

АГРОБАКТЕРИАЛЬНАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ ТРАНСПЛАСТОМНЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА

Б.Р. Кулуев, А.В. Князев, З.Р. Вершинина, Ал.Х. Баймиев, А.В. Чемерис
Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение
ФГБУН Уфимского федерального исследовательского центра РАН,
Уфа, e-mail: kuluev@bk.ru

Многие лекарственные препараты представляют собой вторичные метаболиты растений, извлекаемые из их надземных или подземных частей. При этом некоторые лекарственные растения занесены в Красные книги и/или встречаются на ограниченной территории, что затрудняет либо даже исключает заготовку в массовых количествах ценного лекарственного сырья из них. В этой связи удобной альтернативой служит биотехнологическое производство подобных препаратов с помощью культивирования отдельных органов таких растений в искусственных условиях на специализированных биофабриках или биореакторах. Помимо вторичных метаболитов, с помощью биотехнологии в генетически-модифицированных растениях производится наработка веществ первичного метаболизма, главным образом, рекомбинантных белков. Для этого еще в конце прошлого века были созданы трансгенные растения, в которых нарабатываются животные белки медицинского назначения. На их основе также были получены культуры бородачатых корней (hairy roots), продуцирующие такие препараты. К важным недостаткам трансгенных растений-продуцентов, как и бородачатых корней можно отнести сравнительно низкий уровень содержания целевого белка в растении, которое часто оказывается ниже 1 % от общего количества растворимого белка. Преодолеть эти проблемы частично удается за счет получения транспластомных растений. В отличие от трансгенных растений, в случае с транспластомными растениями трансформации подвергаются хлоропласты, а чужеродные гены внедряются в геном пластид – пластоому. Повышение уровня экспрессии чужеродного белка в случае с транспластомными растениями, в том числе, достигается за счет увеличения дозы трансгена, так как каждый хлоропласт содержит до 100 копий пластома, причем в каждой клетке содержится до 100 хлоропластов.

Первые трансгенные растения были созданы в 1977 году (Ackermann, 1977), примерно в это же время были созданы первые бородачатые корни (Anderson, Moore, 1979). Первые транспластомные растения были получены в 1990 году З. Сваб, П. Хайдукевич и П. Малига (Svab et al., 1990). Спустя 25 лет после этого нами было решено объединить технологии получения транспластомных растений и бородачатых корней. Целью нашей работы было создание транспластомных растений табака, а также агробактериальная трансформация этих растений *Agrobacterium rhizogenes*.

Для создания транспластомных растений табака *Nicotiana tabacum* L. сорта Petit Havana был использован вектор pKMS8 с геном устойчивости к спектиномицину (*aadA*) без целевых генов. Эксперименты по пластной трансформации были проведены методом бомбардировки микрочастицами при помощи прибора PDS-1000/He (Bio-Rad, США) согласно протоколу описанному ранее (Данилова, 2011). В ходе работы были получены три разных линии спектиномицин и стрептомицин-устойчивых растений табака, транспластомность которых была подтверждена методами ПЦР по конечной точке, количественного ПЦР в реальном времени, экспериментами по анализу у проростков расщепления признака устойчивости к спектиномицину, а также анализами эффективности передачи признаков антибиотикоустойчивости через пыльцу. Далее экспланты листьев транспластомных растений табака были использованы для агробактериальной трансформации при помощи штамма 15834 *A. rhizogenes*. Были получены бо-

родатые корни табака, способные к росту на питательной среде со спектиномицином. ПЦР-анализ полученных бородачатых корней показал в них наличие как *rol*-генов А и В, так и гена *aadA*. Планируется проведение определения уровня экспрессии ядерных и пластидных генов в полученных бородачатых корнях табака. Предполагается, что полученные нами бородачатые корни с трансформированными пластидами могут стать перспективной растительной системой для продуцирования рекомбинантных белков.

Литература

Данилова С.А. Получение транспластомных растений табака методом баллистической трансформации // Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений / под ред. Вл.В. Кузнецова, В.В. Кузнецова, Г.А. Романова. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2012. – 487 с.

Ackermann C. Pflanzen aus agrobacterium rhizogenes-tumoren annicotiana tabacum // Plant Science Letters. – 1977. – V. 8. – P. 23–30.

Anderson A.R., Moore L.W. Host specificity in the genus Agrobacterium // Phytopathology. – 1979. – V. 69. – P. 320–323.

Svab Z., Hajdukievich P., Maliga P. Stable transformation of plastids in higher plants // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1990. – V. 87. – P. 8526–8530.