «Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси»
220012 Минск, ул. Сурганова, 2в
e-mail: chizhikolga@gmail.com

Разработана эффективная методика генетической трансформации *Vaccinium vitis-idaea* L., в которой определены тип эксплантата, индукторы *vir*-генов, чувствительность эксплантатов к селективным и бактериостатическим антибиотикам, стратегия селекции трансформантов. На основе разработанной методики впервые получены трансгенные растения брусники обыкновенной сорта Red Pearl.

Ключевые слова: *Vaccinium vitis-idaea* L., *Agrobacterium tumefaciens*, генетическая трансформация, экспрессия генов, ПЦР-анализ.

Голубика высокорослая, клюква крупноплодная, брусника сортовая — интродуцированные в Беларуси древесно-кустарниковые виды рода *Vaccinium* — широко используются в пищевой и медико-фармацевтической промышленности. В отделе биохимии и биотехнологии растений Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси комплексно изучаются представители рода *Vaccinium*: биология и биохимия, регенерационный потенциал, генетическая стабильность в культуре *in vitro*. Ведутся работы по паспортизации и сортовой идентификации получаемого растительного материала, а также исследованием направленные на создание новых форм растений с использованием генно-инженерных методов. Разработаны методики генетической трансформации представителей древесно-кустарниковых видов рода *Vaccinium* — голубики высокорослой (*Vaccinium corymbosum* L.), клюквы крупноплодной (*Vaccinium macrocarpon* Ait).

Древесные плодово-ягодные культуры — сложные объекты для генно-инженерной модификации. Отсутствие эффективных методик генетической трансформации обусловило новизну и актуальность работы.

Генетическая трансформация с использованием *Agrobacterium* — основная технология производства генетически модифицированных растений [4]. При разработке методик генетической трансформации важно оценить критические факторы, каждый из которых влияет на частоту трансформации и нуждается в оптимизации [8]. Одним из основных критериев для подтверждения интегративной трансформации является анализ, обнаруживающий отличный от контаминирующих бактериальных клеток продукт экспрессии трансгена. Например, для таких анализов удобны GUS-интрон и регулирующие антоцианы репортерные системы [3, 6].

Целью наших исследований была разработка эффективной методики транзientной и стабильной трансформации для растений брусники обыкновенной.

Методика

Для достижения поставленной цели генетической трансформации представителя ягодных культур рода *Vaccinium* — брусники обыкновенной (*Vaccinium vitis-idaea* L.) использовали стабилизированные асептические культуры побегов, перспективных для промышленного выращивания на территории Беларуси сортов из коллекции Центрального ботанического сада НАН Беларуси (Red Pearl, Ammerland, Koralle). Асептические культуры брусники обыкновенной поддерживали пассированием на свежие питательные среды для размножения на основе WPM [7] с добавлением 5 мг/л 2иП + 1 мг/л ИУК.

Чтобы подобрать условия, оптимальные для максимального инфицирования эксплантатов агробактериальным штаммом СВЕ21, проведен анализ транзientной экспрессии репортерного гена GUS. Для этого эксплантаты инфицировали штаммом *A. tumefaciens* СВЕ21, содержащим бинарный вектор p35SGUSint. Такой вектор имеет ген *uidA*, кодирующий фермент β-глюкуронидазу, но с модифицированным интроном PIV2 из картофельного гена *ST-LS1* в своей 5'-концевой части. Транзientную экспрессию GUS анализировали сразу же после кокультивирования эксплантатов с *A. tumefaciens* по [5] на основе подсчета числа экспрессирующих GUS зон, проявляющихся как голубые очаги и локусы на эксплантатах.

В ходе работы оптимизированы кислотность среды и температура на начальных этапах трансформации, определены время инокуляции и кокультивирования, чувствительность эксплантатов к селективным и бактериостатическим антибиотикам, влияние индукторов генов вирулентности *A. tumefaciens* на эффективность *Agrobacterium*-опосредованной трансформации, предложены системы селективного отбора потенциально трансгенных растений. Тотальную геномную ДНК линий, отселектированных после трансформации, выделяли по [1], ПЦР-анализ осуществляли по [2]. Состав готовой RAPD-ПЦР-смеси объемом 25 мкл: 0,2 мМ dNTP (Fermentas); однократный буфер для Taq-полимеразы (Fermentas); 3,5 мМ MgCl₂; 10 пкмоль праймера; 1,5 U Taq-полимеразы (Fermentas); 50 нг ДНК. Амплификацию осуществляли на Mastercycler personal фирмы «Eppendorf». Продукты ПЦР-анализа визуализировали методом горизонтального электрофореза в 2 %-м агарозном геле (Sigma).

Результаты и обсуждение

В ходе разработки методики трансформации растений брусники (*Vaccinium vitis-idaea* L.) были подобраны условия инокуляции и кокультивирования эксплантатов со штаммом *A. tumefaciens*, несущим векторную конструкцию. Оптимальное время инокуляции с агробактерией составило 1 ч. Максимальная частота трансформации (13,6 %) наблюдалась после 6 сут кокультивирования с агробактерией.

Изучено влияние индукторов генов вирулентности *A. tumefaciens* (моносахаров глюкозы, арабинозы и ацетосирингона) на эффективность *Agrobacterium*-опосредованной трансформации ягодных культур рода

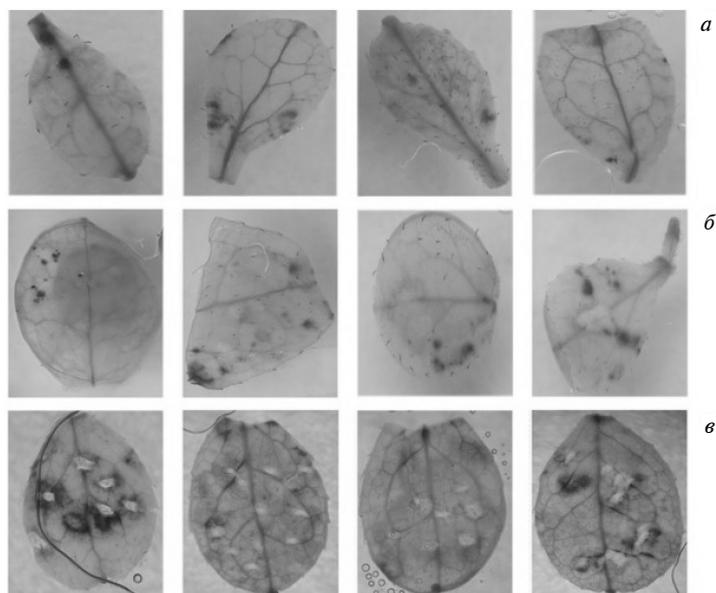


Рис. 1. Влияние ацетосирингона на транзистентную экспрессию GUS в листовых эксплантатах брусники обыкновенной сорта Red Pearl:

a — контроль; *б* — ацетосирингон при инокуляции; *в* — ацетосирингон при инокуляции и кокультивировании

Vaccinium. Наиболее высокие показатели (частота регенерации, число регенерантов на эксплантат), повышающие эффективность агробактериальной трансформации, получены при использовании арабинозы и ацетосирингона (рис. 1).

Влияние ацетосирингона проявлялось не только при инокуляции, но и при кокультивировании, при этом уровень транзистентной экспрессии GUS у эксплантатов для сортов брусники Red Pearl, Ammerland и Kogalle составил соответственно 45,6, 39,8 и 70,3 %.

Одним из способов ослабления негативного ответа растительной клетки на инфицирование агробактерией и повышения выхода трансгенных растений является использование в процессе трансформации веществ, обладающих антиоксидантным действием, таких как цистеин и нитрат серебра. Показано, что для восстановления растительных клеток после инфицирования и повышения количества регенерантов, устойчивых к селективному антибиотику после генетической трансформации, целесообразно использовать эти антиоксиданты.

Определить наличие трансформированных побегов можно по их способности к корнеобразованию на селективной среде после отделения от эксплантата.

Маркером трансформации обычно является устойчивость к антибиотику канамицину (Km), которую обеспечивает ген *nptII*, содержащийся в векторных конструкциях и кодирующий бактериальный фермент неомисинфосфотрансферазу-II. Последний катализирует *o*-фосфорилирование ряда аминогликозидных антибиотиков.

Чувствительность различных культур рода *Vaccinium* к селективному агенту, добавляемому в питательные среды, сильно варьирует. В связи с этим была исследована степень влияния селективного антибиотика

Km на каллюсообразование, адвентивную регенерацию из листовых эксплантатов и укоренение побегов брусники.

В ходе экспериментов установлена высокая чувствительность эксплантатов всех видов семейства Брусничные к этому антибиотику. Определены концентрации Km, подавляющие регенерацию адвентивных побегов, каллюсообразование и укоренение. Для всех сортов брусники некроз всех эксплантатов происходил при концентрации Km 20 мг/л. Таким образом, для первичной селекции брусники после регенерации адвентивных побегов на эксплантате необходимо использовать питательную среду, содержащую 20 мг/л Km, для дальнейшего укоренения регенерантов — 50 мг/л Km, для размножения и поддержания отобранных линий — 100 мг/л Km.

Предложена стратегия селекции растений генетически модифицированных линий (потенциально трансгенных растений) для быстрого отбора трансформантов. Согласно разработанной схеме, тестирование включает следующие этапы: первичный отбор на основании визуального анализа адвентивных регенерантов, прошедших селекцию по маркерам трансформации в течение пассажа после проведения трансформации (6–8 недель); укоренение побегов на соответствующей среде, содержащей дозу селективного агента, блокирующую адвентивное корнеобразование. Отселектированные на среде с летальной дозой антибиотика линии были размножены в течение двух пассажей для дальнейших работ.

Для подтверждения интеграции гетерологичной последовательности в геном брусники проводили ПЦР-анализ на наличие двух генов: гена неомизинфосфотрансферазы (*nptII*, рис. 2) и гена β-глюкуронидадсинтазы (*uidA*).

Согласно данным ПЦР-анализа, в линиях RPgus28, RPgus36 так же, как и в положительном контроле, электрофоретически детектируется продукт амплификации гена *nptII* размером порядка 741 пн (см. рис. 2).

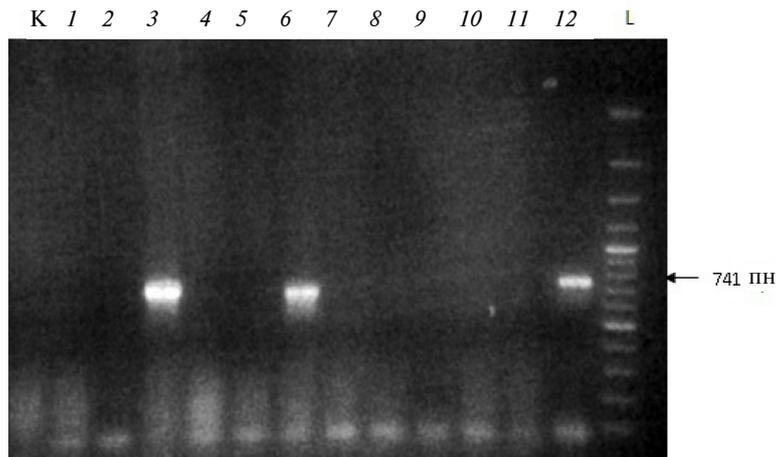


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК брусники с праймерами к генам: К — нетрансформированный контроль; 1–11 — амплификация с праймерами на ген *nptII* линий RPgus26, RPgus27, RRgus28, RPgus34, RPgus35, RPgus36, AMgus1, AMgus5, AMgus6, AMgus11, KORgus1 соответственно; 12 — положительный контроль (*A. tumefaciens*); L — маркер размеров ДНК (100 bp DNA Ladder Plus, Fermentas)

ПЦР-анализ при наличии праймеров, комплементарных гену *uidA*, кодирующему β-глюкуронидадсинтазу, показал амплификацию фрагмента ожидаемой длины (порядка 1105 пн) в тех же двух линиях (RPgus28, RPgus36) брусники обыкновенной сорта Red Pearl, что подтверждает их трансгенную природу.

Наряду с селективными антибиотиками при использовании агробактерий в качестве трансформирующих векторов необходимо применять и бактериостатические антибиотики, которые, с одной стороны, обеспечивают полную гибель агробактерий, с другой — являются нетоксичными для растительных тканей исследуемых культур.

Определены оптимальные концентрации антибактериальных агентов цефотаксима и карбеницилина, которые ингибируют рост бактерий и не подавляют регенерацию побегов. Установлено, что для сортовой брусники целесообразнее использовать карбеницилин.

Трансгенные линии, в тканях которых агробактериальная контаминация не визуализировалась, были размножены и использованы для последующего ПЦР-анализа на наличие *virG* гена.

ПЦР-анализом препаратов геномной ДНК полученных трансгенных линий установлено, что во всех тестируемых образцах так же, как и в отрицательном контроле, последовательность гена *virG* (383 пн) не детектируется. Это свидетельствует о том, что в растительных тканях трансгенных линий брусники латентная агробактериальная инфекция отсутствует.

Функциональность экспрессирующей кассеты 35S-*uidA*-3'-nos, интродуцированной в растения брусники, анализировали гистохимическим окрашиванием листовых пластинок трансгенных растений. Стабильная экспрессия репортерного гена в растениях трансгенных линий брусники подтверждена наличием активности глюкуронидазы (рис. 3).

Таким образом, разработана эффективная методика переноса гетерологичных генов в геном представителя ягодных культур рода *Vaccinium* — брусники сортовой. Оптимизированы условия генетической трансформации с помощью супервирулентного штамма *Agrobacterium tumefaciens*, включающие: тип бактериостатического и оптимальных доз селективного антибиотиков; состав среды (гормональный состав, нали-

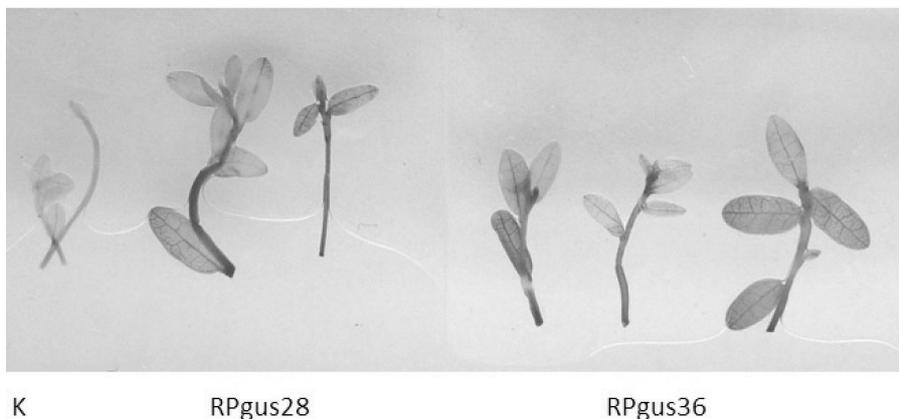


Рис. 3. Экспрессия гена GUS в трансгенных линиях брусники обыкновенной сорта Red Pearl:

К — нетрансформированные побеги; RPgus28, RPgus36 — трансгенные линии

чие экзогенных индукторов *vir*-генов и хемиаттрактантов) на этапах инокуляции и кокультивирования с агробактерией, физические условия трансформации и условия селективного отбора трансформантов. Выделены и обоснованы основные этапы тестирования генетически модифицированных растений, определена их последовательность. На основе разработанных нами методик впервые получены трансгенные растения брусники обыкновенной сорта Red Pearl.

1. Дрейнер Дж., Скотт Р., Армидж Ф. и др. Генная инженерия растений: Лабораторное руководство. — М.: Мир, 1991. — 408 с.
2. Сиволан Ю.М. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях. — Киев: Аграрна наука, 1998. — С. 31—32.
3. Chan M.-T. et al. *Agrobacterium*-mediated production of transgenic rice plants expressing a chimeric alpha-amylase promoter/beta-glucuronidase gene // Plant Mol. Biol. — 1993. — **22**. — P. 491—506.
4. http://www.biotechnolog.ru/ge/ge12_4.htm, дата доступа 06.03.2017 г.
5. Jefferson R.A. GUS-fusion: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants // EMBO J. — 1987. — **6**. — P. 3901—3907.
6. Kanik T., Tzifira T., Kapulnik Y. et al. Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2001. — **98**. — P. 1871—1876.
7. Lloyd G., McCown B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture // Comb. Proc. Intl. Plant Prop. Soc. — 1980. — **30**. — P. 421—427.
8. Potrykus I. Gene transfer to plant: Assessment of published approaches and result // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. — 1991. — **42**. — P. 205—225.

Получено 14.12.2017

ГЕНЕТИЧНА ТРАНСФОРМАЦІЯ *VACCINIUM VITIS-IDAEA* L.

О.В. Чижик, В.Н. Решетников, Т.В. Антипова

Державна наукова установа «Центральний ботанічний сад Національної академії наук Білорусі», Мінськ

Розроблено ефективну методику генетичної трансформації *Vaccinium vitis-idaea* L., в якій визначено тип експлантатів, індуктори *vir*-генів, чутливість експлантатів до селективних й бактериостатичних антибіотиків, стратегію селекції трансформантів. На основі розробленої методики вперше отримано трансгенні рослини брусниці звичайної сорту Red Pearl.

GENETIC TRANSFORMATION OF *VACCINIUM VITIS-IDAEA* L.

O.V. Chizhik, V.N. Reshetnikov, T.V. Antipova

The State Scientific Institution «The Central Botanical Garden of National Academy of Sciences, Belarus»
2v Surganova St., Minsk, 220012, Belarus

An effective method of *Vaccinium vitis-idaea* L. genetic transformation has been elaborated. In this method the type of the explant, the *vir*-gene inducers, the explants' sensitivity to selective and bacteriostatic antibiotics, and the strategy of the transformants selection have been defined. Transgenic plants of *Vaccinium vitis-idaea* L. (Red Pearl cultivar) have been received for the first time.

Key words: *Vaccinium vitis-idaea* L., *Agrobacterium tumefaciens*, genetic transformation, expression gene, PCR-analysis.