

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ**

СИТНИК

Катерина Сергіївна

УДК 577.21 + 582.926 + 581.174

**РОЗРОБКА МОДЕЛЬНОЇ СИСТЕМИ ОТРИМАННЯ
ТРАНСПЛАСТОМНИХ РОСЛИН НА ПРИКЛАДІ
ПРЕДСТАВНИКІВ РОДИНИ ПАСЛЬОНОВИХ**

03.00.20 – біотехнологія

Автореферат

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Київ – 2004

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у відділі генетичної інженерії Інституту клітинної біології та генетичної інженерії Національної Академії Наук України.

Науковий керівник: доктор біологічних наук **Кучук Микола Вікторович**,
Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН
України, заст. завідуючого відділу генетичної інженерії

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук **Галкін Анатолій Павлович**,
Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України,
завідуючий відділу біоінженерії

доктор біологічних наук, професор
Головко Ераст Анатолійович, Національний ботанічний сад
ім. М.М. Гришка НАН України завідуючий відділу алелопатії

Провідна установа: Інститут фізіології рослин і генетики НАН України.

Захист відбудеться 24 грудня 2004 р. о 14 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д.26.202.01 при Інституті клітинної біології та генетичної інженерії НАН України за адресою: 03143, Київ-143, вул. Акад. Заболотного, 148.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України за адресою: 03143, Київ-143, вул. Акад. Заболотного, 148.

Автореферат розіслано 19 листопада 2004р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
кандидат біологічних наук

О.А. Кравець

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Генетично змінені рослини вже багато років використовуються для вивчення фундаментальних питань функціонування рослинного організму та знаходять практичне застосування в різноманітних галузях господарської діяльності людини: сільському господарстві, медицині, фармацевтиці та інших. Генетична трансформація пластидної ДНК є відносно новою технологією, що має ряд переваг порівняно з ядерною трансформацією. Розвиток цієї галузі біотехнології рослин в перспективі може привести до її широкого застосування для створення систем накопичення корисних білків; їстівних вакцин; рослин, стійких до біотичних та абіотичних факторів. На сьогодні вже є повідомлення про вбудовування в пластом тютюну генів синтезу соматотропіну (Staub *et al.*, 2000), сироваткового альбуміну людини, інсуліну, холерного токсину (Daniell, 2001; Daniell, Dhingra, 2002), біополімерів, що підлягають біодеградації (Guda, 2000), стійкості до посухи (Daniell *et al.*, 2001), комах (Kota *et al.*, 1999; De Cosa *et al.*, 2001), грибів (DeGray *et al.*, 2001), гербіцидів (Daniell *et al.*, 1998; Lutz, 2001). Хлоропластні трансформанти отримані для двох видів сільськогосподарсько-важливих рослин: картоплі (Sidorov *et al.*, 1999) та томату (Ruf *et al.*, 2001). Крім того, хлоропластна трансформація є зручним інструментом для досліджень функцій хлоропластних генів, механізмів регулювання експресії, впливу ядерних генів на функціонування пластоми.

Хлоропластна трансформація має ряд особливостей, які обумовлюють підвищений інтерес до цієї технології (Bock, 2001): поліцистронний тип експресії дозволяє вводити одразу декілька генів в одній трансформаційній системі (Staub, Maliga, 1995); багатокопійність хлоропластного геному приводить до накопичення великої кількості білку (De Cosa *et al.*, 2001; Daniell *et al.*, 1998); материнський тип успадкування пластид зменшує ризик розповсюдження трансгенів в оточуючому середовищі (Daniell, 1999); наявність в хлоропластах механізму гомологічної рекомбінації дає змогу вбудовувати трансген у визначене місце пластоми (Camerini-Otero, 1995).

У той же час, кількість об'єктів, для яких здійснена хлоропластна трансформація, досі є дуже малою і включає, в основному, модельні види. Рутинні, ефективні, відтворювані методики отримання транспластомних рослин існують лише для тютюну. У нашій роботі запропоновано новий підхід до здійснення хлоропластної трансформації. Він базується на таких технологіях: висока ефективність регенерації та генетичної трансформації рослин *N. tabacum*; наявність відтворюваних методик отримання фертильних транспластомних рослин *N. tabacum*; можливість створення цитоплазматичних гібридів рослин, що об'єднують цитоплазму одного виду та ядро іншого.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконувалась у рамках фундаментальних науково-дослідних робіт відділу генетичної інженерії Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАНУ: "Вивчення молекулярно-біологічних і

генетичних процесів в реконструйованих трансгеномних і трансгенних клітинних лініях і рослинах” (1995 – 1999 рр.; не реєструвалася); “Дослідження біологічних процесів в генетично модифікованих рослинах” (2000 – 2004 рр.; номер держреєстрації 0101и000390).

Патент: Kuchuk N.V. Methods for transforming plant plastids and making transplastomic plants. U.S. Patent Application No. 60/191,147, International patent application No: PCT/US01/09318, WO01/70939. International publication date 27 September 2001.

Мета і завдання роботи. Метою роботи було отримати і виконати молекулярно-біологічний аналіз хлоропластних трансформантів рослин *Nicotiana tabacum* Wiskonsin, *Nicotiana tabacum* (+ *Salpiglossis sinuata*), *Nicotiana tabacum* (+ *Scopolia carniolica*), *Nicotiana tabacum* (+ *Physochlaine officinalis*), *Nicotiana tabacum* (+ *Lycium barbarum*), *Nicotiana tabacum* (+ *Atropa belladonna*) та застосувати їх в експериментах із соматичної гібридизації з рослинами *Salpiglossis sinuata* та *Lycium barbarum*.

В завдання роботи входило:

- 1) отримати транспластомні цибридні рослини *Nicotiana tabacum* (+ *Salpiglossis sinuata*), *Nicotiana tabacum* (+ *Scopolia carniolica*), *Nicotiana tabacum* (+ *Physochlaine officinalis*), *Nicotiana tabacum* (+ *Lycium barbarum*) та *Nicotiana tabacum* (+ *Atropa belladonna*);
- 2) отримати транспластомні рослини *Salpiglossis sinuata* шляхом соматичної гібридизації рослин дикого типу з трансформованими цибридними рослинами *Nicotiana tabacum* (+ *Salpiglossis sinuata*);
- 3) вивчити ядерну та мітохондріальну організацію транспластомних рослин *Salpiglossis sinuata*, отриманих шляхом соматичної гібридизації диких форм з трансформованими цибридними рослинами *Nicotiana tabacum* (+ *Salpiglossis sinuata*);
- 4) отримати транспластомні рослини *Nicotiana tabacum* з експресією репортерного гену *uidA* (ген β -глюкуронідази) для використання в експериментах із соматичної гібридизації;
- 5) провести соматичну гібридизацію між рослинами *Lycium barbarum* дикого типу та хлоропластним трансформантом *Nicotiana tabacum* і дослідити експресію гена *uidA*.

Об'єкти дослідження - генетична інженерія пластидної ДНК.

Предмет дослідження – отримання, морфологічний та молекулярно-біологічний аналізи хлоропластних трансформантів та соматичних гібридів.

Методи дослідження - метод генетичної трансформації пластоми шляхом прямого перенесення трансгенів в протопласти за допомогою поліетиленгліколя (ПЕГ), метод соматичної гібридизації рослинних клітин, методи аналізу отриманих в результаті трансформації та соматичної гібридизації рослин (полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), дослідження рестриктних спектрів хлоропластної та мітохондріальної ДНК, вивчення множинних молекулярних форм ферментів амілази та естерази, тест на активність гена β -глюкуронідази).

Наукова новизна.

- Запропоновано новий ефективний підхід до отримання транспластомних рослин для видів, що мають низький трансформаційний та регенераційний потенціал.
- Вперше отримано трансформовані пластоми рослин *Salpiglossis sinuata*, *Scopolia carniolica*, *Physochlaine officinalis*.
- Вперше здійснено генетичну трансформацію пластомів, що функціонують в клітинах іншого виду.
- Здійснено соматичну гібридизацію між рослинами *Lycium barbarum* та транспластомними рослинами *Nicotiana tabacum*.

Практичне значення одержаних результатів. Технологія пластидної трансформації дозволяє створювати рослини з новими властивостями для використання їх у різноманітних галузях промислової діяльності, зокрема в сільському господарстві та фармацевтиці. Багато сільськогосподарсько-важливих рослин є рослинами з низьким регенераційним та трансформаційним потенціалом, що робить їх проблемними з точки зору роботи в культурі *in vitro* та проведенні генетичної трансформації. Підхід, запропонований у роботі, дозволяє підвищувати ефективність хлоропластної трансформації рослин з низьким трансформаційним та регенераційним потенціалом.

Підхід також передбачає можливість перенесення за допомогою соматичної гібридизації трансформованих пластид до інших, корисних, видів, ядра яких є сумісними з даним трансформованим пластомом. Створення за допомогою хлоропластної трансформації маркованих пластомів та їх перенесення до інших видів є зручними системами для вивчення ядерно-цитоплазматичних взаємовідносин.

Рослини *Lycium barbarum*, які мають їстівні плоди, обрані як об'єкт для дослідження експресії репортерного гена *uidA* в різних типах пластид, зокрема в хромопластах, через потенційну можливість використання рослин *Lycium barbarum* для створення їстівних вакцин. Їстівні вакцини з часом можуть стати альтернативним, більш дешевим та зручним, способом виробництва та споживання вакцин.

Можливість використання запропонованого підходу показана в роботі на прикладі модельних та диких представників видів родини пасльонових. В подальшому планується його застосування для корисних видів з цієї родини та з інших родин.

Особистий внесок здобувача. Автором особисто були розроблені завдання досліджень, сплановані та проведені всі експерименти. Особистий внесок здобувача полягає також в обробці та інтерпретації результатів роботи, аналізі літератури, написанні наукових статей. Спільно з науковим керівником розроблено напрямок та концепцію досліджень, основні ідеї роботи, структуру дисертаційної роботи, проведено вибір об'єктів. Векторні конструкції були люб'язно

надані професором Коопом (Інститут Ботаніки, Мюнхенський Університет, Німеччина). Молекулярно-біологічні аналізи з використанням полімеразної ланцюгової реакції та дослідження рестриктних спектрів проведені за допомогою к.б.н. Комарницького І.К. (ІКБГІ НАНУ), аналіз множинних молекулярних форм ферментів виконано нс Черепом М.Н. (ІКБГІ НАНУ).

Апробація роботи. Результати досліджень доповідалися на 2 – гій міжнародній конференції молодих вчених “Современные проблемы генетики, биотехнологии и селекции растений”, Харків, 2003; IV Міжнародній конференції “Геном растений”, Одеса, 2003; Всеросійській науково-практичній конференції молодих вчених “Биотехнология - возрождению сельского хозяйства России в XXI веке”, Санкт-Петербург, 2001; Міжнародному симпозіумі “Молекулярные механизмы генетических процессов и биотехнология”, Москва, 2001; Міжнародній конференції “Biotechnology approaches for exploitation and preservation of plant resources”, Ялта, 2002; Конференції молодих вчених “Conference for young scientists, PhD students and students on molecular biology and genetics”, Київ, 2003.

Публікації. За результатами дисертації опубліковано 8 наукових робіт, у тому числі 3 статті в провідних наукових журналах.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається із списку умовних скорочень, вступної частини, огляду літератури, матеріалів і методів, результатів досліджень, обговорення результатів, висновків і списку літератури, що містить 148 посилань. Робота викладена на 120 сторінках, включає 9 таблиць та 35 рисунків.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Рослинний матеріал. Цибридні рослини *Nicotiana tabacum* (+ *Scopolia carniolica*), *Nicotiana tabacum* (+ *Physochlaine officinalis*), *Nicotiana tabacum* (+ *Lycium barbarum*) (Babijchuk *et al.*, 1995) та *Nicotiana tabacum* (+ *Atropa belladonna*) (Kushnir *et al.*, 1987) були отримані раніше в Інституті клітинної біології та генетичної інженерії НАНУ. Асептичні рослини *Salpiglossis sinuata*, *Lycium barbarum* та *Nicotiana tabacum* зберігаються в колекції ІКБГІ НАНУ. Цибридна рослина *Nicotiana tabacum* (+ *Salpiglossis sinuata*) отримана Than N.D. *et al.*, 1988 та люб'язно надана проф. Медеєши (Сегедський Біологічний центр, Угорщина). Усі рослини вирощували в стерильних умовах при 16-годинному світловому дні на безгормональному середовищі MS (Murashige, Skoog, 1962), розмножували живцюванням. Для експериментів використовували рослини 3 - 5 тижневого віку.

Векторні конструкції та бактеріальні штами. Плазмідні векторні конструкції pCB033 та pICF584 були люб'язно надані проф. Н.-У. Коор (Інститут Ботаніки, Мюнхенський Університет, Німеччина). Для ампліфікації плазмід використовували клітини *Escherichia coli*, штам XL-Blue. Для відбору бактерій плазміди несуть ген стійкості до ампіциліну.

Плазмід рСВ033 містить ген *aadA* (аміноглікозид 3'-аденілінтрансфераза), що знаходиться під контролем промотору 16S рДНК тютюну та має термінатор гена *rbc* (велика субодиниця рибулозо-1,5-бісфосфат-карбоксилази) з пластоми *Chlamydomonas reinhardtii*. Селективний ген оточений генами *rpl32* (рибосомальний білок) і *trnL* (тРНК лейцину) малої унікальної ділянки тютюнового пластоми, що забезпечує вбудовування гена *aadA* у визначену ділянку хлоропластного геному. Плазмід рІCF584 містить, крім селективного гена *aadA*, репортерний ген *uidA* (ген β-глюкуронідази). Гени знаходяться між послідовностями *psbA* (D1 білок фотосистеми II) і *trnH* (тРНК гістидину) великої унікальної області пластоми тютюну.

Виділення і культивування протопластів. В усіх експериментах використовували протопласти тканин листка. Листя ферментували в розчинах, що містили різні концентрації ферментів Cellulase Onozuka R-10, Macerosim R-10 та Cellulisin. Виділяли фракцію живих протопластів і культивували в рідкому середовищі КМ8р (Kao, Michayluk, 1975). Для регенерації рослин тютюну, цибридів з ядром тютюну та колоній, отриманих в результаті соматичної гібридизації *Lycium barbarum* та *Nicotiana tabacum* використовували 1 мг/л БАП (6-бензиламінопурин) і 0,1 мг/л НОК (α-нафтилоцтова кислота). Для регенерації рослин *S. sinuata* замість БАП додавали 1 мг/л зеатину.

Генетична трансформація та соматична гібридизація. Плазмідну ДНК для проведення експериментів виділяли з нічної культури *Escherichia coli*, використовуючи набір Qiagen тип 500 (Qiagen, Hilden, Germany) для виділення ДНК відповідно інструкціям до нього. Трансформацію проводили, як описано в статті Коор *et al.*, 1996, з деякими модифікаціями. Перед проведенням соматичної гібридизації рослини – донори хлоропластів опромінювали γ-променями в дозі 500 – 600 Гр (джерело - Co⁶⁰, 0,1 Гр/сек). Соматичну гібридизацію здійснювали відповідно методики Menczel *et al.*, 1981 з незначними модифікаціями.

Молекулярно-біологічний аналіз отриманих рослин. Аналіз рослин, отриманих у результаті генетичної трансформації проводили за допомогою полімеразної ланцюгової реакції використовуючи праймери, специфічні до селективного гена *aadA*, репортерного гена *uidA* та до ділянок хлоропластної ДНК. Для аналізів використовували тотальну рослинну ДНК, яку виділяли згідно протоколу Cheung *et al.*, 1993. Аналіз ділянок хлоропластної, мітохондріальної та ядерної ДНК рослин, отриманих у результаті соматичної гібридизації виконували, досліджуючи спектри фрагментів, синтезованих за допомогою ПЛР та одержаних в результаті обробки синтезованих фрагментів ендонуклеазами рестрикції. Ядерну природу гібридних рослин вивчали, також, порівнюючи множинні молекулярні форми естераз та амілаз. Для виконання аналізів використовували методики, прийняті в нашому Інституті (Биохимический анализ в клеточной биологии растений. – Киев. – 1988. – Препринт /АН УССР, Институт ботаники, 88.1). Активність

репортерного гена *uidA* в трансгенних пластидах виявляли, проводячи гістохімічну реакцію за Jefferson (1987).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Загальна концепція роботи. Ефективність трансформації рослинного організму завжди залежить від ефективності та імовірності двох процесів: вбудовування трансгену в рослинну ДНК та регенерації трансформованої клітини. Регенераційна здатність рослинної клітини залежить від багатьох причин: ступеня її диференційованості, типу тканини, ендогенного гормонального балансу, виду, зовнішніх умов, складу живильного середовища, екзогенних гормонів тощо. В усіх дослідженнях з хлоропластної трансформації відмічалось, що однією з головних передумов, необхідних для отримання трансформантів, є розробка ефективної системи регенерації (Bock, 2001; Sidorov *et al.*, 1999; Ruf *et al.*, 2001). Отже, наявність високорегенераційної системи культивування експлантів є одним з вирішальних факторів для здійснення стабільної пластидної трансформації.

Тютюн, модельна рослина біотехнологів рослин, є єдиним видом для якого розроблена ефективна та відтворювана методика хлоропластної трансформації (Kanevski *et al.*, 1999; Rochaix, 1997; Hager *et al.*, 1999; Kofer *et al.*, 1998; Eibl *et al.*, 1999; Bock, 2001; Staub, Maliga, 1995). Безумовно, однією з причин цього є висока регенераційна та трансформаційна здатність тютюну.

Виходячи з вищесказаного ми вирішили запропонувати та розробити новий підхід до здійснення хлоропластної трансформації. Він полягає у поєднанні за допомогою технології соматичної гібридизації в одній клітині органел тютюну з органелами інших видів. Імовірно, за регенераційну здатність рослинного організму відповідає генетична інформація, закодowana в ядерній ДНК, отже цибридні рослини з ядром тютюну та хлоропластами інших видів будуть мати високу регенераційну здатність. Разом з тим, під час трансформації цих рослин трансген, оточений гомологічними послідовностями пластидної ДНК, має вбудовуватися в хлоропластну ДНК того виду, пластиди якого знаходяться в цибридній клітині. Потім трансгенні хлоропласти можна переносити з цибридних рослин або до клітин того ж виду, до якого належать і хлоропласти, або до клітин іншого виду. Експерименти, необхідні для виконання запропонованого підходу схематично представлені на рисунку 1.

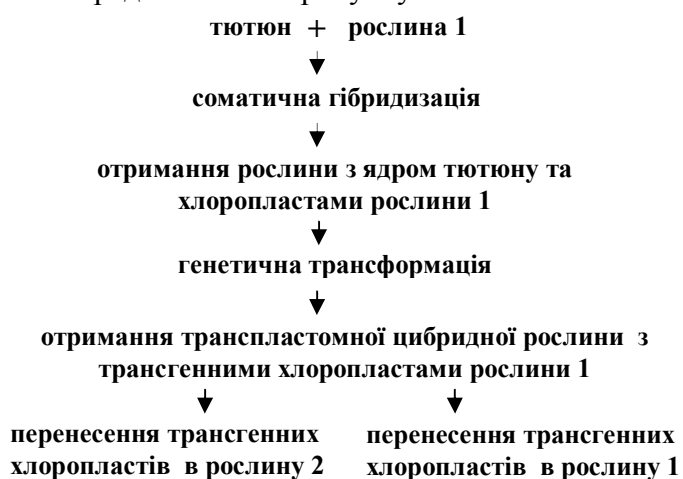


Рис.1. Схема експериментів з отримання транспластомних рослин.

Рослина 1 на рис.1 може бути будь-якою, але такою, хлоропласти якої сумісні з ядром тютюну. Рослина 2 повинна мати ядро, що є сумісним з хлоропластами рослини 1.

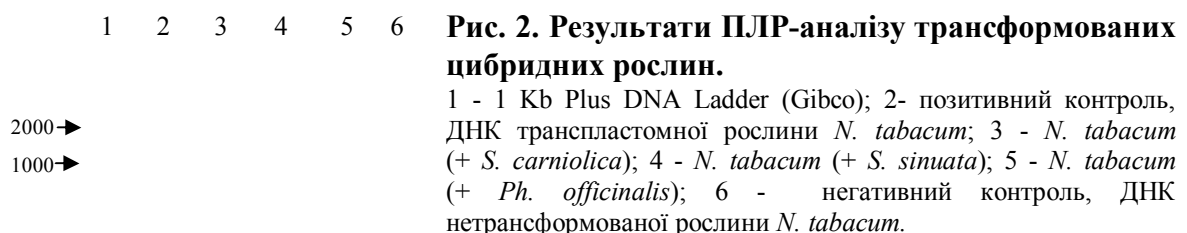
Таким чином здійснюється трансформація хлоропластів тих видів, які цікавлять дослідника, але мають низький трансформаційний та регенераційний потенціал, а клітини тютюну є посередниками, в яких знаходяться хлоропласти, що цікавлять. Ще одним шляхом виконання запропонованого підходу є отримання хлоропластних трансформантів тютюну та перенесення трансгенних хлоропластів тютюну з клітин тютюну до клітин інших видів.

Генетична трансформація пластомів цибридних рослин. Для розробки нашого підходу ми використали раніше отримані цибридні рослини (див. матеріали і методи). Трансформацію проводили векторною конструкцією pCB033. Після проведення генетичної трансформації зелені колонії відбирали на регенераційному середовищі MS з селективними агентами (300 - 400 мг/л спектиноміцину або 200 мг/л спектиноміцину та 200 мг/л стрептоміцину). Результати оцінки ефективності трансформації наведені в таблиці 1. Аналіз отриманих рослин виконували за допомогою полімеразної ланцюгової реакції. Результати аналізу представлені на рисунку 2.

Таблиця 1.

Ефективність трансформації пластомів цибридних рослин.

Цибридна рослина	Кількість експериментів	Кількість стійких клонів	Кількість трансформованих клонів
<i>Nicotiana tabacum</i> (+ <i>Physoclaina officinalis</i>)	4	1	1
<i>Nicotiana tabacum</i> (+ <i>Salpiglossis sinuata</i>)	2	2	2
<i>Nicotiana tabacum</i> (+ <i>Lycium barbarum</i>)	2	1	0
<i>Nicotiana tabacum</i> (+ <i>Scopolia carniolica</i>)	2	2	2
<i>Nicotiana tabacum</i> (+ <i>Atropa belladonna</i>)	1	1	0



Транспластомні рослини *Salpiglossis sinuata*. Наступним етапом роботи було повернення за допомогою соматичної гібридизації трансгенних хлоропластів з цибридної рослини *N. tabacum* (+ *S. sinuata*) в клітини *S. sinuata* дикого типу.

Після злиття протопластів транспластомного цибриду *N. tabacum* (+ *S. sinuata*) та рослини *S. sinuata* дикого типу в суміші знаходяться протопласти *S. sinuata* дикого типу, транспластомні протопласти *N. tabacum* (+ *S. sinuata*) та протопласти з ядром *S. sinuata* і трансформованим пластомом *S. sinuata*. Для здійснення відбору необхідних протопластів, а саме протопластів з ядром *S. sinuata* та трансформованим пластомом *S. sinuata*, необхідно позбутися протопластів інших типів. Розвиткові протопластів *N. tabacum* (+ *S. sinuata*) з трансформованим пластомом *S. sinuata* запобігали опроміненням рослини перед виділенням протопластів. Протопласти *S. sinuata* дикого типу інактивували додаванням селективного агента, спектиноміцину. Лінії, відібрані на селективному середовищі (400 мг/л спектиноміцину) могли бути: рослинами *S. sinuata* з трансформованими пластидами; асиметричними гібридами *S. sinuata* з трансформованими пластидами та деякою кількістю ядерного матеріалу *N. tabacum*.

З чотирма рослинами *S. sinuata*, відібраними на селективному середовищі після проведення соматичної гібридизації транспластомних цибридних рослин *N. tabacum* (+ *S. sinuata*) та рослин *S. sinuata* дикого типу, був здійснений молекулярний аналіз хлоропластної, мітохондріальної та ядерної ДНК.

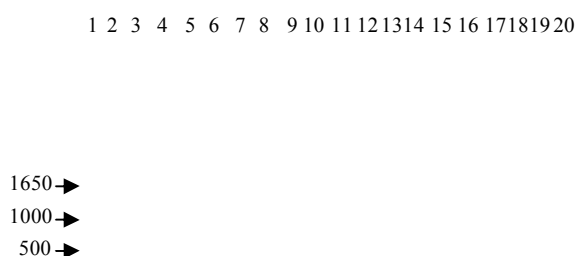


Рис. 3. Результати молекулярного аналізу хлДНК рослин *S. sinuata*, отриманих в результаті соматичної гібридизації. 1– 6 - фрагмент між генами *trnL* та *ndhD*, ампліфікований за допомогою ПЛР і оброблений рестриктазою *EcoRI*; 7 - 1 Kb Plus DNA Ladder (Gibco); 8 - 13 - фрагмент, ампліфікований з використанням праймерів, один з яких є специфічним до гену *aadA*, а другий до ділянки хлДНК; 14 - 20 - фрагмент, ампліфікований з використанням праймерів специфічних до гену *aadA*; 1 - *N. tabacum*; 2, 9, 16 - *S. sinuata*, дикий тип; 3, 10, 17 - *S. sinuata*, клон 1; 4, 11, 18 - *S. sinuata*, клон 2; 5, 12, 19 - *S. sinuata*, клон 3; 6, 13, 20 - *S. sinuata*, клон 4; 8, 15 - транспластомний цибрид *N. tabacum* (+ *S. sinuata*); 14 - позитивний контроль, плазмід рCB033.

Як видно з рисунку 3 (лінії 8 – 13) ПЛР-аналіз відібраних рослин *S. sinuata*, виконаний з праймерами, один з яких є специфічним до гену *aadA*, а другий до ділянки хлДНК, підтвердив присутність гена *aadA* в пластомній ДНК. Рестриктний аналіз ділянки хлоропластного геному між генами *trnL* і *ndhD* показав, що рослини містять хлДНК *S. sinuata* (рис.3; лінії 1 - 6).

МтДНК вихідних цибридних рослин *N. tabacum* (+ *S. sinuata*), які були використані для отримання транспластомних рослин *S. sinuata*, містила фрагменти, не властиві мтДНК рослин *S. sinuata* дикого типу, тобто під час соматичної гібридизації *N. tabacum* та *S. sinuata* цибридними рослинами була успадкована мтДНК як *S. sinuata* так і *N. tabacum* (Thanh *et al.*, 1988). У наших експериментах рослини *S. sinuata* могли отримати мтДНК і від цибриду *N. tabacum* (+ *S. sinuata*) і

від рослин *S. sinuata* дикого типу. Тому ми проаналізували гени *ndh1*, *ndh4*, *ndh5* та *ndh7* мтДНК транспластомних рослин *S. sinuata*, отриманих у наших експериментах. Рестриктний аналіз гена *ndh1* показав наявність фрагментів, властивих мтДНК рослин *N. tabacum* та *S. sinuata*.

Для перевірки наявності ядерного матеріалу *N. tabacum* в транспластомних рослинах *S. sinuata* був здійснений ряд аналізів ядерної ДНК. Під час аналізів порівнювали набір фрагментів ядерної ДНК, отриманих за допомогою ПЛР з праймерами 5' - (TCC)x5 – 3' та набір фрагментів теломерних послідовностей, що синтезувалися з праймерами 5' – (TTTAGGG)x3 – 3' у батьківських рослин та транспластомних рослин *S. sinuata*. Був також проведений ПЛР-аналіз гена 5S рДНК та рестриктний аналіз з використанням рестриктази *DraI* ампліфікованих за допомогою ПЛР фрагментів ITS (внутрішній спейсер, що транскрибується; від англ. internal transcribed spacer). Додатково до ПЛР- та рестриктного аналізів досліджували спектри множинних молекулярних форм амілаз та естераз, які також не показали наявності ядерного матеріалу *N. tabacum* в транспластомних рослинах *S. sinuata*.

Результати аналізу транспластомних рослин *S. sinuata* отриманих у результаті соматичної гібридизації транспластомних цибридних рослин *N. tabacum* (+ *S. sinuata*) та рослин *S. sinuata* дикого типу показали, що рослини містять хлоропластну ДНК *S. sinuata* з вбудованим геном *aadA*. МтДНК рослин *S. sinuata* успадкована від рослин *N. tabacum* та *S. sinuata*. ПЛР-, рестриктний аналізи ядерної ДНК та дослідження множинних молекулярних форм амілаз та естераз не виявили ядерного матеріалу *N. tabacum* в транспластомних рослинах *S. sinuata*.

Використання трансгенних пластид *Nicotiana tabacum* в експериментах із соматичної гібридизації. Для цієї серії експериментів була використана векторна конструкція pICF584, яка крім селективного гена *aadA* містила ще і репортерний ген *uidA*, що кодує β-глюкуронідазу. Використання репортерного гена *uidA* (продукт експресії якого легко ідентифікується за специфічною реакцією з 5-бромо-4-хлоро-3-індоліл-β-D-глюкуронідазою) дає додаткові можливості для дослідження експресії трансгену на різних етапах розвитку рослинних клонів та в різноманітних тканинах і органах.

Спершу, використовуючи методику хлоропластної трансформації, описану в статті Коор *et al.*, 1996, здійснили трансформацію рослин тютюну, отримавши рослини, які в хлоропластному геномі містять селективний ген *aadA* та репортерний ген *uidA*. Наступним етапом було перенесення трансформованих хлоропластів з транспластомних рослин тютюну до рослин іншого виду за допомогою соматичної гібридизації. Реципієнтами трансгенних пластид тютюну були обрані рослини *L. barbarum*, дикого представника родини пасльонових. Ці рослини мають їстівні плоди та здавна застосовуються людиною в медицині. Їх також часто використовують як декоративні рослини. Зацікавленість рослинами *L. barbarum* пов'язана з потенційною можливістю їх використання для створення їстівних вакцин. Такий альтернативний спосіб введення вакцин в

організм людини обговорюється в літературі саме в зв'язку з розвитком технології пластидної трансформації (Daniell *et al.*, 2001).

Для отримання рослин з ядром *L. barbarum* та пластомом *N. tabacum* ядро клітин тютюну інактивували шляхом опромінення рослин гамма-променями перед виділенням протопластів. Отримані на селективному середовищі рослини могли бути також асиметричними гібридами з частиною ядерного матеріалу тютюну в рослинах *L. barbarum*. У результаті експериментів було відібрано 7 зелених колоній. Шість із них втратили зелене забарвлення і припинили ріст протягом кількох місяців культивування на селективному середовищі (300 мг/л спектиноміцину), а одна продовжувала рости і залишалася зеленою. Відібрана зелена колонія почала регенерувати через 8 місяців культивування на регенераційному селективному середовищі (300 мг/л спектиноміцину). Було отримано 5 регенерантів. Усі регенеранти мають насичений зелений колір і за морфологією подібні до рослин *L. barbarum* дикого типу (рис.4).

Рис. 4. Порівняння морфології рослини *L. barbarum* дикого типу (А) та рослини, отриманої в результаті соматичної гібридизації транспластомної рослини *N. tabacum* і рослини *L. barbarum* (В).

Транспластомні рослини тютюну, використані для соматичної гібридизації, містили ген *uidA*, продукт експресії якого, β -глюкуронідаза, виявляється за специфічним синім забарвленням під час гістохімічної реакції. Листки рослин-регенерантів, отриманих в результаті соматичної гібридизації, також забарвлюються в синій колір під час гістохімічного аналізу, що свідчить про активність гена *uidA* в рослинах-регенерантах (рис.5).

Рис. 5. Аналіз активності гена *uidA* в тканинах листків рослини, отриманої в результаті соматичної гібридизації транспластомної рослини *N. tabacum* і рослини *L. barbarum*. А – контроль, лист рослини *L. barbarum* дикого типу; В - лист рослини, отриманої в результаті соматичної гібридизації.

ПЛР-аналіз з праймерами, специфічними до гену *aadA*, підтвердив наявність гена *aadA* в клітинах відібраної колонії. Для дослідження природи хлоропластної ДНК колонії, отриманої в результаті соматичної гібридизації, був виконаний порівняльний аналіз рестриктних спектрів ампліфікованого за допомогою полімеразної ланцюгової реакції фрагменту *trnL-ndhD* хлДНК. Для виявлення можливої гібридної природи ядерного геному відібраної колонії, отриманої в результаті соматичної гібридизації був проведений ПЛР-аналіз з праймерами, специфічними до

гену 5S рДНК. Аналізи показали, що колонія містить пластидну ДНК тютюну, та ядерну ДНК *L. barbarum*.

Заключне слово і перспективи. Запропонований нами підхід дає можливість отримувати пластидні трансформанти видів, які мають низький регенераційний та трансформаційний потенціал. Звісно, підхід має певні обмеження і потребує детальнішої розробки. До недоліків можна віднести велику кількість етапів виконання, що потребує багато часу, а також, збільшення імовірності виникнення порушень, пов'язаних із соматональною мінливістю. У даній роботі, в основному, використовувалися модельні та дикі представники родини пасльонових. Ми сподіваємося на успішне продовження розпочатої роботи з іншими видами рослин та з іншими векторними конструкціями і трансгенами.

Загалом підхід дозволяє: підвищувати ефективність трансформації пластомної ДНК видів з низьким трансформаційним потенціалом; створювати марковані пластоми та з їх допомогою вести пошук нових сумісних ядерно-цитоплазматичних комбінацій; досліджувати вплив ядра на процеси, що відбуваються в пластомі, вивчати ядерно-цитоплазматичні взаємовідносини.

ВИСНОВКИ

1. Запропоновано та розроблено новий підхід до здійснення пластидної трансформації. Підхід полягає в перенесенні пластид від рослини, що цікавить, до рослини-посередника (рослини з високою регенераційною здатністю), трансформації пластид та їх зворотньому перенесенні.

2. Показана можливість генетичної трансформації пластоми хлоропластів, що функціонують в клітинах інших видів.

3. Вперше отримано хлоропластні трансформанти цибридних рослин *Nicotiana tabacum* (+ *Scopolia carniolica*), *Nicotiana tabacum* (+ *Physochlaina officinalis*) та *Nicotiana tabacum* (+ *Salpiglossis sinuata*).

4. Отримано хлоропластні трансформанти *Salpiglossis sinuata* за допомогою соматичної гібридизації між транспластомними рослинами *Nicotiana tabacum* (+ *Salpiglossis sinuata*) та рослинами *Salpiglossis sinuata* дикого типу.

5. Молекулярно-біологічний аналіз транспластомних рослин *Salpiglossis sinuata* показав, що вони мають ядерну та пластидну ДНК *Salpiglossis sinuata*, а мітохондріон успадкували від *Nicotiana tabacum* та *Salpiglossis sinuata*.

6. Отримано трансформанти *Nicotiana tabacum* з селективним геном *aadA* та репортерним геном *uidA*, що експресуються в хлоропластах.

7. Показана можливість отримання гібридної рослини в результаті соматичної гібридизації транспластомної рослини *Nicotiana tabacum* з генами *uidA* та *aadA*, вбудованими в хлоропластний геном та рослини *Lycium barbarum* дикого типу. На селективному середовищі була відібрана одна

зелена колонія, з якої було отримано п'ять регенерантів. Листові тканини рослин-регенерантів експресують ген *uidA*.

8. Молекулярно-біологічний аналіз колонії, отриманої в результаті соматичної гібридизації транспластомної рослини *Nicotiana tabacum* та рослини *Lycium barbarum* дикого типу, показав, що хлоропластний геном колонія отримала від *Nicotiana tabacum*, ген *aadA* присутній в пластомі, а в ядерній ДНК не виявлено генетичного матеріалу *Nicotiana tabacum*. Отже, показано, що ядро *Lycium barbarum* та пластом *Nicotiana tabacum* можуть спільно функціонувати.

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Ситник К.С., Кучук М.В. Отримання транспластомних рослин *Salpiglossis sinuata* // Науковий вісник НАНУ. – 2003. - Т. 65. - С. 52 – 55.
2. Сытник Е.С., Парий А.Ф., Комарницкий И.К., Глеба Ю.Ю., Кучук Н.В. Анализ ядерного и митохондриального геномов у транспластомных растений *Salpiglossis sinuata*, полученных путем переноса трансформированных пластид от цибрида *N. tabacum* (+ *S. sinuata*) // Цитология и генетика. – 2003. - Т. 37. - № 5. - С. 3 – 8.
3. Ситник К.С., Комарницький І.К., Глеба Ю.Ю., Кучук М.В. Генетична трансформація пластомів цибридних рослин *Nicotiana tabacum* (+ *Scopolia carniolica*) та *Nicotiana tabacum* (+ *Physochlaine officinalis*) // Український ботанічний журнал. - 2003. - Т. 60. - № 5. - С. 517 – 522.
4. Sytnik E., Vasilenko M., Komarnitsky I., Kuchuk N. Plastid transformation of cybrid plants carrying *Nicotiana tabacum* nuclear genome and plastomes of *Scopolia carniolica*, *Lycium barbarum*, *Physochlaine officinalis* and *Salpiglossis sinuata* // Abstracts of the conference “Biotechnology approaches for exploitation and preservation of plant resources”. – Yalta. - 2002. – С. 77.
5. Сытник Е.С., Бреус О.С. Получение пластомных трансформантов растений *Salpiglossis sinuata* // Сборник тезисов 2 – ой международной конференции молодых ученых “Современные проблемы генетики, биотехнологии и селекции растений”. – Харьков. – 2003. – С.94.
6. Сытник Е.С., Бреус О.С., Кучук Н.В. Пластомная трансформация цибридних растений // Сборник тезисов IV Международной конференции “Геном растений”. – Одесса. - 2003. – С. 75.
7. Sytnik E., Breus O. Plastid transformation of cybrid plants // Abstract book of the Conference for young scientists, PhD students and students on molecular biology and genetics. - Kyiv. - 2003. – С. 34.
8. Ситник К.С., Комарницький І.К. Отримання рослин *Lycium barbarum* з генетично зміненим пластомом *Nicotiana tabacum* // Тези доповідей Установчого з'їзду Українського товариства клітинної біології. – Львів. – 2004. - С. 99.

АНОТАЦІЯ

Ситник К.С. Розробка модельної системи отримання транспластомних рослин на прикладі представників родини пасльонових.– Рукопис.

Дисертація на здобуття вченого ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Київ, 2004.

В дисертаційній роботі запропоновано та розроблено новий підхід для здійснення пластидної трансформації. Підхід полягає в створенні за допомогою соматичної гібридизації цибридних рослин з ядром рослини, яка має високу регенераційну здатність та пластидами рослини, що цікавить, але має низьку регенераційну та трансформаційну здатність; генетичній трансформації пластид та зворотньому їх перенесенні в клітини того ж виду, до якого належать пластиди або до іншого виду, ядро якого є сумісним з даним пластомом.

На першому етапі роботи за допомогою методу обробки протопластів поліетиленгліколем векторною плазмідною з селективним геном *aadA* (аминоглікозид 3'-аденілінтрансфераза), оточеним гомологічними послідовностями хлДНК, виконали трансформацію хлДНК отриманих раніше цибридних рослин *Nicotiana tabacum* (+ *Scopolia carniolica*), *Nicotiana tabacum* (+ *Physochlaine officinalis*) та *Nicotiana tabacum* (+ *Salpiglossis sinuata*). Трансформовані рослини відбирали на селективному середовищі зі спектиноміцином. Другий етап полягав в перенесенні трансгенних пластид *Salpiglossis sinuata* з цибридної рослини до рослин *Salpiglossis sinuata* дикого типу. В наступній серії експериментів векторною конструкцією з селективним геном *aadA* та репортерним геном *uidA* (ген β-глюкуронідази) здійснили хлоропластну трансформацію рослин тютюну та перенесли трансгенні пластиди тютюну в рослини *Lycium barbarum*.

Ключові слова: тютюн, пасльонові, цибрид, протопласт, пластидна трансформація, соматична гібридизація, ген аміноглікозид 3'-аденілінтрансферази, ген β-глюкуронідази.

АННОТАЦИЯ

Сытник Е.С. Разработка модельной системы получения транспластомных растений на примере представителей семейства паслёновых. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.20 – биотехнология. Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев, 2004.

В диссертационной работе предложен и разработан новый подход к осуществлению пластидной трансформации. Подход состоит в создании с помощью соматической гибридизации гибридных растений с ядром растений имеющих высокую регенерационную способность и пластидами интересующих растений, но имеющих низкую регенерационную и трансформационную способность; генетической трансформации пластид созданных гибридных растений и переносе их в клетки того же вида, которому принадлежат пластиды или в клетки другого вида, ядро которого совместимо с данным пластомом.

На первом этапе экспериментов с помощью метода обработки протопластов полиэтиленгликолем выполнили трансформацию хлДНК ранее созданных гибридных растений *Nicotiana tabacum* (+ *Scopolia carniolica*), *Nicotiana tabacum* (+ *Physochlaine officinalis*) и *Nicotiana tabacum* (+ *Salpiglossis sinuata*). Трансформацию осуществляли векторной конструкцией с селективным геном *aadA* (ген аминогликозид-3'-аденилтрансферазы), окруженным гомологическими последовательностями хлДНК (геном *rpl32* (рибосомальный белок) и геном *trnL* (тРНК лейцина) малой уникальной области пластома табака), что обеспечивает встраивание трансгена в определенную область пластома.

Второй этап экспериментов состоял в переносе с помощью соматической гибридизации трансгенных пластид из гибридных растений *Nicotiana tabacum* (+ *Salpiglossis sinuata*) в растения *Salpiglossis sinuata* дикого типа. Для отбора необходимых продуктов слияния (растений с ядром *Salpiglossis sinuata* и трансгенным пластомом *Salpiglossis sinuata*) развитие одного из родителей, донора хлоропластов (транспластомное гибридное растение *Nicotiana tabacum* (+ *Salpiglossis sinuata*)) инактивировали облучением γ -лучами в дозе 500 – 600 Гр (источник - Co^{60} , 0,1 Гр/сек). Деление протопластов второго родителя, растения *Salpiglossis sinuata* дикого типа, предотвращали добавлением в питательную среду селективного антибиотика спектиномицина.

С четырьмя отобранными на селективной среде растениями был осуществлен молекулярно-биологический анализ ядерной, хлоропластной и митохондриальной ДНК. Анализ подтвердил присутствие трансгена в пластоме отобранных растений, показал, что растения имеют пластом *Salpiglossis sinuata*, а митохондриальная ДНК унаследована как от растений *N. tabacum* так и от растений *S. sinuata*. ПЦР-анализ и рестриктный анализ ряда областей ядерной ДНК, а также анализ множественных молекулярных форм ферментов амилазы и эстеразы показал, что во всех случаях

фрагменты ДНК транспластомных растений *S. sinuata* идентичны тем, которые синтезируются с ДНК растений *S. sinuata* дикого типа и отличаются от фрагментов табака.

В следующей серии экспериментов получили транспластомные растения табака и перенесли с помощью соматической гибридизации трансгенные хлоропласты табака в растения *Lycium barbarum*. Для этих экспериментов использовали векторную конструкцию с селективным геном *aadA* и репортерным геном *uidA* (ген β -глюкуронидазы). Гены находятся между последовательностями *psbA* (D1 белок фотосистемы II) и *trnH* (тРНК гистидина) большой уникальной области пластома табака. В результате экспериментов была отобрана одна колония, которая через восемь месяцев культивирования на регенерационной селективной среде дала пять регенерантов. Морфологически растения-регенеранты похожи на растения *Lycium barbarum* дикого типа. Молекулярно-биологический анализ колонии показал, что ген *aadA* присутствует в пластоме, пластиды унаследованы от табака, а ядро – от *Lycium barbarum*. Гистохимический анализ активности гена β -глюкуронидазы в тканях листа дал специфическую синюю окраску, что подтверждает наличие экспрессии *uidA* гена.

Ключевые слова: табак, паслёновые, цибрид, протопласт, пластидная трансформация, соматическая гибридизация, ген аминокликозид-3'-аденилтрансферазы, ген β -глюкуронидазы.

SUMMERY

Sytynyk K.S. Development of model system of transplastomic plants receiving by the example of Solanaceae family representatives.- Manuscript.

Thesis for a PhD degree (Biology) by speciality 03.00.20 – biotechnology. – Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2004.

The thesis is devoted to development of a new approach to recalcitrant species plastid transformation. We studied plastid transformability of remote cytoplasmic hybrids (cybrids) that combine nucleus of tobacco, an easily transformable species, and plastids of other, recalcitrant *Solanaceae* species. In such experiments tobacco cells used as a transformable intermediary host. In present work, we carried out genetic transformation of plastids of cybrid *Nicotiana tabacum* (+ *Scopolia carniolica*), *Nicotiana tabacum* (+ *Physochlaine officinalis*) and *Nicotiana tabacum* (+ *Salpiglossis sinuata*) plants. The vector plasmid that contains selective *aadA* gene (aminoglycoside 3'-adenylntransferase) flanked by *rpl32* (ribosomal protein) and *trnL* (tRNA-Leu) genes of tobacco plastome for targeting *aadA* gene to this specific region of chloroplast genome was used. Second stage of our experiments was transferring by somatic hybridization *Salpiglossis sinuata* transgenic chloroplasts from cybrid plants to wild type *Salpiglossis sinuata* plants.

The next series of our experiments consists in creation of transplastomic tobacco plants and transferring by somatic hybridization transgenic tobacco plastids to *Lycium barbarum* plants. For these experiments vector plasmid that contains selective *aadA* gene and reporter *uidA* (gene that encode β -glucuronidase) was used.

Key words: tobacco, *Solanaceae*, cybrid, protoplast, plastid transformation, somatic hybridization, aminoglycoside 3'-adenylntransferase, β -glucuronidase.