

Н.А. МАТВЕЕВА, А.М. ШАХОВСКИЙ, Н.В. КУЧУК
Институт клеточной биологии и генетической инженерии
НАН Украины, Киев
E-mail: joyna56@gmail.com

ОСОБЕННОСТИ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ САЛАТА С ГЕНОМ ИНТЕРФЕРОНА- $\alpha 2b$, ПОЛУЧЕННЫХ ПУТЕМ *AGROBACTERIUM* *RHIZOGENES*-ОПОСРЕДОВАННОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ



С помощью метода *Agrobacterium rhizogenes*-опосредованной трансформации получена культура «бородатых» корней салата *Lactuca sativa*, из которой регенерированы трансгенные растения с геном интерферона- $\alpha 2b$ человека. По результатам ПЦР и ОТ-ПЦР анализов полученные растения имели транскрибируемый целевой ген *ifn- $\alpha 2b$* и отличались от растений дикого типа удлиненными междоузлиями, ранним формированием цветоноса и пурпурной окраской листьев при культивировании в условиях искусственного освещения.

© Н.А. МАТВЕЕВА, А.М. ШАХОВСКИЙ,
Н.В. КУЧУК, 2012

Введение. На протяжении последних 20–30 лет активно развивается один из методов биотехнологических исследований – генетическая инженерия, при использовании которой получены новые растения с модифицированным геномом. Разработаны способы введения в растительные клетки новых генов, в том числе таких, которые определяют устойчивость растений к патогенам, гербицидам и др. Исторически первым методом генетической трансформации является так называемая агробактериальная трансформация. Идея этого метода состоит в использовании природной способности почвенных бактерий *Agrobacterium tumefaciens* и *A. rhizogenes* семейства *Rhizobiaceae* инфицировать двудольные растения. Агробактерии способны переносить в растение не только собственную Т-ДНК, но и Т-ДНК бинарных векторов с селективными и целевыми генами [1, 2], что позволяет использовать их для создания трансгенных растений.

Салат, широко распространенная зеленая культура семейства *Asteraceae*, является одним из объектов генетической инженерии, что связано прежде всего с достаточно простым культивированием этого растения *in vitro* и разработкой эффективных методик регенерации [3]. Трансгенные растения салата разных сортов получены с использованием *A. tumefaciens* [4–8], а также с помощью электропорации [9], ПЭГ-индуцированной трансформации [10] и бомбардировки [11].

Если целью первых экспериментов было изучение принципиальной возможности трансформирования генома салата, то в дальнейшем были получены трансгенные растения с целевыми генами, наличие которых в растениях представляет практический интерес. Так, созданы растения с генами субъединицы В холерного токсина [12, 13], антигена HBsAg вируса гепатита В [14, 15] и туберкулезных антигенов [16]. С помощью *A. tumefaciens* также получены трансгенные растения салата с генами, которые повышают устойчивость растений к гербицидам [17, 18], биогенным [19] и абиогенным [20] стрессовым факторам. Кроме того, *A. rhizogenes* может служить средством для перенесения чужеродных генов в растительный геном, в том числе в растения салата [21, 22]. Растения салата имеют целевые гены, представляющие практический интерес,

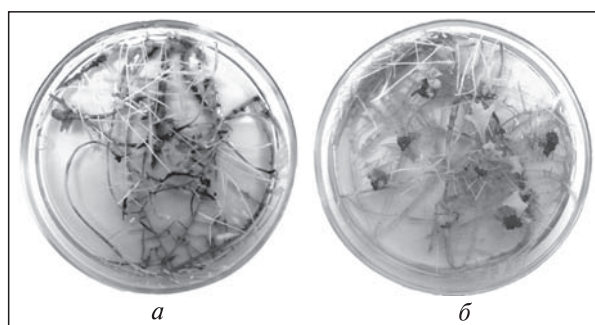


Рис. 1. Образование «бородатых» корней (а) и регенерация растений (б) после трансформации салата с помощью *A. rhizogenes* A4

например ген интерферона человека, и могут быть использованы в качестве «съедобных» вакцин – растений, продуцирующих специфические белки, которые применяются для профилактики и лечения заболеваний [23–25]. Показана возможность экспрессии гена интерферона в растениях картофеля [26], риса [27], салата [28] после трансформации с помощью *A. tumefaciens*. В то же время до сих пор публикации, касающиеся использования *A. rhizogenes* для получения растений салата с такими целевыми генами, отсутствуют.

Целью настоящей работы было использование *A. rhizogenes* для получения культуры «бородатых» корней *L. sativa* сорта Рубиновое кружево и регенерация из них трансгенных растений салата с геном интерферона- $\alpha 2b$ (*ifn- $\alpha 2b$*) человека, которые могут стать «съедобными» вакцинами, а также изучение особенностей полученных трансгенных растений.

Материалы и методы. Исходным материалом служили семена салата сорта Рубиновое кружево, которые стерилизовали по методике, описанной нами ранее [16]. Семена проращивали в чашках Петри на агаризованной среде МС [29]. Для трансформации использовали семядоли 7–10-дневных проростков. Трансформацию осуществляли по методике [16] с помощью *A. rhizogenes* A4 с вектором pSV161, который содержал целевой ген *ifn- $\alpha 2b$* под контролем корнеспецифического промотора *MII* сахарной свеклы и селективный ген неомизинфосфотрансферазы II (*nptII*) под контролем промотора гена нопалинсинтетазы [30]. Наличие гена *nptII* давало возможность

осуществлять отбор трансгенных корней и растений по признаку устойчивости к канамицину. После трансформации для получения «бородатых» корней экспланты культивировали на агаризованной среде МС с 25 мг/л канамицина и 600 мг/л цефотаксима. Для регенерации растений корни переносили на ту же среду с добавлением 5 мг/л кинетина и 0,5 мг/л α -нафтилуксусной кислоты (НУК).

Растительную ДНК и РНК выделяли по методикам [31, 32]. Присутствие и транскрипцию перенесенных генов определяли с помощью ПЦР и ОТ-ПЦР на амплификаторе Mastercycler personal 5332 («Eppendorf», Германия). Для проведения ПЦР реакционную смесь готовили из однократного ПЦР-буфера с сульфатом аммония, 0,25 мкМ праймеров, 200 мкМ дезоксинуклеозидтрифосфатов, 0,5 ед. Taq-полимеразы, 10–50 нг ДНК (общий объем реакционной смеси 20 мкл). Для амплификации использовали праймеры, специфичные к генам *rolB*, *nptII* и *ifn- $\alpha 2b$* (соответственно 5'-5'atgcatcccaaatgctattcctccacga-3' и 5'-ttagctcttcttcagggttactgcagc-3', 780 п.н., 5'-cctgaatgaactccaggacgaggca-3' и 5'-gctctagatccagagtcgctcagaag-3', 622 п.н., 5'-ttgatgctcctggcacag-3' и 5'-ttctgctctgacaacctc-3', 396 п.н.). Условия амплификации: первичная денатурация – 94 °С, мин, 30 циклов амплификации (94 °С, 30 с – 62 °С, 30 с – 72 °С, 30 с. для генов *nptII* и *ifn- $\alpha 2b$* и 94 °С, 30 с – 56 °С, 30 с – 72 °С, 45 с для *rolB*), заключительный синтез – 72 °С, 3 мин.

Препараты суммарной РНК, предварительно обработанные ДНКазой I, свободной от РНКазы, использовали в качестве матрицы

Влияние состава среды на рост трансгенных корней салата и регенерацию растений

№ среды	Концентрация регуляторов роста, мг/л		Рост		
	Кинетин	НУК	корней	калусной ткани	побегов
1	0,5	0,05	+	–	–
2	0,5	5	–	+	–
3	5	0,5	–	+	+
4	0	0	+	–	–

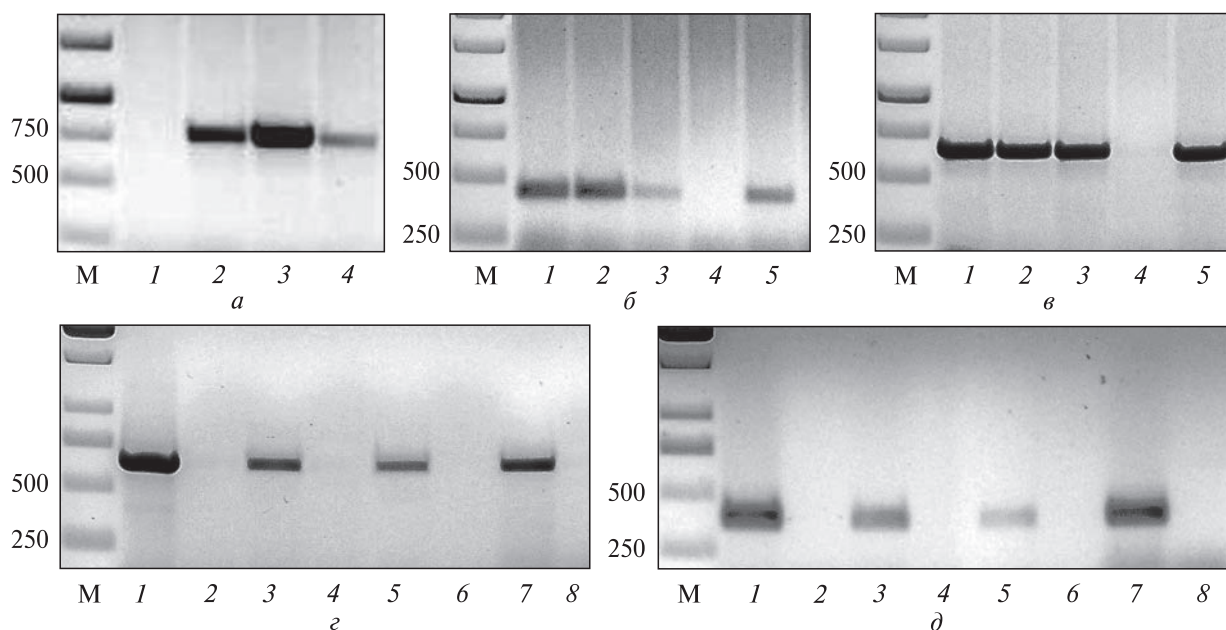


Рис. 2. ПЦР-анализ totalной ДНК (а–в) и ОТ-ПЦР (z, д): *rolB* (а), *ifn-α2b* (б, д) и *nptII* (в, z); а: 1 – ДНК контрольного растения; 2–4 – ДНК трансгенных растений; б, в: 1–3 – ДНК трансгенных растений; 4 – ДНК контрольного растения; 5 – плазмидная ДНК; z, д: 1–8 – ДНК трансгенных растений; нечетные треки – синтез обратных транскриптов в присутствии ревертазы, четные – ОТ-ПЦР без ревертазы; М – маркер (размер фрагментов, п.н.)

для синтеза первой цепи кДНК. Синтез осуществляли с помощью набора реактивов «Fermentas» (Литва) по инструкции фирмы-изготовителя. Для каждой пробы РНК проводили две реакции – в присутствии и в отсутствие обратной транскриптазы.

Результаты исследований и их обсуждение. Рост корней на безгормональной среде с селективным антибиотиком начинался уже через 10–14 сут. Частота образования корней составляла 43,4 %. На листьях контрольных растений при тех же условиях культивирования корни не образовывались. Полученные корни отделяли от эксплантов и переносили на среду того же состава. Они имели характерные для «бородатых» корней признаки (рис. 1, а): гормонезависимый рост, отсутствие позитивного геотропизма, сильное ветвление, что обусловлено переносом в геном T_L фрагмента Т-ДНК рRi-плазмиды. ПЦР-анализ полученных линий показал присутствие как селективного, так и целевого генов (данные не приведены).

Поскольку при культивировании трансгенных корней на среде без регуляторов роста

регенерация побегов не наблюдалась, для получения трансформированных растений к среде МС добавляли кинетин и НУК в концентрациях соответственно 0,5–5,0 и 0,05–5 мг/л (таблица). Низкие концентрации кинетина и НУК не приводили к росту каллуса или побегов (среда № 1), повышение концентрации НУК до 5 мг/л тормозило рост корней и инициировало рост каллусной ткани. На питательной среде, содержащей 5 мг/л кинетина и 0,5 мг/л НУК (среда № 3), при отсутствии роста корней начинался рост каллуса, а через 20–30 сут – регенерация побегов (рис. 1, б). Образовавшиеся растения пересаживали в чашки Петри на безгормональную среду МС с антибиотиками для укоренения.

Для подтверждения присутствия генов *rolB*, неомоцинофосфотрансферазы II и интерферона в полученных растениях использовали метод ПЦР. Проанализировано 8 линий корней, в которых детектировали ген *rolB* (рис. 2, а), а также целевой (рис. 2, б) и селективный (рис. 2, в) гены. Анализ ОТ-ПЦР показал, что во всех линиях обнаружена транскрипция как селективного (рис. 2, z), так и целевого (рис. 2, д) генов.

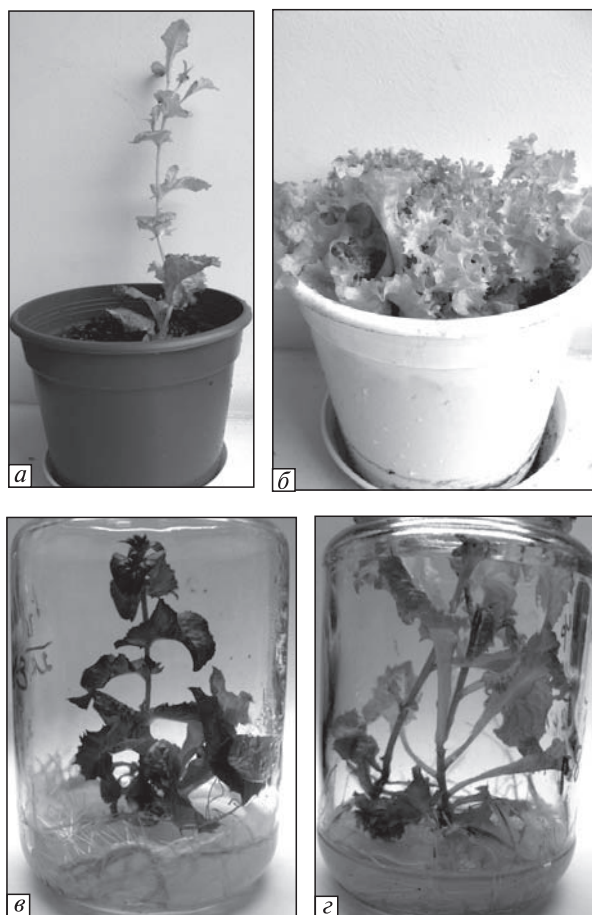


Рис. 3. Особенности растений салата, полученных после трансформации с помощью *A. rhizogenes*: а – трансгенное растение, формирование цветоноса; б – контрольное растение, розеточная форма; в, з – два типа окраски листьев трансгенных растений

Растения, получаемые после трансформации *A. rhizogenes*, как правило, имеют специфический фенотип. У них могут быть сморщенные листья, укороченные междоузлия, разветвленные стебли, нарушено апикальное доминирование, сильно развитая плагиотропная корневая система. Однако могут быть получены и растения с небольшими нарушениями морфологии либо вообще без них [33–36], причем выраженность Ri-фенотипа трансгенных растений определяется экспрессией *rol*-генов; «молчание» этих генов приводит к образованию растений с фенотипом дикого типа.

Все проанализированные линии салата имели транскрибируемый ген *rolB* (рис. 2, а, з),

однако их фенотип не имел особенностей, характерных для *A. rhizogenes*-трансформированных растений. Полученные нами трансгенные растения уже на начальном этапе регенерации при одинаковых условиях культивирования (состав среды, температура, освещение) отличались как от контрольных, так и от растений того же сорта, трансформированных нами ранее с помощью *A. tumefaciens* [16]. Для них характерным было быстрое вытягивание стебля в высоту, удлинение междоузлий и раннее формирование цветоноса (рис. 3, а), в то время как контрольные и ранее полученные *A. tumefaciens*-трансформированные растения [16] имели розеточную форму (рис. 3, б). Аналогичный измененный фенотип мы ранее наблюдали у растений цикория, трансформированных *A. tumefaciens* с вектором pCB124 (ген интерферона- $\alpha 2b$ человека) [37].

Еще одна особенность части регенерированных растений салата заключалась в специфической окраске листьев. В природных условиях при естественном солнечном освещении листья растений этого сорта имеют пурпурную окраску, что и дало название сорту – Рубиновое кружево. При культивировании в термальных комнатах или теплице (искусственное освещение) они были зелеными (рис. 3, б, з). Окраска листьев некоторых *A. rhizogenes*-трансформированных линий при культивировании *in vitro* напоминала окраску листьев в естественных условиях (рис. 3, в).

Обнаруженные особенности, в частности раннее формирование цветоноса у полученных трансгенных растений, представляют интерес, а для выявления причин требуются дополнительные исследования.

Таким образом, бактерии *A. rhizogenes* с вектором, несущим ген интерферона человека, могут быть эффективно использованы в качестве инструмента для трансформации растений салата. Частота трансформации растений сорта Рубиновое кружево составляла 43 %. Трансформация привела к изменению фенотипа растений, регенерированных из корней; они отличались от растений дикого типа удлиненными междоузлиями, ранним формированием цветоноса, а некоторые линии имели пурпурную окраску листьев при культивиро-

вании в условиях искусственного освещения, что, вероятно, является следствием генетической трансформации. *A. rhizogenes* может быть использована для перенесения в растительный геном генов, представляющих практический интерес, поскольку трансгенные корни и регенерированные из них растения салата по результатам ПЦР и ОТ-ПЦР имели целевой ген интерферона, а полученные растения, имеющие ген *ifn- α 2b*, после дополнительных анализов на биологическую активность интерферона «растительного» происхождения могут быть «съедобными» вакцинами.

N.A. Matvieieva, A.M. Shahovsky, M.V. Kuchuk

FEATURES OF LETTUCE TRANSGENIC PLANTS WITH *ifn- α 2b* GENE REGENERATED AFTER *AGROBACTERIUM RHIZOGENES*-MEDIATED TRANSFORMATION

«Hairy» roots of lettuce *Lactuca sativa* and regenerated plants with interferon- α 2b gene had been obtained via *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation. According to the results of PCR and rt-PCR analyses the studied plants had *ifn- α 2b* gene. The regenerated plants differed from the plants of wild type by elongated internodes, early flower-bearing stem formation and purple coloration of leaves in artificial illumination conditions.

Н.А. Матвеева, А.М. Шаховський, М.В. Кучук

ОСОБЛИВОСТІ ТРАНСГЕННИХ РОСЛИН САЛАТУ З ГЕНОМ ІНТЕРФЕРОНУ- α 2b, ОТРИМАНИХ ШЛЯХОМ *AGROBACTERIUM RHIZOGENES*-ОПОСЕРЕДКОВАНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ

За допомогою *Agrobacterium rhizogenes*-опосередкованої трансформації отримано культуру «бородатих» коренів салату *Lactuca sativa*, з яких регенеровано трансгенні рослини із геном інтерферону- α 2b людини. За результатами ПЛР та зТ-ПЛР аналізів отримані рослини мали цільовий ген *ifn- α 2b*, що транскрибувався і відрізнялися від рослин дикого типу подовженими міжвузлями, раннім формуванням квітконосу та пурпурним забарвленням листків при культивуванні в умовах штучного освітлення.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Matzke A.J.M., Chilton M.D.* Site-specific insertion of genes into T-DNA of the *Agrobacterium tumor-inducing plasmid: an approach to genetic engineering of higher plant cells // J. Mol. and Appl. Genet.* – 1981. – **1**, № 1. – P. 39–49.

2. *Barton K.A., Binns A.N., Matzke A.J., Chilton M.D.* Regeneration of intact tobacco plants containing full length copies of genetically engineered T-DNA, and transmission of T-DNA to R1 progeny // *Cell.* – 1983. – **32**, № 4. – P. 1033–1043.
3. *Michelmore R.W., Eash J.A.* Tissue culture of lettuce // *Handbook of plant cell culture. Vol. 4 /Eds D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Amirato.* – London: Collier MacMillan, 1988. – P. 512–551.
4. *Michelmore R.W., Marsh E., Seely S., Landry B.* Transformation of lettuce (*Lactuca sativa*) mediated by *Agrobacterium tumefaciens* // *Plant Cell Rep.* – 1987. – **6**, № 6. – P. 439–442.
5. *Enomoto S., Itoh H., Ohshima M., Ohashi Y.* Induced expression of a chimeric gene construct in transgenic lettuce plants using tobacco pathogenesis-related protein gene promoter region // *Plant Cell Rep.* – 1990. – **9**, № 1. – P. 6–9.
6. *Curtis I.S., Power J.B., Blackhall N.W. et al.* Genotype-independent transformation of lettuce using *Agrobacterium tumefaciens* // *J. Exp. Bot.* – 1994. – **45**, № 279. – P. 1441–1449.
7. *McCabe M.S., Mohapatra U.B., Debnath S.C., Brian Power J., Davey M.R.* Integration, expression and inheritance of two linked T-DNA marker genes in transgenic lettuce // *Mol. Breed.* – 1999. – **5**, № 4. – P. 329–344.
8. *Bríza J., Růžicková N., Niedermeierová H., Dusbábková J., Vlasák J.* Phosphomannose isomerase gene for selection in lettuce (*Lactuca sativa* L.) transformation // *Acta Biochim. Pol.* – 2010. – **57**, № 1. – P. 63–68.
9. *Chupeau M.C., Bellini C., Guerche P. et al.* Transgenic plants of lettuce (*Lactuca sativa*) obtained through electroporation of protoplasts // *Bio/Technol.* – 1989. – **7**, № 1. – P. 503–508.
10. *Lelivelt C.L.C., McCabe M.S., Newell C.A. et al.* Stable plastid transformation in lettuce (*Lactuca sativa* L.) // *Plant Mol. Biol.* – 2005. – **58**, № 6. – P. 763–774.
11. *Kamamoto H., Yamashita A., Asao H. et al.* Efficient and stable transformation of *Lactuca sativa* L. cv. Cisco (lettuce) plastids // *Transgen. Res.* – 2006. – **15**, № 2. – P. 205–217.
12. *Kim Young-Sook, Kim Bang-Geul, Kim Tae-Geum, Kang Tae-Jin, Yang Moon-Sik.* Expression of a cholera toxin B subunit in transgenic lettuce (*Lactuca sativa* L.) using *Agrobacterium*-mediated transformation system // *Plant Cell, Tiss. and Organ Culture.* – 2006. – **87**, № 2. – P. 203–210.
13. *Huy N.X., Yang M.S., Kim T.G.* Expression of a cholera toxin b subunit-neutralizing epitope of the porcine epidemic diarrhea virus fusion gene in transgenic lettuce (*Lactuca sativa* L.) // *Mol. Biotechnol.* – 2010. – DOI: 10.1007/s12033-010-9359-1.

14. Marcondes J., Hansen E. Transgenic lettuce seedlings carrying hepatitis B virus antigen HBsAg // Braz. J. Infect. Dis. — 2008. — **12**, № 6. — P. 469–471.
15. Kapusta J., Modelska A., Pniewski T., Figlerowicz M., Jankowski K., Lisowa O., Plucienniczak A., Koprowski H., Legocki A.B. Oral immunization of human with transgenic lettuce expressing hepatitis B surface antigen // Adv. Exp. Med. Biol. — 2001. — **495**, № 1. — P. 299–303.
16. Матвеева Н.А., Василенко М.Ю., Шаховский А.М., Кучук Н.В. Агробактериальная трансформация салата *Lactuca sativa* L. конструкциями, несущими гены бактериальных антигенов из *Mycobacterium tuberculosis* // Цитология и генетика. — 2009. — **43**, № 2. — С. 27–32.
17. McCabe M.S., Schepers F., van der Arend A., Mohapatra U., de Laat A.M.M., Power J.B., Davey M.R. Increased stable inheritance of herbicide resistance in transgenic lettuce carrying a petE promoter-bar gene compared with a CaMV 35S-bar gene // Theor. and Appl. Genet. — 1999. — **99**, № 3/4. — P. 587–592.
18. Mohapatra U., McCabe M.S., Power J.B., Schepers F., Van Der Arend A., Davey M.R. Expression of the bar gene confers herbicide resistance in transgenic lettuce // Transgen. Res. — 1999. — **8**, № 1. — P. 33–44.
19. Ahmed M.B., Akhter M.S., Hossain M. et al. An efficient *Agrobacterium*-mediated genetic transformation method of lettuce (*Lactuca sativa* L.) with an aphidicidal gene, *Pta* (*Pinellia ternata* Agglutinin) // Middle-East J. Sci. Res. — 2007. — **2**, № 2. — P. 155–160.
20. Pileggi M., Pereira A.A.M., Silva J.D.S., Pileggi S.A.V., Varma D.P.S. An improved method for transformation of lettuce by *Agrobacterium tumefaciens* with a gene that confers freezing resistance // Braz. Arch. Biol. and Technol. — 2001. — **44**, № 2. — P. 191–196.
21. Qi S., Gomez-Barrrios M.L., Fischer N.H., Hopper E.L., Hjortso M.A. Biosynthetic studies of lactucin derivatives in hairy root cultures of *Lactuca floridana* // Phytochem. — 1995. — **40**, № 6. — P. 1659–1665.
22. Chang-Soon Ahn. Establishment of hairy root lines of several economic plant species by inoculation with *Agrobacterium rhizogenes* // Korean J. Breed. — 1993. — **25**, № 3. — P. 184–190.
23. Streatfield S.J. Mucosal immunization using recombinant plant-based oral vaccines // Methods. — 2006. — **38**, № 2. — P. 150–157.
24. Aziz M. A., Singh S., Anand Kumar P., Bhatnagar R. Expression of protective antigen in transgenic plants: a step towards edible vaccine against anthrax // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 2002. — **299**, № 3. — P. 345–351.
25. Rigano M.M., Dreitz S., Kipnis A.P. et al. Oral immunogenicity of a plant-made, subunit, tuberculosis vaccine // Vaccine. — 2006. — **24**, № 5. — P. 691–695.
26. Ohya K., Matsumura T., Ohashi K., Onuma M., Sugimoto C. Expression of two subtypes of human IFN- α in Transgenic potato plants // J. Interferon & Cytokine Res. — 2001. — **21**, № 8. — P. 595–602.
27. Masumura T., Morita S., Miki Y. et al. Production of biologically active human interferon- α in transgenic rice // Plant Biotechnol. — 2006. — **23**, № 1. — P. 91–97.
28. Jing Li, Min Chen, Xian-Wei Liu et al. Transient expression of an active human interferon-beta in lettuce // Sci. Hort. — 2007. — **112**, № 3. — P. 258–265.
29. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture // Phys. Plant. — 1962. — **15**, № 3. — P. 473–497.
30. Luchakivskaya Yu., Kishchenko O., Gerasymenko 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 Rep. DOI: 10.1007/s00299-010-0942-5.
31. Дрейнер Дж., Скотт П. Выделение нуклеиновых кислот из клеток растений // Генная инженерия растений. — М.: Мир, 1991. — С. 241–245.
32. Logemann J., Schell J., Willmitzer L. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues // Anal. Biochem. — 1987. — **163**, № 1. — P. 16–20.
33. Lee M.H., Yoon E.S., Jeong J.H., Choi Y.E. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Taraxacum platycarpum* and changes of morphological characters // Plant Cell Rep. — 2004. — **22**, № 11. — P. 822–827.
34. Petit A., Stougaard J., Kühle A. et al. Transformation and regeneration of the legume *Lotus corniculatus*: a system for molecular studies for of symbiotic nitrogen fixation // Mol. Gen. Genet. — 1987. — **207**, № 2/3. — P. 245–250.
35. Noda T., Tanaka N., Mano Y. et al. Regeneration of horseradish hairy roots incited by *Agrobacterium rhizogenes* infection // Plant Cell Rep. — 1987. — **6**, № 4. — P. 283–286.
36. Jaziri M., Yoshimatsu K., Homus J., Shimomura K. Traits of transgenic *Atropa belladonna* doubly transformed with different *Agrobacterium rhizogenes* strains // Plant Cell Tiss. Organ. Culture. — 1994. — **38**, № 2/3. — P. 257–262.
37. Матвеева Н.А., Шаховский А.М., Герасименко И.М. in. Перенесения гена биосинтезу интерферону- α 2b в рослини цикорію (*Cichorium intybus* L.) методом агробактеріальної трансформації // Biopolym. Cell. — 2009. — **25**, № 2. — С. 120–125.

Поступила 03.03.11