

Мир, 984. – 480 с.

12. Гузенко Е.В., Лемеш В.А., Селезнева Ю.В., Евтушенков А.Н. Создание трансгенных растений льна (*Linum usitatissimum* L.) модифицированным методом *in planta* // IV Всероссийский симпозиум «ТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ: технологии создания, биологические свойства, применение, биобезопасность», Москва, 19-23 ноября 2012 г. / Ин-т физиологии растений РАН. – Москва, 2012. – С. 33.
13. Suparthana P., Shimizu T., Nogawa M., Shioiri H., Nakajima T., Haramoto N., Nozue M., Kojima M. Development of simple and efficient *in planta* transformation method for wheat (*Triticum aestivum* L.) using *Agrobacterium tumefaciens* // J. Biosci. Bioengi. – 2006. – Vol. 102, №3. – P. 162 – 170.
14. Kojima M., Arai Y., Iwase N., Shiratori K., Shioiri H., Nozue M. Development of simple and efficient method for transformation of buckwheat plant (*Fagopyrum esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens* // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2000. – Vol. 64. – P. 845 – 847.
15. Langridge P., R.Brettschneide, P. Lazzeri, H. Lorz. Transformation of cereals via *Agrobacterium* and the pollen pathway: a critical assessment // The Plant J. – 1992. – Vol. 2. – P. 631-638.
16. Zale J.M., S. Agarwal, S. Loar, C.M. Steber. Evidence for stable transformation of wheat by floral dip in *Agrobacterium tumefaciens* // Plant Cell Rep. – 2009. – Vol. 28. – P. 903-913.
17. Curtis I.S., H.G. Nam. Transgenic radish (*Raphanus sativus* L. longipinnatus Bailey) by floral-dip method – plant development and surfactant are important in optimizing transformation efficiency // Transgen. Res. – 2001. – Vol. 10. – P. 363-371.

**LEMESH V.A.¹, GUZENKO E.V.¹, SAKOVICH V.I.¹, NIKOLAICHUK Y.A.²,
EVTUSHENKOV A.N.²**

¹*Institute of Genetics and Cytology National Academy of Science of Belarus
Belarus, 220072, Minsk, Akademicheskaya str. 27; e-mail: e.guzenko@igc.bas-net.by*

²*Belarussian State University
Belarus, Minsk*

THE DEVELOPMENT OF GENETICALLY MODIFIED FLAX PLANTS (*Linum usitatissimum* L.) CARRYING THE BACTERIAL RESISTANCE GENE TO GLYPHOSATE BY *Agrobacterium*- MEDIATED TRANSFORMATION

Aims. Development of transgenic flax plants carrying bacterial specific genes that provide resistance to the herbicide glyphosate by *Agrobacterium*-mediated transformation and the modified method of *in planta*.

Methods. We cloned *aroA* genes from *E.coli* and *D.dadantii* and used site-directed mutagenesis to obtain altered genes with 40-fold lower sensitivity to glyphosate. The resistance gene was inserted into an *Agrobacterium* transformation vector (pBI121 35S-CTP-*aroA*) and used to transform flax. *Agrobacterium*-mediated co-cultivation technique and *in planta* was used to increase the transformation efficiency of flax.

Results. The resulting transgenic flax was shown to contain 35S promoter, *nptII* gene and glyphosate resistance gene. **Conclusions.** The results show that modified method of *in planta* can be used to produce transgenic flax plants. The system is rapid, simple and offers an alternative to *Agrobacterium*-mediated co-cultivation technique.

Key words: *Linum usitatissimum*, *Agrobacterium*-mediated transformation, *in planta*, gene *aroA*.

МАЙСТРЕНКО О.М.^{1,2}, ЛУЧАКІВСЬКА Ю.С.¹

¹*Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України
Україна, 03680, Київ, вул. Акад. Заболотного 148,*

²*Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Україна, 01601, Київ, вул. Володимирська 64, e-mail: mayster37@yandex.ru*

ОТРИМАННЯ ТРАНСГЕННОЇ КУЛЬТУРИ „БОРОДАТИХ” КОРЕНІВ ТОПІНАМБУРУ (*HELIANTHUS TUBEROSUS* L.), ЯКА МІСТИТЬ ГЕН ЛЮДСЬКОГО ІНТЕРФЕРОНУ АЛЬФА-2b

Рекомбінантний лейкоцитарний людський інтерферон альфа-2b використовують в медицині для лікування гепатитів В і С, гострих

респіраторних вірусних захворювань, герпесвірусної інфекції та деяких типів раку завдяки його антивірусній та антипроліферуючій

активності [1]. Розробка методів отримання лейкоцитарного рекомбінантного інтерферону рослинного походження в препаративних кількостях уможливила б застосування в медицині препаратів зі зниженою собівартістю (у порівнянні з використанням інших систем гетерологічної експресії) та вищою безпечністю застосування [2].

Однією з найбільш вдалих з точки зору біотехнології рослинною системою є культура «бородатих» коренів, перевагами використання якої є швидкий ріст, довготривала генетична та синтетична стабільність [3], можливість синтезування тих же речовин, що і в коренях трансгенних рослин [4]. Культуру «бородатих» коренів пропонують використовувати для продукції рекомбінантних фармацевтичних білків [5, 6]. На сьогоднішній день показано можливість отримання моноклональних антитіл IgG₁ (до 1,8% СРБ) [7], анти-ВІЧ ціановіріну-N (до 0,64 мкг/мл середовища) [8], SEAP (secreted

alkaline phosphatase) [9, 10,11] з культури «бородатих» коренів тютюну *Nicotiana tabacum* L.

Топінамбур (*Helianthus tuberosus* L.) є стійкою до негативних біотичних чинників та невибагливою до фізико-хімічних факторів середовища рослиною, яка характеризується швидким приростом біомаси та накопиченням цінних речовин, що робить його перспективною культурою для сільського господарства [12], джерелом сировини для фармацевтичної [13] та харчової промисловості [14] та потенційною системою для гетерологічної експресії генів [12].

Метою даної роботи було отримати культуру „бородатих” коренів топінамбуру (*Helianthus tuberosus* L.), що містить ген людського інтерферону альфа-2b під контролем коренеспецифічного *Mll* промотору цукрового буряку [15] або під контролем конститутивного *35S* промотору ВМЦК.

Матеріали та методи

Рослинний матеріал. Для генетичної трансформації використовували листові експланти та фрагменти стебел асептичних рослин топінамбуру (*Helianthus tuberosus* L.). Рослини культивували на живильному середовищі MS [16] за температури 28°C, 16-годинному фотоперіоді.

Плазмідні векторні конструкції та бактеріальні штами. Плазмідні векторні конструкції pCB124 та pCB161 містили рекомбінантний ген людського інтерферону

альфа-2b (*HuINFa-2b*) злитий з рослинним (*Nicotiana plumbagenifolia* L.) кальретикуліновим апопластним сигналом таргетингу під контролем конститутивного *35S* промотору ВМЦК та коренеспецифічного *Mll* промотору цукрового буряку [17]. Обидві конструкції містили також селективний ген неоміцинфосфотрансферази (*nptII*) під контролем *nos* промотору. (Рис. 1) Для агробактеріальної трансформації застосовували агропіновий штам А4 *Agrobacterium rhizogenes*.

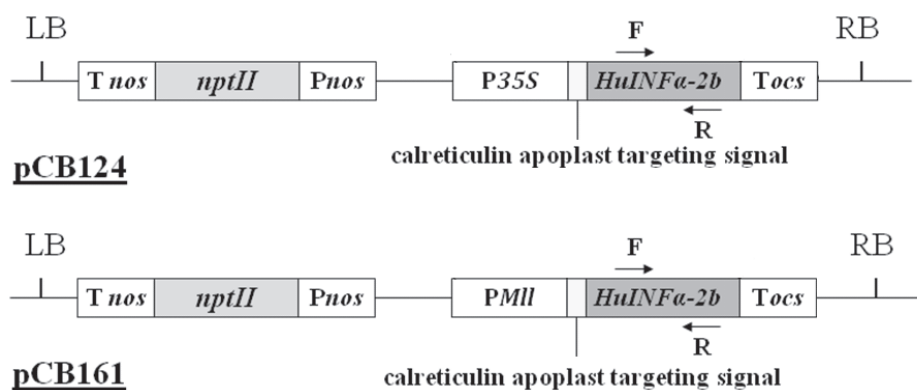


Рис. 1 Схеми векторних конструкцій pCB124 та pCB161, що несуть ген людського інтерферону альфа-2b [17]

Генетична трансформація та селекція. Генетичну трансформацію рослин топінамбуру з використанням агропінового штаму А4 *A. rhizogenes* проводили методом листових дисків. Суспензійну бактеріальну культуру ви-

рошували на орбітальному шейкері (200 об./хв.) за температури 28°C протягом 24 годин у рідкому живильному середовищі Лурія-Бертані (10г/л пептону, 5г/л дріжджового екстракту, 10г/л NaCl, рН=7.2) з додаванням 20 мг/л селек-

тивного антибіотику карбеніциліну. Отриману бактеріальну культуру осаджували центрифугуванням (5000 об./хв., 10 хв.). Осад ресуспендували в рідкому середовищі MS з додаванням 200 мкМ ацетосирингону та культивували на ротаційному шейкері (200 об./хв.) за температури 28°C протягом години. Листкові експланти та фрагменти стебел інкубували у бактеріальній суспензії протягом 20 хв. та надалі піддавали вакуумній інфільтрації. Для трансформації експланти викладали на безгормональне живильне середовище MS без додаванням антибіотиків на одну добу, культивували на розсіяному світлі при кімнатній температурі. Надалі експланти переносили на агаризоване живильне середовище MS з додаванням 500 мг/л антибіотику цефотаксиму для елімінації бактерій і 100мг/л селективного антибіотику канаміцинсульфату та культивували при температурі 24°C в умовах 16-годинного фотоперіоду з періодом субкультивування 2-4 тижні.

Молекулярно-біологічний аналіз. Сумарну рослину ДНК екстрагували згідно Doyle J.L. та Doyle J.J [18]. Присутність трансгенів підтверджували за допомогою дуплексного

Результати та обговорення

Ініціацію Ri-коренетворення після *Agrobacterium rhizogenes*-опосередкованої трансформації листкових та стеблових експлантів асептичних рослин топінамбуру спостерігали через 2-3 тижні культивування на безгормональному живильному середовищі MS з додаванням антибіотиків цефотаксиму та канаміцинсульфату у вказаних концентраціях при 24°C в умовах 16-годинного фотоперіоду. Коренева культура характеризувалася Ri-фенотипом: гормон-незалежним ростом, формуючи надзвичайно розгалужені бічні корені, та відсутністю геотропізму (рис. 2, б). Контрольні нетрансформовані експланти були нездатні до формування культури Ri-коренів на середовищах з додаванням селективного антибіотику канаміцинсульфату у концентрації 100 мг/л. Частоту Ri-коренетворення визначали як відношення кількості точок ініціації коренетворення до загальної кількості інокульованих експлантів, за умови проведення трансформації з використанням плазмідних векторних конструкцій pCB124 та pCB161 вона становила 14,7±8,4% та 25,0±9,0% відповідно. ПЛР-аналіз дозволив виявити присутність агробактеріального *rolB* гену

ПЛР-аналізу з використанням праймерів 5'-ctctgcttgaaggacag-3', 5'-ggagtcctctctcatcag-3' для підтвердження присутності цільового *HuINFa-2b* гену (розмір фрагменту 264 п.н.) та праймерів 5'-atgtcgaaggcagtaagccca-3', 5'-ggagtccttccagcatggagca-3' для ідентифікації присутності *virD1* гену з метою виявлення агробактеріального забруднення (розмір фрагменту 432 п.н.). Ампліфікацію фрагментів генів людського інтерферону *HuINFa-2b* та *virD1* проводили за наступних умов: денатурація 94°C/5 хв; 30 циклів (денатурація 94°C/30с, відпал 60°C/30с, синтез 72°C/35с); заключний синтез 72°C/5хв. [19]. Для підтвердження трансгенної природи отриманої культури „бородатих” коренів ампліфікували фрагмент (780 п.н.) агробактеріального *rolB* гена, реакція проходила за наступних умов: денатурація 94°C/5 хв.; 34 цикли (денатурація 94°C/30 с, відпал 65°C/30 с, синтез 72°C/45 с); заключний синтез 72°C/5 хв. з використанням праймерів 5'-atggatcccaattgctattcctccacga-3', 5'-ttagctcttctcaggttactgcagc-3'. Продукти реакцій фракціонували в 1 % агарозному гелі в трисборатній буферній системі.

для 95–98% аналізованих ліній культури „бородатих” коренів, що підтверджує трансгенну природу отриманої кореневої культури (рис. 2, г).

Крім того, на селективному середовищі (MS (20 г/л сахарози) з додаванням 100 мг/л антибіотику канаміцинсульфату) спостерігали індукцію калусогенезу на листових та стеблових експлантах рослин топінамбуру трансформованих з використанням А4 штаму *A. rhizogenes*, векторних конструкцій pCB124 та pCB161, при чому частота калусотворення становила 13,2±9,1% та 16,7±10,5 відповідно (рис 2а). ПЛР-аналіз дозволив підтвердити присутність цільового гену *HuINFa-2b* для близько 85% досліджуваних зразків калусних культур та культури „бородатих” коренів топінамбуру, а також відсутність агробактеріального забруднення для 62% з них (рис. 2, в).

На отриманих Ri-культурах та трансгенних калусних культурах топінамбуру не спостерігали спонтанної регенерації рослин, навіть незважаючи на відмічену активну регенерацію рослин на культурі нетрансгенних коренів та ініційованих калусних культурах топінамбуру [20].

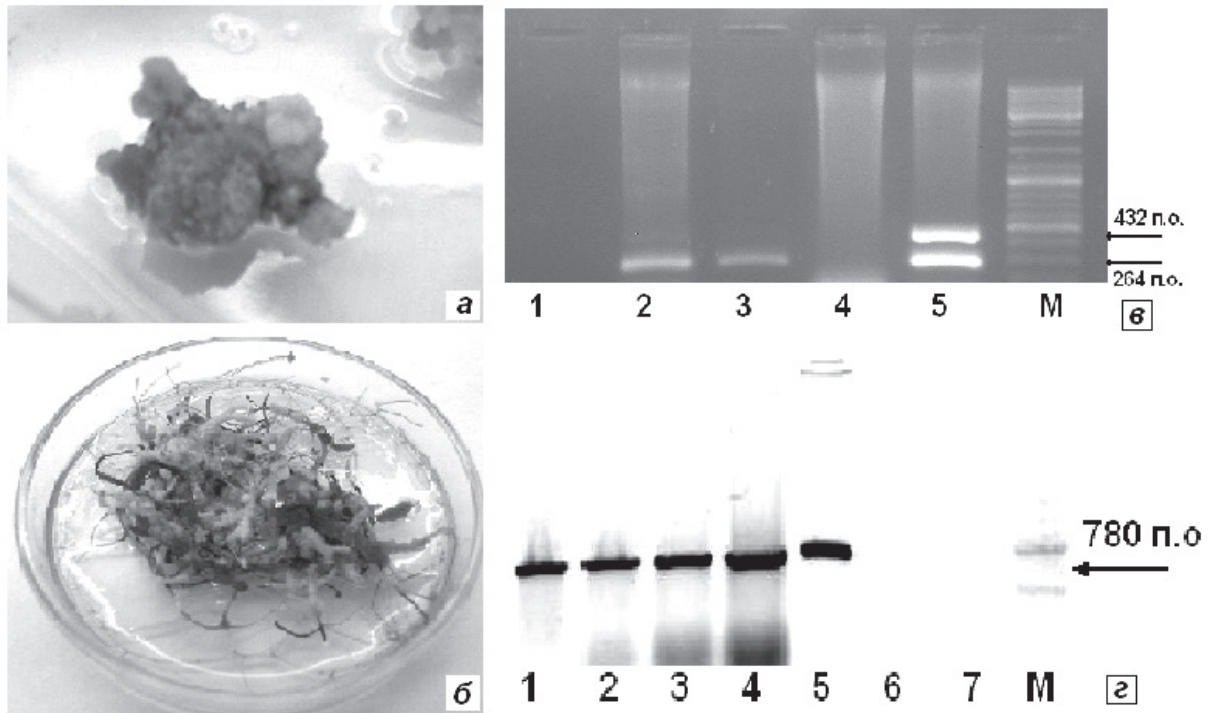


Рис. 2. Калусогенез на стеблових експлантах рослин топінамбуру (а) та культура „бородатих” коренів топінамбуру (б) на живильному середовищі з додаванням селективного антибіотику. ПЛР-аналіз зразків культури „бородатих” коренів топінамбуру: в – дуплекс на присутність *HuINFα-2b* та *virD1* генів (М – ДНК маркер (1 Kb Plus DNA Ladder, Fermentas), 1 – негативний контроль (проба без ДНК) 2,3 - ДНК аналізованих зразків, 4 – негативний контроль (ДНК нетрансформованої рослини), 5– позитивний контроль (сумарна ДНК *A.rhizogenes*, pCB124), г – на присутність *rolB* гену (М – Маркер (1 kb Plus DNA Ladder, Fermentas), 1-4 – ДНК аналізованих зразків культури „бородатих” коренів топінамбуру, 5– позитивний контроль (плазмідна ДНК (A4)), 6 – негативний контроль (ДНК нетрансформованої рослини), 7 – негативний контроль (проба без ДНК)

Висновки

Показано можливість отримання культури «бородатих коренів» та трансгенної калусної культури *H. tuberosus*, що містять ген лейкоци-

тарного людського інтерферону альфа-2b шляхом *A. rhizogenes*-опосередкованої трансформації.

Література

1. Ariyasu T., Tanaka T., Fujioka N. Effects of interferon-alpha subtypes on the Th1/Th2 balance in peripheral blood mononuclear cells from patients with hepatitis virus infection-associated liver disorders // *In Vitro Cell Dev. Biol. Animal.* – 2005. – Vol. 41 – P. 50-56.
2. Desai P. N., Shrivastava N., Padh H. Production of heterologous proteins in plants: Strategies for optimal expression // *Biotech. Adv.* – 2010. – Vol. 28, №4. – P. 427–435.
3. Huang L.-F. Liu Y.-K., Lu C.A. et al. Production of human serum albumin by sugar starvation induced promoter and rice cell culture // *Transgenic. Res.* – 2000. – Vol. 14, №5. – P. 569-581.
4. Sivakumar G. Bioreactor technology: a novel industrial tool for high-tech production of bioactive molecules and biopharmaceutical from plant roots // *J. Biotechnol.* – 2006. – №1. – P. 1419-1427.
5. Choi Y.E., Kim Y.S., Paek K.Y. Types and designs of bioreactors for hairy root culture // *Plant Tissue Culture Engineering.* – 2006. – №6. – P. 161-72.
6. Guillon S., Tremouillaux-Guiller J., Pati P.K. et al. Hairy root research: recent scenario and exciting prospects // *Curr. Opinion in Plant. Biol.* – 2006. – №9. – P. 341–346.
7. Drake P.M.W., Chargelegue D.M., Vine N.D. et al. Rhizosecretion of a monoclonal antibody protein complex from transgenic tobacco roots // *Plant Mol. Biol.* – 2005. – Vol. 52, №1. – P. 233-241.

8. Wongsamuth R., Doran P.M. Production of monoclonal antibodies by tobacco hairy roots // *Biotechnol. Bioeng.* – 2000. – №54. – P. 401-415.
9. Ma J.K., Drake P.M., Chargelegue D. et al. Antibody processing and engineering in plants, and new strategies for vaccine production // *Vaccine.* – 2005. – Vol. 23, №15. – P. 1814-1818.
10. Borisjuk N.V., Borisjuk L.G., Logendra S. et al. Production of recombinant proteins in plant root exudates // *Nat. Biotechnol.* – 1999. – №17. – P. 466-469.
11. Gaume A., Komarnytsky S., Borisjuk N. et al. Rhizosecretion of recombinant proteins from plant hairy roots // *Plant Cell Rep.* – 2009. – Vol. 21, №12. – P. 1188-1193.
12. Kays S.J., Nottingham S.F., *Biology and chemistry of the Jerusalem Artichoke.* – Boca Raton, USA: CRC Press, 2008. – P. 97-116, 160-164.
13. Gibson G.R., Probert H.M., Van Loo J. et al. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics // *Nutr. Res. Rev.* – 2005. – №17. – P. 259-275.
14. Кищенко Е.М. Особенности экспрессии репортерного гена β -глюкуронидазы под контролем 35S и MII промоторов в трансгенных растениях // Фактори експериментальної еволюції організму в: Зб. наук. пр. – 2010. – Т. 9. – С. 261-266.
15. Roberfroid, M. Inulin-Type Fructans: Functional Food Ingredients. In: *CRC Series in Modern Nutrition.* CRC Press, Boca Raton, FL. – P. 2493-2502.
16. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture // *Physiol Plant.* – 1962. – Vol. 15, №3. – P. 473-496.
17. Luchakivskaya Yu., Kishchenko O., Gerasimenko I., Olevinskaya Z., Simonenko Yu., Spivak M., Kuchuk M. High-level expression of human interferon alpha-2b in transgenic carrot (*Daucus carota* L.) plants // *Plant Cell Reports.* – 2010. – Vol. 30, №3. – P. 407-415.
18. Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue // *Focus.* – 1990. – №12. – P.13-15.
19. Gerasymenko I. M., Sakhno L. O., Mazur M. G., Sheludko Y. V. Multiplex PCR Assay for Detection of Human Interferon Alpha-2b Gene in Transgenic Plants // *Cytology and Genetics.* – 2012. – Vol. 46, №4. – P. 197-201.
20. Майстренко О.М., Лучаківська Ю.С., Матвеева Н.А. Накопичення поліфруктанів суспензійними та калусними клітинними культурами, культурою «бородатих» коренів та органами рослин топінамбуру (*Helianthus tuberosus* L.) // Збірник наукових праць ІХ з'їзду УТГіС “Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології” – 2012. – С. 566-570.

MAISTRENKO O.M.^{1,2}, LUCHAKIVSKA YU.S.¹

¹*Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, NASU*

Ukraine, 03680, Kyiv, Acad. Zabolotnoho St.148

²*National Taras Shevchenko University of Kyiv*

Ukraine, 01601, Kyiv, Volodymyska st. 64, e-mail: mayster37@yandex.ru

OBTAINING THE TRANSGENIC HAIRY ROOT CULTURE OF TOPINAMBOUR (*HELIANTHUS TUBEROSUS* L.) CONTAINING HUMAN INTERFERON ALPHA-2B GENE

The aim of the study was to obtain *Helianthus tuberosus* L. hairy root culture containing human interferon alpha gene driven by constitutive 35S CaMV and root specific *MII* sugar beet promoters by means of *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation. **Results.** We observed the high level callus and *Ri*-roots induction on *A. rhizogenes*-inoculated leaf and stem explants on the selective medium in 2-3 week cultivation. PCR proved the presence of human interferon alpha gene for the studied samples as well as it showed the obtained hairy root culture of the transgenic origin. **Conclusions.** Thus we manage to obtain the transgenic *H. tuberosus* hairy root culture containing human interferon alpha gene.

Key words: *Helianthus tuberosus* L., human interferon alpha-2b, *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation, tissue-specific promoters, hairy root and transgenic callus culture.