

УДК 577.15 + 581.198

## ДЕЯКІ ФІЗІОЛОГІЧНІ І БІОХІМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ТРАНСГЕННИХ РОСЛИН КАРТОПЛІ

Тоцький В. М., Д'яченко Л. Ф., Топтіков В. А., Полодієнко О. Б.

Одеський державний університет, кафедра генетики та молекулярної біології,  
вул. Дворянська, 2, Одеса, 270100, Україна

Методом трансформації з використанням *Agrobacterium tumefaciens* отримано трансгенні форми декількох сортів картоплі, які містять чужорідний ген *agoA*, що обумовлює стійкість до гербіциду гліфосату. Трансгенні рослини, в порівнянні з контрольними, крім стійкості до гербіциду, виявляють і інші фізіологічні та біохімічні властивості. Отримані трансгенні рослини використовуються як модельні об'єкти при вивченні особливостей експресії та взаємодії генів після введення у геном чужорідної генетичної інформації.

**Ключові слова:** картопля, трансгенні форми, фенотипові особливості, пероксидаза.

В останні роки все більш розповсюдженим методом трансформації вищих рослин стає спосіб з використанням *Agrobacterium tumefaciens* [2, 7]. Це значно зручніше, ніж використання протопластів, оскільки для багатьох видів рослин регенерація з протопластів є досить проблематичним завданням. У наших досліджах використовували бактерії, які містили плазмиду з геном стійкості до гліфосату. Гліфосат (N-фосфометилгліцин) належить до гербіцидів нового покоління. Він ефективно пригнічує синтез ароматичних амінокислот у рослин і бактерій, але є нешкідливим для людини і тварин [5]. Цей гербіцид швидко метаболізується у природі, внаслідок чого не нагромаджується в навколишньому середовищі. Однак, гліфосат не є селективним, що обмежує його застосування [9]. Ферментом-мішенню для гліфосату є EPSP-синтаза (3-енол-пирувілшикімат-5-фосфатсинтаза), яка кодується геном *agoA* [6]. Передача в рослини мутантного *agoA* гена, який кодує слабочутливий до гліфосату фермент, сприяє отриманню гербіцидо-стійких рослин [6, 7, 8], що дає можливість використати цей гербіцид у сільському господарстві.

Вихідним матеріалом для дослідів були асептичні рослини картоплі сортів Зарево, Дойна, Спринтер, Світлячок, Ягідка. Експлантами правили частки стебла, листової пластинки, фрагменти мікробульб. Протягом години їх інкубували разом з добовою культурою *A. tumefaciens*, котра мала плазмиду pGY 941. Після цього експланти переносили на середовище K-3 чи K-3NM [4], яке сприяє регенерації рослин. До цього середовища додавали 500 мг/л клафорану або 200 мг/л карбеніциліну, щоб не допустити росту агробактерії і 75—100 мг/л канаміцину. Останній антибіотик використовували з метою вияву маркерного гена NTP II (неоміцинтрансферази), який містила плазміда і котрий кодує стійкість до канаміцину. Звичайні рослини картоплі за наявності канаміцину дають етиольовані паростки, а потім зовсім гинуть. У випадку, коли в геном рослини включиться ген стійкості до канаміцину, вона набуває властивість зберігати нор-

мальне забарвлення і після внесення у середовище антибіотику. Таким чином, зелене забарвлення рослини за наявності канаміцину у середовищі свідчить про трансгенну природу рослини, тобто є маркером трансформованого організму.

У результаті роботи, яка проведена сумісно з Інститутом фізіології рослин і генетики АН України, отримано декілька рослин картоплі, що залишались зеленими в умовах культивування на селективному середовищі з канаміцином. Проведено молекулярно-біологічний аналіз рослин. За допомогою методу дот-гібридизації [3] показано, що вони дають позитивний авторадіографічний результат на використання зонду —  $P^{32}$ -фрагмента ДНК, який містив ген стійкості до гліфосату. Блотинг-гібридизація [3] довела інтеграцію гена стійкості до гліфосату в геном картоплі. При проведенні блотинг-гібридизації ДНК розщеплювали рестриктазою *Bam* HI, потім переносили на нітроцелюлозний фільтр і гібридували з тим же міченим зондом (фрагмент гена *agoA*), що і при дот-гібридизації. В результаті аналізу знайдено, що з зондом гібридується *Bam* HI-фрагмент ДНК картоплі розміром  $1,7 \cdot 10^3$  пар нуклеотидів.

Таким чином, унаслідок штучного включення мутантного гена *agoA* в рослину ДНК отримано трансгенні рослини картоплі. В деяких із них відмічено експресію гена *agoA*. Ця експресія виражалась у тому, що трансгенні рослини витримали обприскування розчином гліфосату (15 г/л), тоді як контрольні гинули через два тижні після зазначеної обробки.

У науковій літературі з'являється все більше даних про вплив інтегрованих у рослину ДНК генів T-фрагмента агробактерії, які кодують синтез фітогормонів [1]. Припускається, що ген NTP II теж має гормональну функцію. Оскільки триптофан грає найважливішу роль у синтезі ауксинів, ми перевірили його вміст у трансгенних рослинах і порівнювали з контрольними. Дані представлено в табл. 1.

Отримані дані свідчать, що інтеграція плазмиди pGV 941 у геном картоплі веде до зменшення кількості триптофану в рослинах. Рівень зменшення неоднаковий по сортах: він найбільш помітний (зменшення в 1,5—2 рази) у трансгенних рослин сорту Дойна. Цей факт цілком узгоджується з даними про взаємний вплив інтегрованих генів і генів рослини-хазяїна [1].

Таблиця 1

Вміст триптофану в рослинах картоплі (на 1 г сухої ваги) — середнє трьох дослідів

Сорт	Варіант	Вміст триптофану, %
Спринтер	Трансгенний 1	48
	Контроль	63
Дойна	Трансгенний 2	33
	Трансгенний 3	40
	Контроль	60
Світлячок	Трансгенний 1	53
	Трансгенний 2	50
	Трансгенний 3	40
	Контроль	60

У зв'язку з фактом імовірної мінливості гормонального фону, великий інтерес

викликають й інші властивості трансгенних рослин, зокрема реакція рослин за культивування *in vitro*.

Досліджували ефективність калусоутворення в експлантів трансгенних і контрольних рослин картоплі. Швидкість наростання калусів трансформованих рослин незалежно від сорту істотно відрізняється від контрольних. Взагалі вона значно нижча порівняно з контролем, і тільки в одному випадку з експлантів стебел трансгенних рослин сорту Спринтер калусні тканини мали майже в три рази більшу вагу. Важливо, що варіанти трансгенних рослин одного сорту теж розрізняються здатністю щодо калусоутворення. Трансгенні рослини сортів Дойна і Світлячок відрізняються від звичайних рослин вихідного сорту особливостями формування мінібульб при культивуванні *in vitro*: змінюються строки появи перших бульб, їх кількість на рослині (табл. 2).

Таблиця 2

Утворення мінібульб рослинами картоплі *in vitro* (середнє трьох дослідів)

Сорт, варіант	Кількість днів до появи першої бульби	Кількість бульб через один місяць	Кількість бульб через два місяці	Кількість бульб у розрахунку на 1 рослину
Дойна, контроль	13	7	7	1,4
Дойна, трансген. 2	14	2	5	1,0
Дойна, трансген. 3	9	7	12	2,4
Зарево, контроль	15	3	5	1,0
Зарево, трансген. 1	7	6	7	1,4
Світлячок, контроль	13	8	9	1,8
Світлячок, трансген. 1	7	5	9	1,8
Світлячок, трансген. 2	21	3	5	1,0
Спринтер, контроль	21	6	6	1,2
Спринтер, трансген. 1	7	3	5	1,0
Ягідка, контроль	17	3	6	1,2
Ягідка, трансген. 1	25	4	8	1,6

Цікаво, що як за калусоутворення, так і за формування мінібульб різні варіанти трансгенних рослин одного сорту поведуться неоднаково в аналогічних умовах. Одержані дані вказують на те, що експресія гена (не виключаючи і чужорідного) значно залежить від того, які інші гени його оточують.

Проаналізовано також спектр множинних молекулярних форм пероксидази, їх субстратну специфічність. В інтактних пробіркових рослинах (як звичайних, так і трансгенних форм) не знайдено відмінностей щодо спектрів пероксидази. Однак, у нормальних і трансгенних калусах виявлено істотні відмінності щодо вигляду електрофоретичних спектрів, а також активності і специфічності до різних субстратів окремих ізоформ пероксидази. Є підстава вважати, що у трансгенних рослин експресія генів пероксидази за калусоутворення і подальшого культивування клітин істотно відрізняється від контролю.

Таким чином, у результаті трансформації з використанням *A. tumefaciens* отримано трансгенні форми декількох сортів картоплі. Ці рослини містять у складі

свої ДНК чужорідний ген *aroA*, який обумовлює стійкість до гербіциду гліфосату. З'ясовано, що трансгенні рослини в порівнянні з контрольними мають нові властивості — стійкість до гербіциду гліфосату й антибіотика канаміцину, по-іншому реагують на той самий склад гормонів у живильному середовищі, а також відрізняються іншими фізіолого-біохімічними властивостями. Це дозволяє використовувати ці рослини як модель за дослідження взаємодії генів в умовах введення чужорідної генетичної інформації.

## Література

1. Булгаков В. П., Журавлев Ю. Н. Культуры трансформированных клеток растений как новый источник получения продуктов вторичного метаболизма // Успехи совр. биологии. — 1992. — Т. 112, № 3. — С. 342—349.
2. Глаголецкая Г. Ц., Шульга О. А., Сидоров В. А. и др. Трансгенные растения картофеля с чужеродным геном белка оболочки X-вируса картофеля // Докл. АН СССР. — 1990. — № 5. — С. 1240—1243.
3. Гловер Д. Клонирование ДНК. Методы. — М.: Мир, 1988. — 538 с.
4. Сидоров В. А., Пивень И. М., Глеба Ю. Ю., Сытник К. М. Соматическая гибридизация пасленовых. — К.: Наукова думка, 1985. — 130 с.
5. Comai L., Len L. C., Stalker D. M. An altered *aroA* gene product confers resistence to the herbicide glyphosate // Science. — 1983. — V. 221, № 4608. — P. 370—371.
6. Comai L., Faccioli A., Hiatt R. et al. Expression in plants of a mutant *aroA* gene from *Salmonella typhimurium* confers tolerance to glyphosate // Nature. — 1985. — V. 137. — P. 741—744.
7. Fillati J. J., Kiser J., Rose R., Comai L. Efficient transfer of a gene into tomato using a binary *Agrobacterium tumefaciens* vector // Biotechnology. — 1987. — V. 5. — P. 726—730.
8. Grut W., Delon R., Block M., Liemons J., Botterman J. Evaluation of herbicide resistence in transgenic crops under field conditions // Biotechnology. — 1989. — V. 7, № 6. — P. 61—64.
9. La Rossa R. A., Falco S. C. Amino acid biosynthetic enzymes as targets of herbicide action // Trends in Biotechnology. — 1984. — V. 2, № 6. — P. 158—161.

## НЕКОТОРЫЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ

Тоцкий В. Н., Дьяченко Л. Ф., Топтиков В. А., Полодиенко О. Б.

Одесский государственный университет, кафедра генетики и молекулярной биологии, ул. Дворянская, 2, Одесса, 270026, Украина

### Резюме

Методом трансформации с использованием *Agrobacterium tumefaciens* получены трансгенные формы нескольких сортов картофеля, которые содержат чужеродный ген — *aroA*, обуславливающий резистентность к гербициду гліфосату. Трансгенные растения, по сравнению с контролем, кроме стойкости к гербициду имеют и другие физиологические и биохимические особенности. Полученные трансгенные растения используются как модельные объекты для изучения особенностей экспрессии и взаимодействия генов после введения в геном чужеродной генетической информации.

**Ключевые слова:** картофель, трансгенные формы, фенотипические особенности, пероксидаза.

**SOME PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PARTICULARITIES  
OF TRANSGENIC POTATO PLANTS**

**V. N. Totsky, L. F. Diachenko, V. A. Toptikov, O. B. Polodienko**  
Odessa State University, Department of Genetic and Molecular Biology,  
Dvoryanskaya St., 2, Odessa, 270026, Ukraine

**Summary**

Several transgenic forms of potato were received as a result of *Agrobacterium tumefaciens* transformation. These forms contain foreign *aroA* gene, which causes a herbicide resistance. Transgenic plants in contrast with control plants have other physiological and biochemical peculiarities. These transgenic potato plants are used as a model for study of genes' expression and interaction after introduction of foreign genetic information.

**Key words:** potato, transgenic forms, biochemical peculiarities, peroxydase.