

УДК 575.133 : 579.254.2 : 582.683.2

І.О. НІТОВСЬКА, А.М. ШАХОВСЬКИЙ,  
І.К. КОМАРНИЦЬКИЙ, М.В. КУЧУК

Інститут клітинної біології і генетичної інженерії НАН України, Київ

**ОТРИМАННЯ СТІЙКИХ ДО  
СПЕКТИНОМІЦИНУ/СТРЕПТОМІЦИНУ  
КЛІТИННИХ ЛІНІЙ  
BRASSICA OLERACEA  
(+ ARABIDOPSIS THALIANA)  
ТА BRASSICA NAPUS ПІСЛЯ  
ГЕНЕТИЧНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ  
ПЛАСТОМУ**



Генетичну трансформацію пластид *Arabidopsis thaliana* і *Brassica napus* проводили за допомогою методів ПЕГ-обробки протопластів соматичних гібридів *B. oleracea* з хлоропластами *A. thaliana* та бомбардування мікрочастками вольфраму регенераційно здатного калюсу *B. napus* сорту Westar. В експериментах використовували генетичну конструкцію рСВ040, яка містить ген стійкості до спектиноміцину/стрептоміцину (*aadA*) в межах послідовностей, гомологічних до ділянки пластоми ріпака *trnV-rps7*. Селекцію транспластомних клітинних ліній проводили за здатністю рости на середовищі з високими концентраціями спектиноміцину та стрептоміцину. Стійкі до антибіотиків клітинні лінії отримали після використання обох методів трансформації. За допомогою методу ПЛР показали присутність гена *aadA* в пластоми *A. thaliana* і *B. napus* для двох клітинних ліній *B. oleracea* (+ *A. thaliana*) та трьох ліній *B. napus* відповідно.

© І.О. НІТОВСЬКА, А.М. ШАХОВСЬКИЙ,  
І.К. КОМАРНИЦЬКИЙ, М.В. КУЧУК, 2006

ISSN 0564-3783. Цитология и генетика. 2006. № 3

**Вступ.** Генетична інженерія рослин є ефективним та потужним методом цілеспрямованого змінення сортів господарсько корисних видів [1]. Проте істотним недоліком ядерної трансформації є неконтрольоване розповсюдження чужинної генетичної інформації в навколишньому середовищі, яке відбувається через пилок генетично модифікованих рослин шляхом запилення зі спорідненими видами. З цієї причини найбільш привабливим напрямком генетичної трансформації рослин є трансформація пластид та отримання транспластомних рослин. Трансформація пластоми має ряд певних переваг порівняно з ядерною трансформацією, зокрема, успадкування пластоми по материнській лінії, що запобігає неконтрольованому розповсюдженню трансгена в навколишньому середовищі через пилок, високий рівень експресії і акумуляції білків за рахунок великої кількості копій пластидної ДНК в клітині тощо [2]. В останні роки дослідження зі створення транспластомних рослин набувають все більшого поширення. Але незважаючи на привабливість пластидної трансформації, ефективні протоколи отримання транспластомних рослин розроблено на цей час тільки для тютюну [3, 4]. Отримання транспластомних рослин інших видів має певні складнощі. На цей час існує тільки по одному повідомленню про отримання транспластомних рослин деяких видів родин *Solanaceae* і *Brassicaceae*: *Solanum tuberosum* [5], *Lycopersicon esculentum* [6], *Glycine max* [7], *Petunia hybrida* [8], *Arabidopsis thaliana* [9], *Lesquerella fendleri* [10], *Brassica napus* [11].

Зазвичай стабільна трансформація пластид здійснюється в три етапи: введення в пластиду вектора, який містить селективний маркерний ген в межах гомологічних до пластоми ділянок; інтеграція трансформуючої ДНК в пластом шляхом гомологічної рекомбінації; елімінавання пластоми дикого типу під селекційним тиском [2].

Хоча пряме введення в пластиди генетичних конструкцій за допомогою біолістичного методу [12] є найбільш поширеним для отримання транспластомних рослин, було також показано успішну трансформацію пластоми за допомогою методу обробки протопластів поліетиленгліколем (ПЕГ) в присутності плазмідної ДНК [4, 13].

В нашій роботі ми мали за мету трансформувати пластоми *Arabidopsis thaliana* і *Brassica*

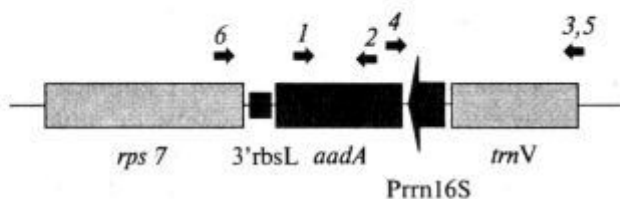


Рис. 1. Схема векторної конструкції рСВ040. Стрілки вказують на розміщення праймерів 1–6

*napus*. *A. thaliana* L. є модельним об'єктом генетики рослин, тоді як ріпак (*B. napus* L.) є важливою сільськогосподарською культурою і займає друге місце в світі серед олійних культур по валовому збору рослинної олії. Тому розробка ефективних протоколів трансформації пластоми *A. thaliana* і *B. napus* має важливе значення для проведення подальших досліджень з генетики пластид *Arabidopsis* та селекції ріпака.

Використовуючи методи ПЕГ-обробки протопластів та біолістичну трансформацію, ми отримали стійкі до спектиноміцину/стрептоміцину транспластомні клітинні лінії *B. oleracea* (+ *A. thaliana*) та *B. napus*, які містили ген *aadA* в пластидній ДНК.

**Матеріали і методи.** Для трансформації пластоми було використано генетичну конструкцію рСВ040 [14], люб'язно надану професором Н.-У. Коор (Ботанічний інститут Мюнхенського університету, Німеччина). Вона містить нуклеотидні послідовності, гомологічні до послідовностей пластидних генів ріпака *tmV* та *rps7*. Між гомологічними послідовностями знаходиться бактеріальний ген *aadA* під контролем промотора пластидного гена 16S rRNA (Prm16S) і термінатора гена *rbcL* пластоми *Chlamydomonas reinhardtii* (рис. 1). Ген *aadA* вбудовується в певні ділянки пластоми завдяки гомологічній рекомбінації. Плазмідну ДНК виділяли відповідно до інструкції, використовуючи Qiagen tip 500 набір для виділення ДНК (Qiagen, Hilden, Німеччина).

Для пластидної трансформації було використано такий рослинний матеріал: асиметричні соматичні гібриди *B. oleracea* з хлоропластами *A. thaliana*, лінії 13В, 28В та 25В [15]; ріпак сорту Westar. Гібридні рослини вирощували в асептичних умовах *in vitro* на безгормональному середовищі MS [16] при освітленні 2000 лк 16 год на добу і температурі 22–24 °С. Насіння ріпака стерилізували і пророщували

за методикою [17]. Для експериментів використовували сім'ядолі й гіпокотилі 1–2-тижневих паростків.

Протопласти гібридних рослин *B. oleracea* (+ *A. thaliana*) виділяли [17] і обробляли ПЕГ в присутності конструкції рСВ040 [18]. Культивування протопластів після трансформації проводили за методикою [15]. Для селекції клітин із трансформованим пластомом на другому тижні культивування в рідке поживне середовище додавали 10 мг/л спектиноміцину та поступово, кожні 5–6 днів, збільшували концентрацію антибіотика до 100 мг/л протягом місяця. Клітинні колонії переносили на тверде середовище ST-1 [19] зі спектиноміцином та стрептоміцином (по 100 мг/л кожного). Селекцію трансформованих ліній проводили за здатністю зеленіти та/або рости на селективному середовищі в присутності антибіотиків при освітленні 2000 лк 16 год на добу і температурі 22–24 °С. При подальшому пасуванні калюсів загальну концентрацію антибіотиків поступово збільшували до 1300 мг/л (800 мг/л спектиноміцину і 500 мг/л стрептоміцину). Стійкі до антибіотиків калюси переносили на регенераційне середовище R1, яке містило макро- і мікросолі MS, вітаміни Мореля [20], 10 г/л цукрози, 1 мг/л НОК та 1 мг/л ВАП.

В експериментах по трансформації пластоми біолістичним методом було використано калюс, отриманий із гіпокотилів і сім'ядолей ріпака сорту Westar. Для отримання калюсу гіпокотилі і сім'ядолі розрізали на шматочки, висаджували на середовище SH 30 [21] та вирощували в темряві при 25 °С. Перед трансформацією калюс переносили на тверде безгормональне середовище MS із 20 г/л цукрози та 0,3 М манітолом, покриваючи ділянку діаметром 3 см.

Процедуру трансформації здійснювали за допомогою гармати, виготовленої за кресленнями та рекомендаціями Finer [22]. Калюс бомбардували мікрочастками вольфраму діаметром 0,9–1,1 мкм з нанесеною плазмідною ДНК. Для приготування суспензії часток до 60 мг вольфраму додавали 1 мл абсолютного спирту і витримували на водяній бані при температурі 100 °С протягом години, після чого ретельно ресуспендували, використовуючи ультразвук (5 хв) та струшувач для мікроцентрифужних

пробірок (5 хв). Частинки вольфраму осаджували центрифугуванням (30 с на максимальній швидкості, мікроцентрифуга 5415С фірми «Eppendorf», Німеччина) і тричі відмивали стерильною водою. Частинки ресуспендували в 1 мл 50%-ного стерильного водного розчину гліцеролу. Далі до 50 мкл отриманої суспензії мікрочастинок вольфраму додавали 10 мкл водного розчину плазмідної ДНК (1 мкг/мкл), 50 мкл 2 М розчину CaCl<sub>2</sub> та 20 мкл 5 М розчину спермідину, ретельно перемішуючи розчини. Отриману суспензію залишали на 20 хв при кімнатній температурі. Потім частинки двічі відмивали 70%-ним спиртом від CaCl<sub>2</sub> і спермідину та ресуспендували в 50 мкл абсолютного спирту. На сітку насадки наносили 10 мкл отриманої суспензії. Відстань між соплом насадки та чашкою з калюсом становила 14 см, тиск гелію — 8 атм, вакууму — 0,05 атм.

Після трансформації калюс залишали на дві доби при освітленні 2000 лк, фотоперіод 16/8 год і температурі 22—24 °С, а потім висаджували на середовище ST-1 із спектиноміцином та стрептоміцином (по 150 мг/л). Кожні два тижні калюси переносили на свіже селективне середовище. Селекцію трансформованих ліній проводили за здатністю зеленіти та/або рости на селективному середовищі. Через півтора місяці стійкі до антибіотиків калюси перенесли на селективне середовище R1, яке містило 600 мг/л антибіотиків (по 300 мг/л кожного), та кожні два тижні замінювали його на свіже. Через два місяці культивування стійкий до антибіотиків калюс висаджували на середовище R1 із спектиноміцином та стрептоміцином (по 50 мг/л).

Стійкі до антибіотиків калюси аналізували за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) на ампліфікаторі «Терцик ІМ02» («ДНК-технологія», Москва).

Виділення тотальної рослинної ДНК для ПЛР аналізу проводили згідно з протоколом [23].

Для виявлення гена *aadA* в отриманому рослинному матеріалі використовували пару праймерів 1—2 (рис. 1), специфічних до внутрішньої частини гена *aadA*: 5'-CACTACATTTTCGCTCATCGCC-3' (праймер 1) і 5'-TGCTGGCCGTACATTTGTACG-3' (праймер 2). Розмір продукту, ампліфікованого за допомогою цих прай-

мерів, становить 479 п.н. Температура реасоціації становила 60 °С, тривалість реакції синтезу фрагмента — 1 хв при 72 °С.

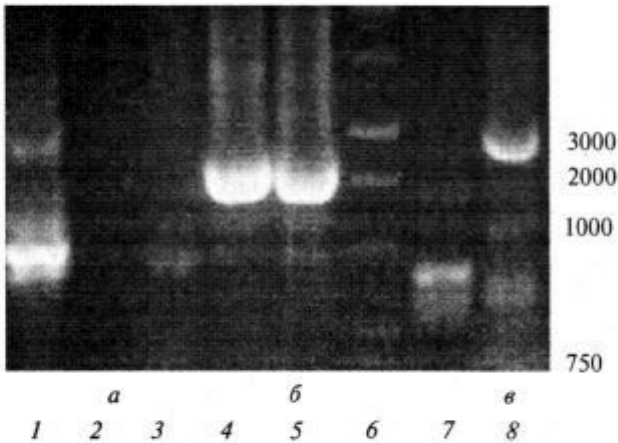
Для підтвердження локалізації гена *aadA* в пластидній ДНК використовували пару праймерів 3—4 (рис. 1), де праймер 3 (5'-CAGGCTCGAACTGATGACTTC-3') є специфічним до плДНК *Nicotiana tabacum*, ділянки гена *trnV*, а праймер 4 (5'-GGCGATAACCGCTTCACGAG-3') є специфічним до внутрішньої частини гена *aadA*, або праймери 4—5 (рис. 1), де праймер 5 (5'-ACGTCAAGGTGACACTCTAC-3') є специфічним до хлоропластної ДНК *Nicotiana tabacum*, ділянки гена *trnV*, яка знаходиться за межами вбудування вектора. Розмір ампліфікованого продукту становить 999 п.н. Температура реасоціації праймерів — 57 °С, тривалість реакції синтезу фрагмента — 1 хв при 72 °С.

Для виявлення плДНК дикого типу було застосовано пару праймерів 3—6 (рис. 1), де 6 (5'-GGTGCCAACAGTTAATCACGG-3') є специфічним до плДНК *B. napus*, ділянки гена *rps7*. Розмір ампліфікованого продукту для нетрансформованої плДНК становить 854 п.н. Температура реасоціації праймерів — 57 °С, тривалість реакції синтезу фрагмента — 4 хв при 72 °С.

**Результати дослідження.** Отримання транспластомних клітинних ліній *B. oleracea* (+*A. thaliana*). Експерименти по трансформації пластоми *Arabidopsis thaliana* проводили, використовуючи асиметричні соматичні гібриди між *Brassica oleracea* var. *capitata* L. і *Arabidopsis thaliana* L., які містять повний ядерний геном *Brassica*, незначну частину ядерного геному та пластом від *Arabidopsis*, а також реконструйований мітохондріон [15]. Для ПЕГ-індукованої трансформації протопластів відібрали три гібридні лінії рослин (13В, 25В і 28В), для яких ефективність висіву протопластів та регенераційна здатність протоклонів складала не менше 30 %.

Умови трансформації рослин оптимізували для кожної гібридної лінії. Найбільш чутливіми до обробки ПЕГ виявились протопласти, отримані з рослин гібридної лінії 28В, щільність яких потрібно було збільшувати вдвічі порівняно з гібридними лініями 13В та 25В. Ефективність висіву протопластів після трансформації або збігалася з контролем (без проце-





**Рис. 2.** Аналіз ДНК трансформованого калюсу *B. oleracea* (+ *A. thaliana*) за допомогою методу ПЛР: *a* — праймери 1—2, специфічні до внутрішньої частини гена *aadA*. Ампліфікована послідовність має 476 п.н.; 1 — плазміда рСВ040, 2 — контрольна нетрансформована рослина, 3 — трансформований калюс; *b* — праймери 3—6, специфічні до пластидної ДНК. Ампліфікована послідовність має 854 п.н.; 4 — контрольна нетрансформована рослина (4); 5 — трансформований калюс, 6 — маркерна ДНК; *в* — праймери 4—3, де один з них специфічний до внутрішньої частини гена *aadA*, а інший — до пластидної ДНК за межами вбудування вектора. Ампліфікована послідовність має 999 п.н.; 7 — контрольна нетрансформована рослина, 8 — трансформований калюс

дури трансформації), або була дещо нижчою та складала від 20 до 40 % для різних гібридних ліній.

Для трансформації було взято плазміду рСВ040 (рис. 1) з химерним геном *aadA*, продукт якого (фермент аміноглікозид-3'-аденілтрансфераза) забезпечує стійкість клітин до антибіотиків спектиноміцину і стрептоміцину. Тому клітинні колонії, отримані з протопластів, висаджували на селективні середовища зі спектиноміцином та стрептоміцином. Використання стрептоміцину було необхідним для попередження виникнення *rml16* мутантів. Ця пластомна мутація порушує зв'язування спектиноміцину, але не впливає на зв'язування стрептоміцину, тоді як аміноглікозид-3'-аденілтрансфераза інактивує обидва антибіотики [24]. У контролі повне знебарвлення калюсу із протопластів та припинення його росту відбувалось на середовищі, яке містило 400 мг/л спектиноміцину.

Було проведено вісім експериментів по трансформації протопластів гібридної лінії 13В, три експерименти з протопластами гібридної лінії 28В та десять експериментів з гібридною лінією 25В. В результаті було відібрано 48 протоклонів, стійких до антибіотиків (для лінії 13В — 29 протоклонів, для 25В — 17 і для 28В — 2), які росли на середовищі з 800 мг/л спектиноміцину і 500 мг/л стрептоміцину.

За допомогою ПЛР аналізу виявили присутність гена *aadA* (рис. 2, *a*) для двох протоклонів гібридної лінії 13В. Ампліфікація фрагмента очікуваного розміру в наступному ПЛР аналізі підтвердила локалізацію трансгена в пластидній ДНК (рис. 2, *в*). Трансформовані клітини були гетеропластомні, тобто поряд з копіями трансформованого пластоми мали пластом дикого типу (рис. 2, *б*). Якби трансформовані клітини мали виключно трансформований пластом, тобто були гомопластомні, то розмір ампліфікованого фрагмента був би більший за розмір вбудованої конструкції (приблизно 1400 п.н.). Фрагмент дикого типу переважно ампліфікується, бо він набагато менший за розміром. На жаль, трансформовані калюси мали жовте забарвлення і не зеленіли навіть при відсутності селективного тиску. Регенерацію знебарвлених пагонів спостерігали на регенераційному середовищі без антибіотиків або з додаванням спектиноміцину і стрептоміцину (по 100 мг/л).

Отримання транспластомних клітинних ліній ріпака. В експериментах по біолістичній трансформації використовували калюс ріпака сорту Westar. Калюс отримували *in vitro* із стерильних гіпокотілей та сім'ядолей ріпака на середовищі SH30 [21] і кожні 3—4 тиж переносили на свіже середовище. Регенерацію пагонів із калюсу спостерігали через 3—4 тиж після перенесення на середовище R1.

Для трансформації використовували вектор рСВ040. Було обстріляно 21 зразок сім'ядольних калюсів та 24 зразка гіпокотільних калюсів. В результаті проведених експериментів отримано 27 сім'ядольних та 11 гіпокотільних калюсних ліній, стійких до антибіотиків спектиноміцину та стрептоміцину. Стійкі калюси мали блідо-зелений або жовтий колір. У контролі, на селективному середовищі, калюси припиняли ріст, темніли і гинули.

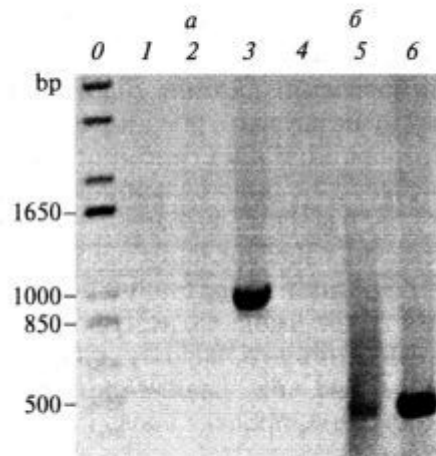
Аналіз отриманого стійкого калюсу за допомогою ПЛР виявив присутність гена *aadA* (рис. 3, б) в пластомі ріпака (рис. 3, а) для двох ліній сім'ядольного та однієї лінії гіпокотільного калюсу. Аналіз показав, що калюс був гетеропластомним, оскільки розмір фрагмента, ампліфікованого за допомогою праймерів 3—6, відповідав нетрансформованій плДНК (дані не наведено).

Позеленіння трансформованого калюсу та регенерації з нього пагонів не спостерігали навіть після зняття селективного тиску.

**Обговорення отриманих даних.** Для успішної генетичної трансформації пластид необхідно виконання декількох передумов. По-перше, потрібно мати ефективні протоколи регенерації рослин із протопластів або інших клітин/тканин/органів рослини. По-друге, має бути вектор для пластидної трансформації, який містить нуклеотидні послідовності, гомологічні до ділянок пластоми, і селективний маркерний ген з регуляторними елементами. По-третє, селективний маркер повинен бути ефективним для селекції транспластомних клітин і рослин [2].

В застосованій конструкції для пластидної трансформації рСВ040 послідовності пластидної ДНК були гомологічні до ділянки *trnV-rps7* пластоми ріпака. Цей фрагмент пластоми (*trnV-rps7*), специфічний відповідно до пластоми інших видів, успішно застосовували в конструкціях для пластидної трансформації тютюну [25], *Arabidopsis thaliana* [9], картоплі [5], рису [26], *Lesquerella fendleri* [10] та сої [7]. В межах гомологічних послідовностей конструкція рСВ040 містила ген *aadA* (аміноглікозид-3'-аденілтрансферази), який забезпечує стійкість до спектиноміцину і стрептоміцину. Цей ген виявився чудовим пластомним селективним маркером при селекції транспластомних рослин тютюну [3], але при використанні його для трансформації пластид інших видів, а саме *Arabidopsis thaliana* [9], картоплі [5], томата [6], *Lesquerella fendleri* [10], ефективність трансформації була менша, ніж для тютюну (в 10 разів і більше).

В наших дослідженнях були застосовані обидва найбільш розповсюджених методи отримання транспластомних рослин: обробка протопластів ПЕГ в присутності трансформу-



**Рис. 3.** ПЛР аналіз трансформованого калюсу *B. napus*: а — праймери 4—5, де 4 є специфічним до гена *aadA*, а 5 — специфічний до хлоропластної ДНК, що знаходиться за межами встроювання генетичної конструкції. Ампліфікована послідовність має 999 bp; 1 — контрольна нетрансформована рослина; 2 — трек без ДНК; 3 — трансформований калюс; б — праймери 1—2, специфічні до внутрішньої частини гена *aadA*. Ампліфікована послідовність має 479 bp; 4 — контрольна нетрансформована рослина; 5 — трансформований калюс; 6 — плазмід рСВ040; 0 — маркерна ДНК

ючого вектора і біолістичний метод трансформації. Після використання кожного з них ми отримали лише транспластомні клітинні лінії.

В першій серії експериментів методом ПЕГ-трансформації як рослинний матеріал було взято асиметричні гібриди *B. oleracea* (+ *A. thaliana*), які містили гібридне ядро та пластом *Arabidopsis* [15]. Отримані з гібридних рослин протопласти мають досить високу ефективність висіву і регенераційну здатність, що робить такі гібриди зручним об'єктом в дослідженнях по трансформації пластоми *A. thaliana*. Такий підхід вже був успішно застосований при трансформації пластоми *Scopolia carniolica* і *Physochlaine officinalis* в цибридах тютюну [27].

Шляхом обробки протопластів ПЕГ ми отримали дві стійкі до спектиноміцину/стрептоміцину транспластомні клітинні лінії *B. oleracea* (+ *A. thaliana*) з ефективністю значно нижчою, ніж для тютюну [18]. ПЛР аналіз показав, що отриманий калюс є гетеропластомним. Трансформований калюс мав жовте забарвлення і не зеленів навіть після перенесення

на середовище без антибіотиків. Для транспластомного калюсу спостерігали регенерацію тільки знебарвлених пагонів. Відомо, що при тривалому культивуванні рослинного матеріалу на середовищі зі спектиноміцином відбувається незворотне пошкодження пластидних рибосом і, як наслідок, знебарвлення пластид [28]. Регенерація знебарвлених рослин, відсутність позеленіння на середовищі без антибіотика свідчить про ймовірне незворотне руйнування трансляційного апарату пластид, яке відбулося раніше, ніж накопичення в достатній кількості гена, продукт якого інактивують антибіотики.

Подібні результати було отримано нами з використанням метода біолістичної трансформації регенераційно здатного калюсу ріпака. Серед відібраних стійких до антибіотиків калюсних ліній у трьох з них методом ПЛР аналізу показано присутність гена *aadA* і встановлено, що цей ген знаходиться саме в пластидній ДНК. Але трансформовані калюси були гетеропластомними. Відібрані як жовті або зеленувато-жовті вони не зеленіли навіть після зняття селективного тиску, що свідчить про незворотне пошкодження пластидних рибосом [28]. Отже, якщо для тютюну підвищення концентрації антибіотика сприяє переходу клітин до гомопластидного стану, коли всі копії дикого типу плДНК замінюються на трансформовану в результаті поділу і сегрегації пластид [2], то з клітинами *Brassica* такого не спостерігалось.

У контрольних експериментах нетрансформований калюс ріпака та протоклони гібридів капусти з пластомом арабідопсиса активно росли на середовищі з антибіотиком у високих концентраціях (400 мг/л) і тільки підвищення концентрації антибіотика до 500–600 мг/л зупиняло ріст клітин, тобто клітини видів *Brassica* можуть повільно рости на середовищах з високими концентраціями спектиноміцину і є менш чутливими до цього антибіотика, ніж клітини тютюну. Проте раніше було показано, що деякі види рослин, зокрема *Hordeum vulgare* та *A. thaliana*, не чутливі до високих концентрацій спектиноміцину [29]. Тому ймовірно, що ген *aadA*, який є надійним домінантним селективним маркером для отримання транспластомних рослин тютюну, не сприяє сегрегації

пластид з трансформованим пластомом в клітинах *Brassica*, оскільки як трансформовані, так і нетрансформовані клітини можуть рости в присутності антибіотика у високих концентраціях. Аналогічне припущення, що ген *aadA* як селективний маркер не підходить для отримання транспластомних рослин ріпака, коли селекцію проводять на рівні дедиференційованих клітин через їх природну здатність рости на середовищах із високою концентрацією антибіотиків, висловив інший автор [14]. Він використовував таку ж саму конструкцію, але факту трансформації пластома на відміну від нашого дослідження встановлено не було. Ми вважаємо, що отримання нами транспластомних клітин *Brassica* в першу чергу пов'язано з тим, що ми працювали зі значно більшими дозами антибіотиків при селекції транспластомних клонів, ніж у зазначеному дослідженні, а саме з 600–1300 мг/л проти 200 мг/л.

В єдиній роботі, яка опублікована нині по трансформації пластома видів *Brassica*, а саме, хлоропластів ріпака [11], селективним маркерним геном також було взято ген *aadA*. В результаті авторами були отримані гетеропластомні рослини ріпака. На відміну від нашого дослідження селекцію трансформованих ліній вони проводили не через культуру клітин, а через пряму регенерацію зелених пагонів із черешків сім'ядолей на 10 мг/л спектиноміцину. Така концентрація антибіотика не призводила до пригнічення росту або регенерації рослин із експлантів, але викликала знебарвлення рослин-регенерантів. При отриманні транспластомних рослин інших видів родини *Brassicaceae*, а саме *Arabidopsis thaliana* [9] та *Lesquerella fendleri* [10], також було використано селективний маркерний ген *aadA*. Селекцію трансформованих ліній здійснювали на середовищі з 400–500 мг/л спектиноміцину як через стадію росту дедиференційованих клітин, так і шляхом прямої регенерації зелених пагонів із експлантів.

Таким чином, ми вважаємо, що використання селективного гена *aadA* для отримання транспластомних рослин видів *Brassica* є неефективним у випадку, якщо селекція трансформованого рослинного матеріалу ведеться на рівні дедиференційованих клітин. Тому, на



наш погляд, в експериментах по трансформації пластоми видів *Brassica* є доцільним використання або іншого селективного маркерного гена, або методики, яка базується на прямій регенерації рослин з експлантів. Разом з тим нами було отримано транспластомні клітинні лінії *B. oleracea* (+ *A. thaliana*) та *B. napus*, які в незначній кількості копій пластидної ДНК містили ген *aadA*.

**SUMMARY.** Plastid genetic transformation has been performed using both the PEG-treatment of protoplasts of somatic hybrids of *B. oleracea* carrying *A. thaliana* chloroplasts and the particle bombardment of regenerable calluses of *B. napus* sv. Westar. The chloroplast transformation vector pCB040 carried resistance (*aadA*) gene flanked by rapeseed plastid DNA sequences to target its insertion between the *trnV-rps7* fragments. Selection of transplastomic cell lines has been performed according to their ability to grow on the medium supplied with spectinomycin and streptomycin in high concentrations. Antibiotic resistant cell lines have been obtained using the both transformation methods. The presence of the *aadA* gene in the *A. thaliana* and *B. napus* plastomes was confirmed by PCR analysis for two cell lines of *B. oleracea* (+ *A. thaliana*) and three lines of *B. napus*.

**РЕЗЮМЕ.** Генетическую трансформацию пластид *Arabidopsis thaliana* и *Brassica napus* проводили с помощью методов обработки полиэтиленгликолем протопластов соматических гибридов *B. oleracea* с хлоропластами *A. thaliana* и бомбардировки микрокапсулами вольфрама регенерационно активного каллуса *B. napus* сорта Westar. В экспериментах использовали генетическую конструкцию pCB040, которая содержит ген устойчивости к спектиномицину/стрептомицину (*aadA*) в пределах последовательностей, гомологичных *trnV-rps7* области пластома рапса. Селекцию транспластомных каллусных линий проводили по способности расти на среде с высокими концентрациями спектиномицина и стрептомицина. Устойчивые к антибиотикам клеточные линии получили после использования обоих методов трансформации. С помощью метода ПЦР показали присутствие гена *aadA* в пластомах *A. thaliana* и *B. napus* для двух каллусных линий *B. oleracea* (+ *A. thaliana*) и трех линий *B. napus* соответственно.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Кучук Н.В. Генетическая инженерия высших растений. — Киев: Наук. думка, 1997. — 152 с.
2. Bock R. Transgenic plastids in basic research and plant biotechnology // *J. Mol. Biol.* — 2001. — **312**. — P. 425—438.
3. Svab Z., Maliga P. High frequency plastid transformation in tobacco by selection for chimeric *aadA* gene // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1993. — **90**. — P. 913—917.
4. Golds T., Maliga P., Koop H.-U. Stable plastid transformation in PEG-treated protoplasts of *Nicotiana tabacum* // *Biotechnology.* — 1993. — **11**. — P. 95—97.
5. Sidorov V.A., Kasten D., Pang S.-Z., Hajdukiewicz P.T.J., Staub J.M., Nehra N.S. Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker // *Plant J.* — 1999. — **19**, № 2. — P. 209—216.
6. Ruf S., Hermann M., Berger I.J., Carrer H., Bock R. Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit // *Nat. Biotechnol.* — 2001. — **19**, № 9. — P. 870—875.
7. Dufourmantel N., Pelissier B., Garcon F., Peltier G., Ferrulo J.-M., Tissot G. Generation of fertile transplastomic soybean // *Plant Mol. Biol.* — 2004. — **55**. — P. 479—489.
8. Zubko M., Zubko E., Van Zuilen K., Meyer P., Duy A. Stable transformation of petunia plastids // *Transgenic Res.* — 2004. — **13**. — P. 523—530.
9. Sikdar S.R., Serino G., Chaudhuri S., Maliga P. Plastid transformation in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Cell Rep.* — 1998. — **18**. — P. 20—24.
10. Skarjinskaia M., Svab Z., Maliga P. Plastid transformation of *L. fendleri*, an oilseed Brassicaceae // *Transgenic Res.* — 2003. — **12**. — P. 115—122.
11. Hou B.-K., Zhou Y.-H., Wan L.-H., Zhang Z.-L., Shen G.-F., Chen Z.-H., Hu Z.-M. Chloroplast transformation in oilseed rape // *Transgenic Res.* — 2003. — **12**. — P. 111—114.
12. Svab Z., Hajdukiewicz P., Maliga P. Stable transformation of plastids in higher plants // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1990. — **87**. — P. 8526—8530.
13. Sporlein B., Streubel M., Dahlfeld G., Westhoff P., Koop H.U. PEG-mediated plastid transformation — new system for transient gene expression assays in chloroplasts // *Theor. Appl. Genet.* — 1991. — **82**, № 6. — P. 717—722.
14. Dovzhenko A. Towards plastid transformation in rapeseed (*Brassica napus* L.) and sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) // *Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität.* — München, 2001. — 142 p.
15. Нитовская И.А., Шаховский А.М. Получение асимметричных соматических гибридов между *Brassica oleracea* L. и *Arabidopsis thaliana* L. // *Цитология и генетика.* — 1998. — **32**, № 4. — С. 72—81.
16. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture // *Physiol. Plant.* — 1962. — **15**. — P. 473—497.
17. Нитовская И.А., Околот А.Н., Сидоров В.А. Регенерация растений из мезофильных протопластов *Brassica oleracea* var. *capitata* // *Цитология и генетика.* — 1994. — **28**, № 6. — С. 3—6.

18. Koop H., Steinmuller K., Wagner H., Roesler C., Eibl C., Sacher L. Integration of foreign sequences into the tobacco plastome via polyethylene glycol-mediated protoplast transformation // *Planta*. — 1996. — **199**. — P. 193–201.
19. Сидоров В.А., Пивень Н.М., Глеба Ю.Ю., Сытник К.М. Соматическая гибридизация пасленовых. — Киев : Наук. думка, 1985. — 132 с.
20. Morel G., Wetmore R.H. Fern callus tissue culture // *Amer. J. Bot.* — 1951. — **38**. — P. 141–143.
21. Conger B.V., Trigiano G.E., Gray D.J., McDaniel J.K. Direct embryogenesis from mesophyll cell of orchardgrass // *Science*. — 1983. — **221**. — P. 850–851.
22. Finer J.J., Vain P., Jones M.W., McMullen M.D. Development of the particle inflow gun for DNA delivery to plant cell // *Plant Cell Rep.* — 1992. — **11**. — P. 323–328.
23. Murray M.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA // *Nucl. Acids Res.* — 1980. — **8**. — P. 333–345.
24. Svab Z., Maliga P. Mutation proximal to the tRNA binding region of the *Nicotiana* plastid 16S rRNA confers resistance to spectinomycin // *Mol. Gen. Genet.* — 1991. — **228**. — P. 316–319.
25. Zoubenko O.V., Allison L.A., Svab Z., Maliga P. Efficient targeting of foreign genes into the tobacco plastid genome // *Nucl. Acids Res.* — 1994. — **22** **19**. — P. 3819–3824.
26. Khan M.S., Maliga P. Fluorescent antibiotic resistance marker for tracking plastid transformation in higher plants // *Nature Biotechnol.* — 1999. — **17**. — P. 910–915.
27. Сытник 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*) // *Укр. бот. журн.* — 2003. — **60**, № 5. — С. 517–522.
28. Zubko M.K., Day A. Stable albinism induced without mutagenesis: a model for ribosome-free plastid inheritance // *Plant J.* — 1998. — **15**, № 2. — P. 265–271.
29. Kofer W., Eibl C., Steinmuller K., Koop H-U. PEG-mediated plastid transformation in higher plants // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* — 1998. — **34**. — P. 303–309.

Надійшла 14.12.05