

УДК 635.64:577.21

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ ТОМАТА
(*SOLANUM LYCOPERSICUM* L.) ГЕНАМИ
ЗАЩИТНЫХ ХИТИНСВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ
И АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ

М.Р. ХАЛИЛУЕВ¹, П.Н. ХАРЧЕНКО¹, С.В. ДОЛГОВ^{1,2}

(* Всероссийский НИИ сельскохозяйственной биотехнологии
Россельхозакадемии, ² Филиал института биоорганической химии
имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН)

Проведена агробактериальная трансформация томата хозяйственно ценной селекционной линии ЯЛФ с целью повышения устойчивости к биотическим стрессам. В исследовании были использованы векторные конструкции, несущие растительные гены хитинсвязывающих белков (*ac* и *Rs-intron-Shir*) и антимикробных пептидов (*amp1* и *amp2*). Получены трансгенные растения томата и проведена оценка эффективности трансформации при использовании каждого из перечисленных выше генов. Интеграция чужеродных генов в растительный геном подтверждена методом ПЦР-анализа. Трансгенные регенеранты были адаптированы к условиям *in vivo* и выращены в условиях защищенного грунта для получения T1 поколения и последующего выделения гомозиготных линий, а также проведения испытаний на устойчивость к фитопатогенам.

Ключевые слова: томат, регенерация, агробактериальная трансформация.

Генетическая инженерия растений является составной частью современной с.-х. биотехнологии и в настоящее время находит все большее практическое применение для получения ценных генотипов, обладающих новыми или улучшенными агрономическими характеристиками. Применение трансгенных форм растений позволяет существенно повысить окупаемость с.-х. производства, резко сократить загрязнение окружающей среды пестицидами, а также, во многих случаях, реализовать потенциальную урожайность растений.

Устойчивость к биотическим стрессам и, в частности, к грибным и бактериальным патогенам — одно

из приоритетных требований, предъявляемых к современным сортам и гибридам томата. Несмотря на достигнутые успехи в получении генотипов с повышенной устойчивостью к отдельным болезням, проблема комплексной устойчивости к неблагоприятным факторам биотической природы по-прежнему остается неразрешенной. Это относится также и к наиболее опасным болезням, таким как фитофтороз и ряду других, поражение которыми в годы эпифитотий вызывают существенные потери урожая (60% и более) и снижение качества товарной продукции [2]. Причинами отсутствия решения данной проблемы является генетическая сложность признака,

постоянные эволюционные процессы в системе хозяин — патоген, а также возникновение высоковирулентных биотипов патогенов на фоне применения повышенных объемов химических средств защиты.

Классический селекционно-генетический путь повышения устойчивости растений к болезням основан на передаче растениям культурного сорта новых генов путем их скрещивания с дикими формами. Однако этот подход трудоемок, требует многолетней работы и ограничен возможностями близкородственного скрещивания. Методы генетической инженерии позволяют интегрировать в хромосомы растительной клетки гены любого происхождения (других растений, животных, насекомых, бактерий, вирусов). Установление молекулярной природы защитных механизмов у растений дало возможность разработать новые стратегии борьбы с заболеваниями в дополнение к существующим традиционным подходам. Одной из них является привнесение в геном растений и, в частности, томата чужеродных генов, кодирующих защитные PR-белки (pathogenesis-related protein) и антимикробные пептиды.

В настоящее время различают 14 классов растительных PR-белков и 9 классов антимикробных пептидов по сходству аминокислотных последовательностей, биохимическим характеристикам, биологической активности и клеточной локализации [3, 11, 12]. Все защитные белки и пептиды характеризуются сравнительно небольшим размером, являются положительно заряженными, содержат значительное количество остатков цистеина, стабилизирующих третичную структуру за счет образования дисульфидных связей, число которых в зависимости от вида составляет от 2 до 8. Эти классы включают как индуцируемые, так и конститутивные формы белков. В качестве индукторов могут

выступать компоненты клеточного метаболизма, например, гормоны и органические кислоты [5, 10]. Следует отметить, что в процессе развития растения один и тот же PR-белок или антимикробный пептид может образовываться в специфичных тканях, а также накапливаться в других тканях в ответ на воздействие патогена.

В результате многочисленных исследований было установлено, что многие представители PR-белков и антимикробных пептидов в микромолярных концентрациях проявляют высокую активность в условиях *in vitro* против ряда бактериальных и грибных фитопатогенов, которая сравнима с применением химических препаратов [3, 5, 12]. Некоторые из них не оказывают токсического воздействия на клетки животных и человека, что является весьма важным аспектом в отношении биобезопасности трансгенных растений.

В последние годы в литературных источниках появляется все большее число сообщений об успешной интродукции генов защитных белков и антимикробных пептидов в геном томата. Однако описанные эксперименты проводились преимущественно на модельных образцах, не представляющих коммерческого значения. Целью нашего исследования являлось получение трансгенных растений томата, обладающего хозяйственно ценными признаками и содержащего гены защитных хитинсвязывающих (PR-4) белков и антимикробных пептидов, для повышения устойчивости к грибным и бактериальным фитопатогенам.

Материалы и методы

Растительный материал. В качестве растительного материала для экспериментов была использована перспективная селекционная линия томата ЯЛФ, полученная из сорта Ямал и используемая в качестве отцовской линии при получении гиб-

рида F1 Юниор (любезно предоставлена Г.Ф. Монахосом). Для введения томата в культуру *in vitro* использовали семена, которые подвергали поверхностной стерилизации в течение 30 с в 70%-м этаноле, а затем 7—8 мин в 20%-м водном растворе коммерческого препарата «АСЕ» с добавлением 0,01% детергента Tween 20. Стерилизованные семена 3—4 раза промывали автоклавированной дистиллированной водой и помещали в культуральные сосуды с питательной средой, составленной по прописи Мурасиге-Скуга (MS) [8] и содержащей 3% сахарозы и 0,7% агара. Растения и экспланты культивировали при температуре 23~25°C, освещенности 2500 лк и фотопериоде 16/8 ч (день/ночь).

Генетическая трансформация.

Для генетической трансформации томата были использованы бинарные векторы, содержащие гены хитинсвязывающих белков и антимикробных пептидов, сконструированные во ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии Россельхозакадемии и любезно предоставленные А.В. Бабаковым, В.Г. Луниным и А.А. Гулевичем (рис. 1). Бинарные векторы pB1121ac и pR830 содержат соответственно хитинсвязывающий ген *ac* из *Amaganthus caudatus* и гибридный ген *RS-intron-Shir*, кодирующий сигнальную последовательность и первые шесть аминокислот дефензина редьки (Rs) с интроном, и хитинсвязывающий белок из *Amaranthus retriflexus* (Shir). Бинарный вектор pB-AMP2 содержит ген *amp2*, кодирующий лидерный пептид, два антимикробных пептида (SmAMP1 и SmAMP2), разделенных спейсером, и С-концевую часть из звездчатки (*Stellaria media*). В отличие от pB-AMP2, несущего полную копию кДНК гена звездчатки, pB-AMP1 содержит ген *amp1*, кодирующий только лидерную последовательность и один из антимикробных пептидов (SmAMP1). Плазмиды с генами хитинсвязывающих белков и

антимикробных пептидов были интродуцированы в обезоруженные супервирулентные штаммы *Agrobacterium tumefaciens* CBE21 и AGL0 соответственно. Все целевые гены находились под контролем сильного конститутивного промотора 35S РНК вируса мозаики цветной капусты (*CaMV35S*). Для отбора трансгенных растений векторные конструкции содержали селективный ген *nptII*, обуславливающий устойчивость к антибиотику канамицину.

Эксперименты по трансформации растений томата проводили методом кокультивации эксплантов с суспензией агробактерии. Ночную культуру агробактерии наращивали в 20 мл жидкой среды Лурия-Бертани (LB) [9], дополненной соответствующими селективными антибиотиками, на качалке (180 мин⁻¹) в течение 24 ч при 28°C в темноте. Затем ее разбавляли жидкой средой MS, не содержащей фитогормонов, до финальной концентрации, соответствующей оптической плотности, равной 0,4~0,6. Полученную суспензию применяли для инфицирования эксплантов.

В экспериментах по трансформации использовали семядоли 12-дневных проростков. За трое суток до инфицирования экспланты помещали на агаризованную питательную среду MS, дополненную 5 мг/л 6-бензиламинопурина (6-БАП) и 0,1 мг/л индолилуксусной кислоты (ИУК). После этапа прекультивации у семядолей отсекали небольшую часть у основания и верхушки, а на абаксиальную поверхность наносили 2-5 поперечных надсечек, после чего переносили в подготовленную бактериальную суспензию и, периодически перемешивая, выдерживали в течение 30 мин. Подсушенные на воздухе экспланты переносили на бумажные фильтры, помещенные на поверхность чашки Петри со средой MS, и кокультивировали в темноте при температуре 18°C в течение 48 ч. После

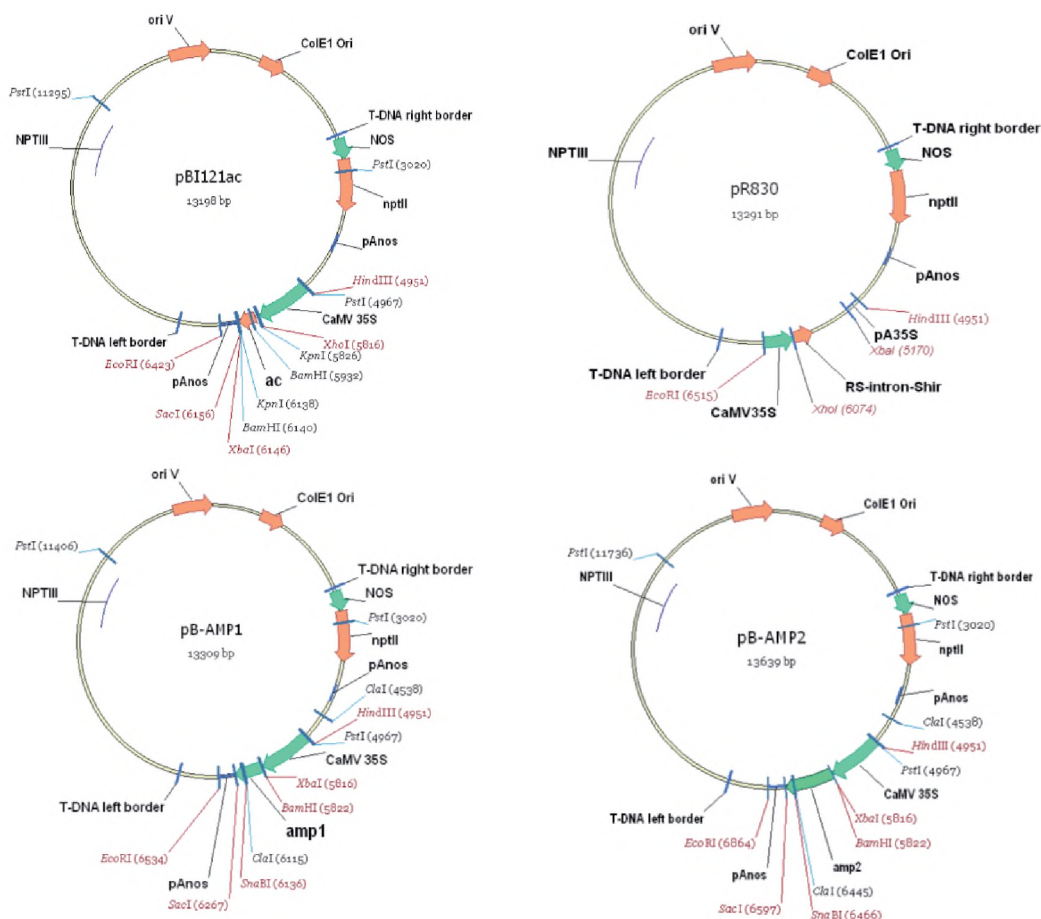


Рис. 1. Карты бинарных векторов pBI121 ac, pR830, pB-AMP1 и pB-AMP2: *T-DNA left, right border* — левая и правая фланкирующие последовательности Т-ДНК; *NOS* и *pAnos* — промотор и терминатор гена нопалинсинтазы; *CaMV35S* и *pA35S* — промотор и терминатор 35S РНК вируса мозаики цветной капусты; *ac*, *RS-intron-Shir*, *amp1* и *amp2*— целевые гены; *nptII* — ген неомизинфосфотрансферазы II; *nptIII* — ген неомизинфосфотрансферазы III; *ori V*—сайт инициации репликации

периода кокультивации семядоли отмывали жидкой средой MS с добавлением 300 мг/л тиментина (тикарциллин + клавулановая кислота) для элиминации агробактерии и переносили на питательную среду MS, дополненную 5 мг/л 6-БАП, 0,01 мг/л ИУК и 300 мг/л тиментина, для каллусо- и морфогенеза. В последующих пассажах для отбора трансгенного каллуса в состав питательной среды вводили селективный антибиотик

канамицин в концентрации от 10 до 25 мг/л. Длительность каждого пассажа составляла 15 дней. По достижении регенерирующих предположительно трансгенных побегов размера 1,5 см их отделяли от каллусной ткани и переносили на среду для ризогенеза, содержащую 1/2 дозы макросолей от прописи MS, 2% сахарозы, 0,7% агара, 0,2 мг/л индолилмасляной кислоты и канамицин в концентрации 50 и 100 мг/л.

Молекулярно-генетический анализ. Выделение тотальной геномной ДНК из предположительно трансгенных растений осуществляли по методике Edwards с соавт. [6] с дополнительной экстракцией фенолом. Подтверждение интеграции чужеродных генов проводили с помощью ПЦР-анализа. Интеграцию в растительный геном селективного гена *nr11* определяли при помощи следующей пары праймеров: 5'-CGCGGGTTTCTGGAGTTAAT-GAGCTAAG-3' и 5'-GCATGCGCGC-STTGAGCCTGG-3'; ожидаемый размер амплифицируемого фрагмента — 742 п.н. Для идентификации присутствия гена *ac* использовали праймеры к последовательности промотора *CaMV35S* (5'-CTGCCGACAGTGGTCCAAAGATGGACCC-3') и целевого гена (5'-TTGAACACATTCACCAACTCCCATAGAT-3'). Для амплификации последовательности гена *Rs-intron-Shir* использовали олигонуклеотиды на лидерную часть гибридного гена (5'-CTCTCTTCTAGAATGGCTAAGT-TTGCTTCTATCGTC-3') и терминатора *pA35S* (5'-TGTCACTGGATTTTG-GTTTTAGGAA-3'). Размеры амплифицируемых фрагментов составляли соответственно 300 и 1050 п.н. Интеграцию генов антимикробных пептидов определяли при помощи пары праймеров 5'-TCATTCCATAGACTT-GTTTATGA-3' и 5'-CTTACATACAAAGCTAGTCAC-3'. Размеры амплифицируемых фрагментов у образцов, трансформированных конструкцией pV-AMP1 и pV-AMP2, составляли соответственно 445 и 765 п.н. Реакцию проводили на амплификаторе MJ Mini™ Personal Thermal Cycler (Bio-Rad, США). Продукты ПЦР-анализа разделяли в электрофорезной камере фирмы Hoeffer (США) в 1%-м агарозном геле с добавлением этидиум бромид. Визуализацию продуктов амплификации осуществляли в проходящем ультрафиолетовом свете трансиллюминатора. Размеры амплифицированных фрагментов опреде-

ляли, используя в качестве маркера GeneRuler™100 bp Plus DNA ladder (Fermentas).

Результаты и их обсуждение

В рамках исследования была проведена серия экспериментов по трансформации томата методом кокультивации с использованием *Agrobacterium tumefaciens*. Одним из основных этапов генетической трансформации является эффективная доставка векторных конструкций в клетки-мишени, компетентные к регенерации растений. Проникновение чужеродной ДНК вызывает повреждения в клетке-хозяине, что обуславливает существенное снижение степени выживаемости растительной ткани. Кроме того, высокая чувствительность эксплантов томата к селективным агентам влечет за собой существенную потерю морфогенетического потенциала в результате ингибирования закладки регенерационных зон даже у трансгенных клеток [1]. В связи с этим нами была использована стратегия постепенной адаптации эксплантов к селективному агенту, исключаяющая их шок и массовую гибель (первый пассаж без канамицина, второй — 10 мг/л, третий и последующие — 25 мг/л). После инфицирования бактериальной суспензией и кокультивирования экспланты помещали на среду для каллусообразования и регенерации, в результате чего в конце пассажа по краям срезов и в местах поранений наблюдалось формирование светлой плотной каллусной ткани. Отмечено, что экспланты, трансформированные бинарными векторами, несущими гены хитинсвязывающих белков *ac* и *Rs-intron-Shir*, отличались меньшей способностью к формированию каллуса по сравнению с семядолями, трансформированными pV-AMP1 и pV-AMP2 (таблица).

Несмотря на относительную легкость получения каллусных тканей,

**Эффективность каллусообразования и селекции эксплантов семядолей
при трансформации генетическими конструкциями,
несущими гены хитинсвязывающих белков и антимикробных пептидов**

| Бинарный вектор | Количество эксплантов | | | | | | | | | |
|-----------------|-----------------------|-----|---------------------|------|-------------|------|---------------|------|--------------------|------|
| | общее | | образовавших каллус | | погибших | | | | прошедших селекцию | |
| | шт. | % | шт. | % | от бактерии | | от канамицина | | шт. | % |
| | | | | | шт. | % | шт. | % | | |
| pBI121ac | 90 | 100 | 58 | 64,4 | 19 | 21,1 | 65 | 72,2 | 6 | 6,7 |
| pR830 | 120 | 100 | 69 | 57,5 | 7 | 5,8 | 103 | 85,8 | 10 | 8,4 |
| pV-AMP2 | 125 | 100 | 109 | 87,2 | 38 | 30,4 | 70 | 56,0 | 17 | 13,6 |
| pV-AMP1 | 115 | 100 | 96 | 83,5 | 30 | 26,1 | 72 | 62,6 | 13 | 11,3 |

регенерация из них полноценных трансгенных побегов оказалась более трудной задачей. После переноса эксплантов на питательную среду с добавлением 10 мг/л селективного антибиотика происходило снижение интенсивности нарастания каллусных тканей, их частичная некротизация, причем степень ее значительно усиливалась при возрастании концентрации канамицина в последующих пассажах. Побег, регенерировавший на ранних этапах культивирования, впоследствии проявлял признаки хлороза и не были трансгенными. В то же время на образовавшейся каллусной ткани некоторых эксплантов происходило формирование плотных зеленых глобулярных меристематически активных участков, не проявляющих признаков отрицательного воздействия селективного агента и интенсивно нарастающих на среде, содержащей канамицин в концентрации, летальной для нетрансгенной ткани (25 мг/л). Тем не менее, высокая чувствительность эксплантов и каллуса к селективному антибиотику являлась причиной гибели большей части растительной ткани, которая в зависимости от генетической конструкции составила от 56,0 до 85,8%. Кроме того, во всех экспериментах наблюдалась бактериальная контаминация части эксплантов, которая

также служила причиной исключения их из дальнейшего культивирования.

Вынужденное длительное культивирование растительных тканей на питательных средах с целью получения регенерантов, устойчивых к канамицину, способствовало постепенному накоплению веществ токсического действия (фенольных соединений), что приводило к формированию растений с измененной морфологией. Наблюдались такие нежелательные эффекты, как подавление пролиферации пазушных меристем, образование витрифицированных побегов и, как следствие, уменьшение или полная потеря способности регенерантов к укоренению. О механизмах витрификации и нарушениях нормального развития растений в культуре ткани единого мнения нет. Одни исследователи в качестве причины называют высокий водный потенциал агаризованной среды, другие — длительное использование высоких концентраций цитокининов [4, 7].

В результате экспериментов по генетической трансформации бинарными векторами pBI121ac, pR830, pV-AMP2 и pV-AMP1 получено соответственно 6, 10, 17 и 13 независимых побегов, интенсивно и полноценно развивающихся из каллусной ткани. Полученные регенеранты фор-

мировали хорошо развитую корневую систему на среде для укоренения, дополненной 100 мг/л канамицина, и были признаны как предположительно трансгенные.

Для подтверждения интеграции целевого и маркерного генов в геном томата был проведен ПЦР-анализ. На

рисунках 1, 2 представлены электрофореграммы разделения продуктов амплификации геномной ДНК предположительно трансгенных растений. При амплификации с использованием специфических праймеров на последовательность гена *npIII* были получены фрагменты, соответствующие

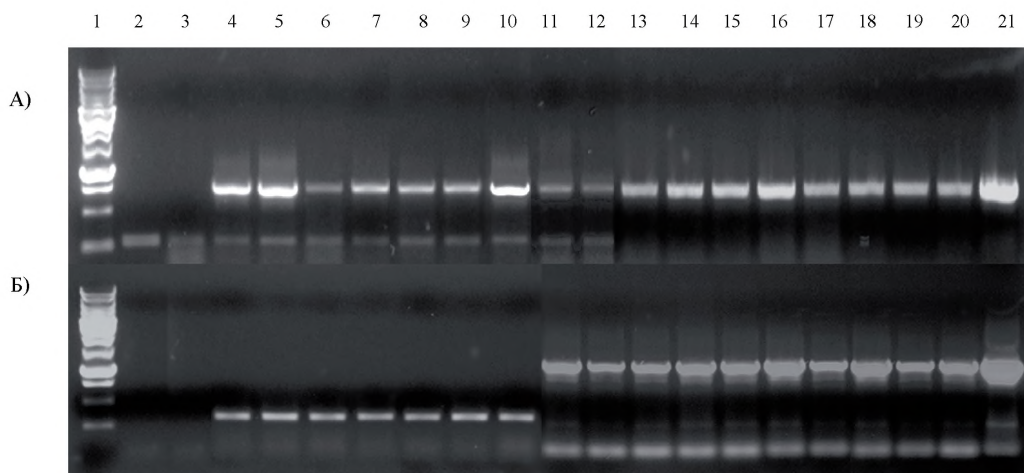


Рис. 2. Электрофореграмма продукта амплификации геномной ДНК регенерантов томата, трансформированных конструкциями с генами хитинсвязывающих белков, на наличие фрагмента маркерного (А) и целевого (Б) генов при помощи ПЦР-анализа: 1 — молекулярный маркер; 2 — вода; 3 — отрицательный контроль (дикий тип); 4-9 — регенераты томата, трансформированные конструкцией pV1121 ac; 11-20 — регенераты томата, трансформированные конструкцией pR830; 10, 21 — положительный контроль (плазмиды pV1121 ac и pR830)

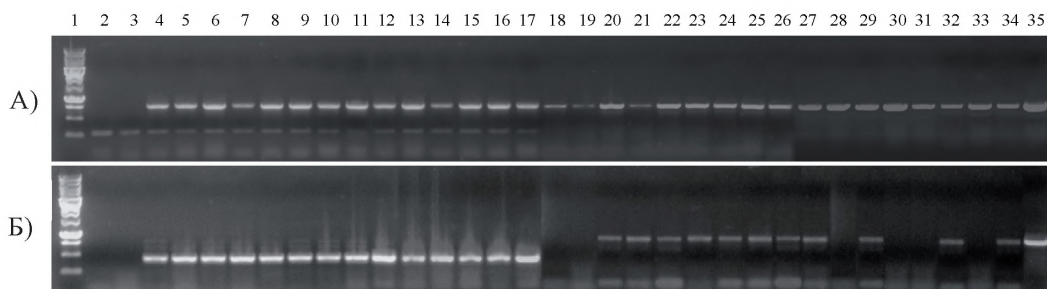


Рис. 3. Электрофореграмма продукта амплификации геномной ДНК регенерантов томата, трансформированных конструкциями с генами антимикробных пептидов, на наличие фрагмента маркерного (А) и целевого (Б) генов при помощи ПЦР-анализа: 1 — молекулярный маркер; 2 — вода; 3 — отрицательный контроль (дикий тип); 4-16 — регенераты томата, трансформированные конструкцией pV-AMP1; 18-34 — регенераты томата, трансформированные конструкцией pV-AMP2; 17, 35 — положительный контроль (плазмиды pV-AMP1 и pV-AMP2)

позитивному контролю (плазмидные ДНК) во всех случаях. Интеграция целевых генов *ac*, *Rs-intron-Shir* и *am.pl*, как и в случае маркерного гена, показана во всех проанализированных образцах. Полноразмерная копия κДНК гена *Stellaria media*, интегрированная в геном томата при трансформации бинарным вектором pV-AMP2, отмечена только у 11 из 17 независимо регенерированных побегов. Кроме того, у всех изученных образцов была проведена проверка препаратов тотальной ДНК на отсутствие бактериального гена *virB* с целью исключения ложноположительных результатов вследствие бактериальной контаминации. Таким образом, эффективность трансформации при использовании векторных конструкций pBI121ac, pR830, pV-AMP2 и pV-AMP1 составила соответственно 6,7; 8,4; 8,8 и 11,3%.

Трансгенные регенеранты были адаптированы к условиям *in vivo* и выращены в условиях защищенного грунта для получения T1 поколения и последующего выделения гомозиготных линий, а также проведения

испытаний на устойчивость к фитопатогенам.

Заключение

В рамках исследования была проведена агробактериальная трансформация хозяйственно ценной селекционной линии ЯЛФ при использовании генетических конструкций, содержащих гены растительных хитинсвязывающих белков (*ac* и *Rs-intron-Shir*) и антимикробных пептидов (*ampl* и *amp2*). Нами было получено 6, 10, 11 и 13 растений, трансформированных соответственно конструкциями pBI121ac, pR830, pV-AMP2 и pV-AMP1, с подтвержденной интеграцией целевого и маркерного генов методом ПЦР. Эффективность трансформации эксплантов семядолей составила соответственно 6,7; 8,4; 8,8 и 11,3%. Трансгенные растения успешно адаптированы к почвенным условиям; в условиях защищенного грунта получено семенное поколение T1 ряда растений для выделения гомозиготных линий и проведения испытаний на устойчивость к фитопатогенам.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ № 08-04-12203.

Библиографический список

1. Дрейпер Дж., Скотт Р., Армидж Ф. и др. Генная инженерия растений. Лабораторное руководство. Пер. с англ. Под ред. Дж. Дрейпера, Р. Скотта, Ф. Армиджа, Р. Уолдена. М., 1991.
2. Уланова Т.И., Еланский С.Н., Филиппов А.В. и др. Устойчивость к фитотрофу некоторых перспективных линий диких *Lycopersicon hirsutum* // Журнал Российского фитопатологического общества, 2003. № 4. С. 9-15.
3. Broekaert W.F., Cammue B.P.A., De Bolle M.F.C. et al. Antimicrobial peptides from plants. // Crit. Rev. in Plant Sci., 1997. V. 16. № 3. P. 297-323.
4. Curtis O.F., Shetty K. Growth medium effects on vitrification, total phenolics, chlorophyll, and water content of *in vitro* propagated oregano clones. // Acta Horticult., 1996. V. 426. P. 498-503.
5. Edreva A. Pathogenesis-related protein: research progress in the last 15 years. // Gen. Appl. Plant Physiol, 2005. V. 31. P. 105-124.
6. Edwards K., Johnstone C., Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis // Nucleic Acids Res., 1991. V. 19.
7. Kamal G.B., Karlov G.I., Asadollah A. Effects of genotype, explant type and nutrient medium components on canola (*Brassica napus* L.) shoot *in vitro* organogenesis // Afr. J. of Biotech., 2007. V. 6. P. 861-867.

8. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol. Plant.*, 1962. V. 15. P. 473-497.
9. *Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* New York: Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Lab Press, 1989.
10. *Theis T., Stahl U.* Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications // *Cell. Mol. Life Sci.*, 2004. V. 61. P. 437-455.
11. *Van Loon L.C.* Pathogenesis-related proteins // *Plant Molec. Biol*, 1995. V. 4. P. 111-116.
12. *Van Loon L.C., Rep M., Pieterse C.M.J.* Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants // *Annu. Rev. Phytopathol.*, 2006. V. 44. P. 135-162.

Рецензент — д. б. н. Л.И. Хрусталева

SUMMARY

Agrobacterial transformation of commercial tomato line YALE has been conducted to improve resistance to biotic stress. Binary vectors carrying genes of plant chitin-binding proteins (*ac* and *Rs-intron-Shir*) and antimicrobial peptides (*amp 1* and *amp 2*) were used. Transformation efficiency of obtained transgenic tomato plants is estimated on each of above-mentioned genes. Integration of foreign genes into tomato genome is confirmed by PCR analyses. Transgenic regenerants have been adapted *in vivo* and grown in greenhouse to obtain T1 progeny and subsequent isolation of homozygous lines, as well as for carrying out tests on plant pathogen resistance.

Key words: tomato, regeneration, agrobacterial transformation.

Халилуев Марат Рушанович — Эл. почта: marat131084@rambler.ru

Харченко Петр Николаевич — д. б. н. Тел. (499) 976-65-44.

Долгов Сергей Владимирович — к. с.-х. н. Тел. (499) 976-90-05.