

РАЗДЕЛ 3
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В СЕЛЕКЦИИ
И СЕМЕНОВОДСТВЕ КАРТОФЕЛЯ

УДК 602.6::581.19:57.045

**СОЗДАНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ
С ГЕНОМ АЛК-СИНТЕТАЗЫ ДРОЖЖЕЙ**

Т.А. Гапеева, Т.Г. Третьякова, А.В. Зайцева, И.Д. Волотовский

ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной
академии наук Беларуси», г. Минск

E-mail: gapееva@ibp.org.by

РЕЗЮМЕ

*Сконструирована бинарная векторная система с геном для синтеза 5-АЛК-синтетазы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в цитоплазме растительной клетки. С использованием данной векторной системы на основе белорусского сорта Скарб получены трансгенные растения картофеля. Растения будут использованы для создания сортов картофеля, синтезирующих АЛК и обладающих повышенной устойчивостью к неблагоприятным условиям окружающей среды.*

Ключевые слова: АЛК-синтетаза дрожжей, 5-аминолевулиновая кислота, трансгенные растения *Solanum tuberosum*.

ВВЕДЕНИЕ

Картофелеводство является одной из приоритетных областей сельскохозяйственного производства в Республике Беларусь. Однако неблагоприятные факторы окружающей среды значительно снижают продуктивность картофеля. Неотъемлемой частью современной стратегии земледелия является использование регуляторов роста растений, которые не только усиливают их ростовые процессы, но и повышают стрессоустойчивость. Принципиально новым подходом к созданию экологически чистых регуляторов роста растений является использование для этих целей естественных метаболитов самих растений, в частности экзогенной 5-аминолевулиновой кислоты (АЛК). Известно, что низкие концентрации АЛК могут не только оказывать стимулирующий эффект на рост и урожайность ряда сельскохозяйственных культур, но и повышать защитные свойства растительных организмов за счет снижения интенсивности окислительных процессов в растениях, а также повышения активности антиоксидантных ферментов [1–8]. Одним из способов, позволяющих модифицировать скорость синтеза АЛК в высших растениях, является экспрессия чужеродного гена АЛК-синтетазы. Возможность функционального

использования в растительной клетке этого фермента представляется перспективной для повышения способности растений накапливать собственную, эндогенную АЛК в качестве альтернативы применению экзогенной АЛК как регулятора роста растений и антистрессового агента.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Растения картофеля *Solanum tuberosum* L. сорта белорусской селекции Скарб, регенерированные из меристемной ткани, были получены из РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству» (пос. Самохваловичи, Минский р-н). Растения *in vitro* культивировали при температуре 20–22 °С с 16-часовым фотопериодом (200 мкм м⁻² с⁻¹; лампы LF 35W/54-765, Philips, Польша).

В работе использовали плазмиду pALASC, предоставленную профессором Б. Гриммом (Германия). Штаммы и плазмиды, используемые в работе, представлены в таблице 1.

Дизайн праймеров для ПЦР осуществляли с использованием программы «Primer-BLAST». Олигонуклеотидные праймеры были синтезированы в ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси». Праймеры, использованные в работе, представлены в таблице 2. ПЦР проводили в термоциклере «My Cycler» (Bio-Rad, США).

Для ПЦР с использованием колоний бактериальных клеток около 1 мкл материала колонии суспендировали в 10–50 мкл воды, очищенной системой «Millipore», а затем для лизиса клеток и инактивации дезоксирибонуклеаз пробу прогревали на кипящей водяной бане в течение 5 мин или проводили ПЦР с использованием режима «горячий старт» и предварительной денатурации при 95 °С в течение 5 мин.

Суммарную растительную ДНК для ПЦР-анализа выделяли из молодых листьев растений, выращенных *in vitro* при помощи набора «NucleoSpin® Plant II» («Macherey-Nagel», Германия) согласно протоколу фирмы-производителя. Реакционная смесь для ПЦР объемом 20 мкл содержала буфер с 25 мМ ионов Mg²⁺, 1 ед. «LC-Taq-polymerase», по 10 мкМ каждого из четырех дНТП,

Таблица 1 – Штаммы и плазмиды

Наименование	Характеристика
Плазмиды pALASC	Вектор на основе pBINAR с рекомбинантным геном для экспрессии к ДНК 5-АЛК-синтазы дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i> в клетках растений, не содержащей лидерной последовательности для переноса белка в митохондрии (предоставлен проф. Гриммом, Германия), Km ^R
pALAS-m	Плаزمид, полученная авторами путем удаления KpnI-фрагмента гена АЛК-синтазы из плазмиды pALAS
Штамм <i>A. tumefaciens</i> AGL0 [9]	Штамм, полученный из штамма ЕНА101 [10], pTiBo542 с делецией Т-области, супервирулентный

Таблица 2 – Олигонуклеотидные праймеры, использованные в работе

Наименование праймера*	Нуклеотидная последовательность	Локализация
ALAS_fw	5' – gatatcatgaaccattccaccagg	Ген АЛК дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ALAS__rev	5' – gatattctactgcttgataccactag	
ALA3S	5' – atgcgtccatgattgtcggt	
ALA3A	5' – atttcctagaggctgacg	
BINS	5' – aaacagctatgaccatgatt	Т-область бинарного вектора на основе плазмиды pBIN19
BINA	5' – acgacgttgtaaacgacgg	
NPTS	5' – cttgctcctgccgagaaagtatcc	Кодирующая область гена неомифосфо-трансферазы из Т-области бинарного вектора
NPTA	5' – cggcaagcagg-cacgccatgtgtc	

*S (fw), A (rev) – прямой, обратный праймер соответственно.

специфические олигонуклеотидные праймеры (6–10 пмоль), а также 50–100 нг ДНК-матрицы.

Программы для термоциклера были следующими (скорость набора температуры при отжиге праймеров 1 °С/сек):

I. Для BIN-праймеров: 1) предварительная денатурация – 94 °С, 2 мин; 2) 10 циклов: денатурация – 95 °С, 2 мин; отжиг – 55 °С, 30 сек; элонгация – 72 °С, 3 мин и 25 циклов: денатурация – 95 °С, 20 сек; отжиг – 55 °С, 30 сек; элонгация – 72 °С, 3 мин (режим увеличения времени элонгации на 2 с с каждым циклом); 3) конечная элонгация – 72 °С, 7 мин.

II. Для ALAS-праймеров: 1) предварительная денатурация – 95 °С, 5 мин; 2) 35–40 циклов: денатурация – 94 °С, 30 сек; отжиг – 57 °С, 20–45 сек; элонгация – 72 °С, 2 мин; 3) конечная элонгация – 72 °С, 10 мин.

III. Для ALA3-праймеров: 1) предварительная денатурация – 94 °С, 5 мин; 2) 35 циклов: денатурация – 94 °С, 30 сек; отжиг – 55 °С, 30 сек; элонгация – 72 °С, 30 сек; 3) конечная элонгация – 72 °С, 7 мин.

IV. Для NPT-праймеров: 1) предварительная денатурация – 94 °С, 5 мин; 2) 35 циклов: денатурация – 94 °С, 20 сек; отжиг – 59 °С, 30 сек; элонгация – 72 °С, 30 сек; 3) конечная элонгация – 72 °С, 10 мин.

Анализ ПЦР-продуктов проводили методом электрофореза в агарозном геле. Нуклеиновые кислоты в гелях окрашивали с помощью «ZUBR Green I» производства ОДО «Праймтех». Анализ гелей проводили методом детекции флуоресценции в ультрафиолетовом свете с помощью прибора для гель-документирования «ГельДок 2000» (Био-Рад, США) – л_{детекции} = 520 нм. Размеры линейных фрагментов ДНК определяли с использованием наборов маркеров производства («Thermo Scientific, Fermentas», Литва).

Плазмидную ДНК выделяли методом щелочного лизиса [11]. Гидролиз ДНК проводили с использованием эндонуклеаз рестрикции производства

(«Thermo Scientific, Fermentas») по протоколу фирмы-изготовителя. ДНК-фрагменты выделялись из геля при помощи «QIAquick Gel Extraction Kit» («QIAGEN»). Клонирование фрагментов ДНК в векторах проводили по стандартным методикам согласно лабораторному руководству с использованием ферментов фирмы «Thermo Scientific, Fermentas» [12]. Бинарные векторы вводили в клетки *E. coli* и агробактерий методом трансформации [13, 14].

Генетическую трансформацию растений картофеля осуществляли методом сокультивации листовых дисков с агробактериями, несущими векторную систему для агробактериальной трансформации. В одном эксперименте использовали в среднем 60 эксплантов, которые культивировали в чашках Петри. В качестве основы для приготовления агаризованных сред использовали стандартную агаризованную среду Мурасиге-Скуга (МС) с витаминами, содержащую также сахарозу – 30 мг/л, агар – 0,8 % [15]. Для трансформации использовали ночную культуру агробактерий, разведенную в жидкой среде УЕВ в соотношении 1:10 [14]. Листовые диски размером ~ 1 см растений через 3–4 недели после пересадки *in vitro* инокулировались агробактериями в течение 30 мин, подсушивались на стерильном фильтре и помещались на чашки Петри с агаризованной средой для каллусообразования СИМ (callus inducing medium), содержащей БАП – 1 мг/л, НУК – 5 мг/л. Чашки накрывались фильтровальной бумагой и культивировались 3 дня при температуре 20–21 °С. После сокультивации экспланты помещались на среду СИМ с добавлением антибиотиков: тиментина (150 мг/л) и канамицина (25 мг/л) и культивировались в условиях 16-часового светового периода, освещенности 200 мкмоль/м² (белая флуоресцентная лампа), при температуре 19–21 °С. Экспланты после культивации на СИМ с хорошо сформированным каллусом переносились на среду СИМ (shoot inducing medium), стимулирующую побегообразование, содержащую ЗР (зеатинрибозид) – 2 мг/л, НУК – 0,02 мг/л, ГА₃ (гибберелловая кислота) – 0,15 мг/л, с добавлением антибиотиков: тиментина (150 мг/л) и канамицина (25 мг/л). Образовавшиеся побеги высотой 1–2 см переносились в пробирки со средой для укоренения РИМ (root inducing medium), содержащей НУК – 0,1 мг/л, с добавлением антибиотиков (канамицин – 25–50 мг/л, тиментин – 100 мг/л).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Плазмида pALASC, предоставленная профессором Б. Гриммом (Германия), получена на основе вектора pBINAR. Вектор pBINAR сконструирован на основе вектора pBIN19 в результате встраивания кассеты для экспрессии генов в растениях по сайтам EcoRI/HindIII. Данная кассета для экспрессии в растениях содержит конститутивный промотор CaMV 35S и терминатор гена октопинсинтазы, между которыми находится полилинкер для клонирования фрагментов ДНК. Последовательность кДНК АЛК-синтазы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (NM_001180540) клонирована по сайту SmaI полилинкера вышеописанной кассеты с получением рекомбинантного гена для

экспрессии кДНК АЛК-синтетазы дрожжей, не содержащей последовательности, кодирующей лидерный пептид для транспортировки белка в митохондрии [16, 17].

Для генетической трансформации растений были сконструированы бинарные векторные системы на основе агробактериального штамма AGLO: AGLO::pALASC и AGLO::pALAS-m с поврежденной кДНК АЛК-синтетазы. Векторная система AGLO::pALAS-m была создана с целью исключения предполагаемого эффекта влияния повышенного уровня АЛК на регенерацию из эксплантов растений и контроля эффективности агробактериальной трансформации. Вектор pALAS-m был получен путем удаления KpnI-фрагмента pALAS с клонированием в клетках *E. coli* и введен в клетки агробактерий штамма AGLO методом трансформации. Наличие вектора в клетках бактерий было подтверждено методом ПЦР с BIN-праймерами (ожидаемый размер ампликона около 1000 пн).

Перед проведением трансформации осуществляли проверку агробактериальных штаммов на наличие бинарных векторов, так как ранее была показана возможность утраты клетками агробактерий плазмид, полученных на основе вектора pBIN19. Наличие целевого вектора подтверждали с помощью ПЦР для колоний клеток с праймерами BIN и ALAS. Результаты ПЦР, подтверждающие наличие целевых конструкций в клетках бактерий, приведены на рисунке 1.

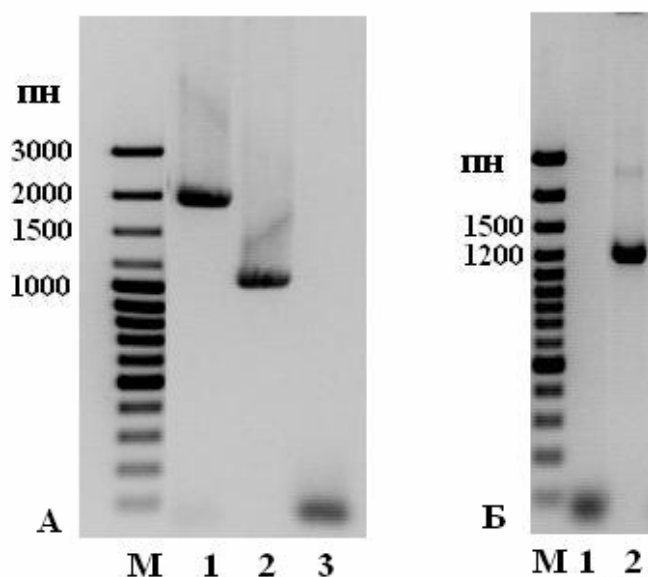


Рисунок 1 – ПЦР-анализ агробактериальных штаммов
 А – результаты ПЦР с праймерами BIN: 1 – AGL0::pALASC, 2 – AGL0::pALAS-m,
 3 – ПЦР без ДНК (контроль), Б – результаты ПЦР с праймерами ALAS:
 1 – ПЦР без ДНК (контроль), 2 – AGL0::pALASC, М – ДНК-маркеры
 «GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus»

После отбора регенерированных растений картофеля после трансформации на средах с селективным антибиотиком методом ПЦР было показано наличие гена АЛК-синтазы (праймеры ALA3) и маркерного гена неоминифосфотрансферазы (праймеры NPT) (рис. 2). Примеры результатов ПЦР представлены на рисунке 3. Размеры ампликонов соответствуют ожидаемым (329 пн для праймеров ALA3 и 264 пн для праймеров NPT). Полученные *in vitro* растения не отличались от контрольных по внешнему виду.

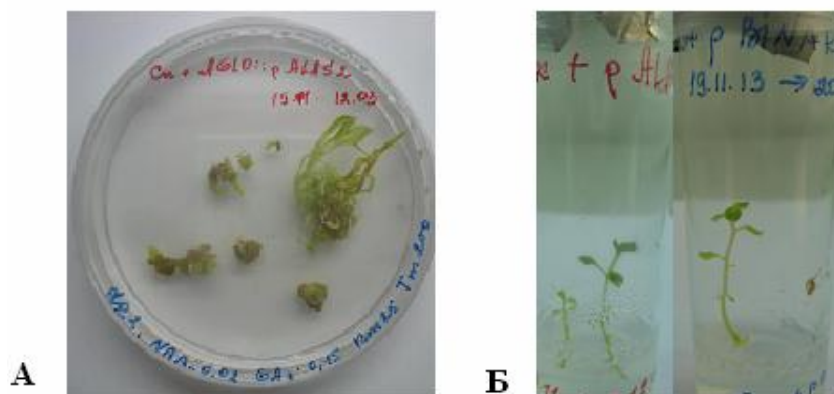


Рисунок 2 – Примеры регенерированных растений картофеля сорта Скарб на среде для регенерации (А) и для укоренения (Б)

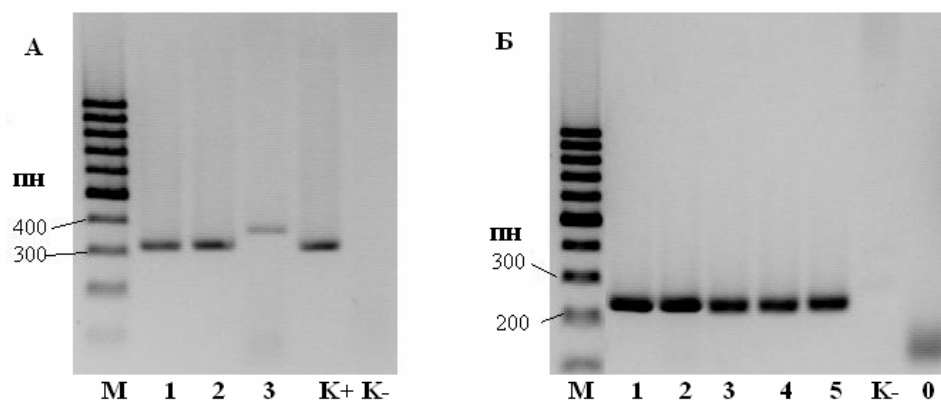


Рисунок 3 – Результаты ДНК-ПЦР с праймерами ALA3 (А) и с праймерами NPT (Б) для трансформированных растений картофеля сорта Скарб 1–5 – варианты регенерированных растений после трансформации, К+, К- – положительный (штамм AGLO::pALASC) и отрицательный (нетрансформированное растение) контроль соответственно, 0 – ПЦР без ДНК, М – ДНК-маркеры «GeneRuler 100 bp DNA Ladder»

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе вектора pALASC и агробактериального штамма AGLO получена векторная система для агробактериальной трансформации растений, содержащая синтетический ген для синтеза 5-АЛК-синтетазы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в цитоплазме растительной клетки. Отобраны линии трансформированных растений картофеля белорусского сорта Скарб на средах с селективным антибиотиком – канамицином. Методом ДНК-ПЦР показано наличие в геноме отобранных растений гена АЛК-синтетазы и маркерного гена неомицинфосфотрансферазы. Полученные растения предназначены для создания экспериментальных образцов трансгенных растений картофеля, синтезирующих АЛК и обладающих повышенной устойчивостью к неблагоприятным условиям окружающей среды.

Список литературы

1. Яронская, Е.Б. Экологически безопасные регуляторы роста растений на основе 5-аминолевулиновой кислоты / Е.Б. Яронская, Н.Г. Аверина, М.А. Кисель // Труды БГУ. – 2012. – Т. 7. – Ч. 1. – С.127–134.
2. Wang, L.J. Promotion of 5-aminolevulinic acid on photosynthesis of melon (*Cucumis melo*) seedlings under low light and chilling stress conditions / L.J. Wang, W.B. Jiang, B.J. Huang // *Physiol. Plant.* – 2004. – V. 121. – № 2. – P. 258–264.
3. Improvement of cold resistance in rice seedlings by 5-aminolevulinic acid / Y. Hotta [et al.] // *J. Pesticide Sci.* – 1998. – V. 23. – P. 29–33.
4. The role of 5-aminolevulinic acid in the response to cold stress in soybean plants / K.B. Balestrasse [et al.] // *Phytochemistry.* – 2010. – V. 71. – P. 2038–2045.
5. Korkmaz, A. Promotion by 5-aminolevulinic acid of pepper seed germination and seedling emergence under low temperature stress / A. Korkmaz, Y Korkmaz // *Sci Hortic.* – 2009. – V. 119. – P. 98–102.
6. Effect of 5-aminolevulinic acid (ALA) on Leaf Diurnal Photosynthetic Characteristics and Antioxidant Activity in Pear (*Pyrus Pyrifolia Nakai*) / M. Shen, Z.P. Zhang, L.J. Wang // *Artificial Photosynthesis.* – 2012. – V. 11. – P. 240–256.
7. 5-aminolevulinic acid pretreatment mitigates drought stress of cucumber leaves through altering antioxidant enzyme activity / D-M. Li [et al.] // *Scientia Horticulturae.* – 2011. – V. 130, I. 4. – P. 820–828.
8. Role of 5-aminolevulinic acid (ALA) on active oxygen-scavenging system in NaCl-treated spinach (*Spinacia oleracea*) / E. Nishihara [et al.] // *J. Plant Physiol.* – 2003. – V. 160. – P. 1085–1091.
9. Lazo, G.R. DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium* / G.R. Lazo [et al.] // *Biotechnology.* – 1991. – V. 9. – P. 963–967.
10. Hood, E.E. The Hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA / E.E Hood [et al.] // *J. Bact.* – 1986. – V. 168. – P. 1291–1304.
11. Харди, К. Выделение бактериальных плазмид / К. Харди // Плазмиды. Методы / П. Бергквист [и др.]; под ред. К. Харди. – М., 1990. – Гл. 1. – С. 11–18.

12. Sambrook, J. W. Molecular cloning: A Laboratory manual / J. W. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis. – N.Y: Cold Spring Harb. Lab.Press, 1989. – Vol. 1, 2, 3.
13. Ханаан, Д. Методы трансформации *E. coli* / Д. Ханаан // Клонирование ДНК. Методы/ С. Бэлдэри [и др.]; под ред. Д.М. Гловера . – М., 1988. – Гл. 6. – С. 140–173.
14. Draper, J. Transformation of dicotyledonous plant cells using Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* and Ri plasmid of *A.rhizogenes* / J. Draper [et al.] // Plant Genetic transformation and Gene expression: A Laboratory Manual / Eds. J. Draper [et al.]. – Oxford, 1988. – Chap. 2. – P. 69–160.
15. Murashige, T. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures / T. Murashige [et al.] // *Physiol. Plant.* – 1962. – Vol. 15. – P. 473–497.
16. Keng, T. The Nine Amino-Terminal Residues of 8-Aminolevulinate Synthase Direct 1-Galactosidase into the Mitochondrial Matrix / T. Keng [et al.] // 1986. – *Mol. Cell. Biol.* – V. 6. – № 2. – P. 355–364.
17. Urban-Grimal, D. The nucleotide sequence of the *HEM1* gene and evidence for a precursor form of the mitochondrial 5-aminolevulinate synthase in *Saccharomyces cerevisiae* / D. Urban-Grimal [et al.] // *Eur. J. Biochem.* – 1986. – V. 156. – P. 511–519.

CREATION OF TRANSGENIC POTATO PLANTS WITH GENE OF YEAST ALA-SYNTHEASES

T.A. GAPEEVA, T.G. TRETYAKOVA, A.V. ZAITSEVA,
I.D. VOLOTOVSKIY

SUMMARY

*The binary vector system with the gene for the synthesis of ALA-synthetases of *Saccharomyces cerevisiae* in cytoplasm of plant cell was constructed. Using this vector system the transgenic plants of potato of Belarussian variety Scarb were obtained. The plants will be applied for the development of transgenic potato cultivars synthesizing ALA and possessing increasing resistance to unfavorable environmental conditions.*

Key words: yeast ALA-synthetase, 5-aminolevulinic acid, transgenic plants of *Solanum tuberosum*.

Поступила в редакцию 25.07.2014 г.