

KUZOVKOVA A.A.<sup>1</sup>, MAZUR T.V.<sup>1</sup>, AZIZBEKIAN S.G.<sup>2</sup>, RESHETNIKOV V.N.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>SSI «Central Botanical Gardens», NAS of Belarus

Belarus, 220012, Minsk, Surganov str., 2B, e-mail: fioraia@nm.ru

<sup>2</sup>SSI «Institute of Physical Organic Chemistry», NAS of Belarus

Belarus, 220012, Minsk, Surganov str., 13, e-mail: mechanochem@ifoch.bas-net.by

## BIOLOGICAL EFFECTS OF SELENIUM NANOPARTICLES AND SODIUM SELENITE ON *AGASTACHE RUGOSA* CELLULAR CULTURES

**Aims.** Recently search of substances replacing toxic selenites is conducted. The Se nanoparticles and sodium selenite influence on physiological and biochemical parameters of *A. rugosa* callus tissues were investigated.

**Methods.** Accumulation of Se in callus tissues were measured by nuclear and issue spectrometry. Protein content and peroxidase activity were measured by specific spectrometric methods. **Results.** It was found that *A. rugosa* callus tissues possessed the expressed ability to Se accumulation. Sodium selenite was more bioavailable for *A. rugosa* cells than Se nanoparticles, however it was toxic in investigating concentration (10 and 50 mg/l) and caused callus death. Selenium in *A. rugosa* callus tissues stimulated biosynthesis of protein and modified peroxidase activity. **Conclusions.** Only Se nanoparticles as nontoxic neither for animals, nor for plants apply for a role of the dietary supplement component.

**Key words:** *Agastache rugosa* (Fisch. & C.A.Mey.) Kuntze, callus tissues, selenium nanoparticles, sodium selenite.

ЛЕМЕШ В.А.<sup>1</sup>, ГУЗЕНКО Е.В.<sup>1</sup>, САКОВИЧ В.И.<sup>1</sup>, НИКОЛАЙЧИК Е.А.<sup>2</sup>, ЕВТУШЕНКОВ А.Н.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Государственное научное учреждение «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»

Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27; e-mail: e.guzenko@igc.bas-net.by

<sup>2</sup>Белорусский государственный университет

Минск, Беларусь

## СОЗДАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ РАСТЕНИЙ ЛЬНА (*LINUM USITATISSIMUM* L.), НЕСУЩИХ БАКТЕРИАЛЬНЫЙ ГЕН УСТОЙЧИВОСТИ К ГЛИФОСАТУ, МЕТОДАМИ АГРОБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ

Снижение засоренности посевов льна не может быть успешно решено без применения гербицидов. В республике Беларусь производится и используется для обработки посевов льна глифосатсодержащий гербицид «Белфосат». Данный препарат создан на основе системного гербицида сплошного действия – N-фосфометилглицина ( $C_3H_8NO_5P$ ), эффективного против более 300 видов однолетних и многолетних однодольных и двудольных растений. Однако многократное опрыскивание растворами гербицидов негативно влияет на состояние посевов льна, а также приводит к накоплению остаточных количеств токсических веществ в семенах. Обеспечить эффективную и экономически выгодную защиту данной сельскохозяйственной культуры возможно с помощью технологий получения генетически модифицированных (ГМ) растений. Встраивание в геном организма хозяина генетических конструкций имеет целью получить новый признак, недостижимый для данного организма путем традиционной селекции.

К настоящему времени клонированы гены, кодирующие нечувствительные к действию гербицидов ферменты-мишени, что дало возможность получить трансгенные растения устойчивые к глифосату [1, 2, 3, 4], хлорсульфурновым и имидазолиновым гербицидам [5, 6]. Изолированы также гены, кодирующие ферменты деградации некоторых гербицидов, что способствовало созданию линий с устойчивостью к фосфинотрицину [7], 2,4-D (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота) [8], далапону [9].

Несмотря на то, что лен был в числе первых растений – объектов генной инженерии, в мире не существует коммерческих ГМ линий льна. Возможно, это связано с относительно слабой генетической изученностью льна, с ограниченностью информации о закономерностях органогенеза данной культуры, анатомическими и физиологическими особенностями растений-регенерантов, а также низкой эффективностью применяемых методов трансформации и вводимых генетических конструкций.

Целью работы являлось создание транс-

генных растений льна, несущих специфические гены бактериального происхождения, которые обеспечивают устойчивость к гербициду глифосату, методом агробактериальной трансформации и модифицированным методом *in planta*.

В работе использованы бактериальные штаммы и плазмиды, основные характеристики которых представлены в таблице 1.

Культивирование микроорганизмов осу-

ществлялось на бактериальных питательных средах при температуре 37°C (*E. coli*) и 28°C (*D. dadantii*), для определения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) глифосата использовалась глюкозо-солевая среда с добавлением 0,5 ммоль/л ИПТГ (изопропил-β-D-тиогалактозид).

Коммерческие препараты антибиотиков использовались в необходимых концентрациях.

Таблица 1. Штаммы и плазмиды

Штаммы/ плазмиды	Генотип	Источник
Штаммы		
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA 4404	(Ach5 pTiAch5) Sm/Sp <sup>R</sup>	коллекция кафедры молекулярной биологии БГУ
<i>Escherichia coli</i> JM109	<i>endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17</i> (rk-, mk+), <i>relA1, supE44, λ<sup>-</sup>, Δ(lac-proAB)</i> , [F', <i>traD36, proAB, lacI<sup>f</sup>ΔM15</i> ]	Promega
<i>Escherichia coli</i> DH5a	F'φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (rk <sup>-</sup> , mk <sup>-</sup> ) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1λ<sup>-</sup></i>	коллекция кафедры молекулярной биологии БГУ
<i>Escherichia coli</i> ES1301 mutS	<i>lacZ53, mutS201::Tn5, thyA36, rha-5, metB1, deoC, IN(rrnD-rrnE)</i>	Promega
<i>Dickeya dadantii</i> ENA49	Природный изолят	коллекция кафедры молекулярной биологии БГУ
Плазмиды		
pBI121	[10]	коллекция кафедры молекулярной биологии
pAlter-1	oriV <sub>ColEI</sub> , Tet <sup>R</sup> , <i>blaM*</i> , <i>lacZ</i> <sub>□</sub>	Promega

Электротрансформация клеток, трансформация с помощью хлорида кальция, выделение плазмидной ДНК из клеток бактерий выполнялись в соответствии со стандартными протоколами [11]. В данной работе были использованы ферменты и буферные системы фирм Fermentas (Литва), и Roche (Германия). Рестрикция и лигирование проводилось согласно протоколам фирм производителей.

Аmplификацию ДНК проводили методом полимеразной цепной реакции.

Для проведения секвенирующих реакций применяли набор реактивов CycleReader<sup>TM</sup> Auto DNA Sequencing Kit (Fermentas) и следовали протоколам производителя. Электрофорез и регистрацию продуктов реакции проводили в 0,5xTBE буфере при 1500 В, 60 мА, 55°C на ДНК-анализаторе ALFexpress II (Amersham Pharmacia Biotech) с соответствующим программным обеспечением. Анализ результатов

полученной нуклеотидной последовательности осуществлен пакетом программ ALFwin 2.1 (Amersham Pharmacia Biotech).

Для сайт-направленного мутагенеза использовали набор реактивов Altered Sites II (Promega) согласно протоколам производителя.

Исходным растительным материалом служили два сорта льна-долгунца Василек (Беларусь), Левит-1 (Беларусь) и сорт льна масличного Alaska (Франция). Протоколы проведения агробактериальной трансформации методом сокультивации и модифицированным методом *in planta* опубликованы нами ранее [4, 12].

Генетически измененные растения, устойчивые к гербицидам, являются одним из перспективных биотехнологических продуктов. Нами проводятся работы по созданию ГМ растений льна с устойчивостью к глифосату, мишенью действия которого является фермент EPSP (5-енолпирувилшикимат-3-фосфат синтаза). При

попадании глифосата в растения происходит блокировка синтеза ароматических соединений, включая аминокислоты, гормоны и витамины, что приводит к гибели растения. Введение в геном растения гена *aroA* снижает афинность EPSP к глифосату.

Анализ геномных последовательностей позволил разработать праймеры для амплификации гена *aroA* бактерий видов *D. dadantii* и *E. coli*. В праймеры были введены последовательности рестрикционных сайтов, необходимых для клонирования, и последовательности рибосом-связывающего сайта для обеспечения эффективной экспрессии в клетках бактерий [10].

В качестве матриц для амплификации гена *aroA* использовали хромосомную ДНК штаммов *D. dadantii* ENA49 и *E. coli* JM109. В результате ПЦР были получены целевые продукты размером около 1,3 т.п.н., что соответствовало прогнозируемому размеру. В качестве вектора для клонирования использовали вектор pAlter-1 (Promega). Амплифицированные фрагменты ДНК и молекулы вектора обрабатывали рестрицирующими эндонуклеазами *Pst*I и *Sac*I, затем фрагменты смешивали, лигировали, и получен-

T42M\_coliCTATCCAGCAGATTTCATTAATACTGTTTT  
P101S\_coliGCCGCCAGCGAACGCATTGCC  
P101S\_dadGCGGCGGCCAGCGAGCGCATCGC

После мутагенеза рекомбинантные плазмиды были введены в клетки штамма *E. coli* JM109 путем электротрансформации. Отбор рекомбинантных клонов производился на минимальной глюкозо-солевой среде, содержащей глифосат в концентрации 2,5 ммоль/л и 0,5 ммоль/л ИПТГ в качестве индуктора. В результате были отобраны плазмиды с тремя типами замен: производные плазмиды pZH475 с заменой P101S и двойной заменой T42M и P101S, а также производные плазмиды pZH476 с одиночной заменой P101S. Первые две мутантные плазмиды получили обозначения соответственно pZH477 (замена P101S) и pZH478 (замены T42M и P101S), а третья – pZH479 (замена P101S). Аналогичным способом был проведен сайт направленный мутагенез, который позволил ввести еще одну мутацию T97I (треонин в положении 97 заменен на изолейцин) в ген *aroA* *D. dadantii* с уже имеющейся одиночной заменой P101S. Плазмида pAlter I, несущая ген *aroA* *D. dadantii* с двумя заменами P101S и T97I была обозначена pZH501. Эффективность мутантных вариантов генов *aroA* была проверена с помощью метода реплик на минимальной глюкозо-солевой среде с концентрациями глифосата 5, 10

ной смесью трансформировали бактерии *E. coli* JM109. Наличие искомой вставки в рекомбинантных плаزمиде было подтверждено рестрикционным анализом, а также функциональным тестом. При культивировании бактерий *E. coli*, несущих плазмиды с клонированными генами *aroA*, в условиях индукции ИПТГ, отмечено формирование изолированных колоний на минимальной среде с 1 ммоль/л глифосата. Сконструированные таким образом плазмиды получили обозначения pZH475 (с геном из *E. coli*) и pZH476 (с геном из *D. dadantii*).

Анализ литературных данных показал, что повысить устойчивость EPSP к глифосату могут одиночные замены пролина на серин в 101 положении (P101S), треонина на метионин в 42 позиции (T42M), а также глицина на аланин в 96 положении (G96A) и треонина на изолейцин в 42 позиции (T97I).

После определения полной нуклеотидной последовательности генов *aroA* бактерий *D. dadantii* ENA49 и *E. coli* JM109 нами проведен мутагенез. Для введения мутаций в клонированные гены использовали олигонуклеотиды:

и 20 ммоль/л. Этот подход позволил нам отобрать варианты генов *aroA*, наличие которых в бактериальных клетках повышает устойчивость их к глифосату (МИК глифосата в 40 раз выше по сравнению с неизмененными генами). Наиболее устойчивым оказался продукт гена *aroA* из *D. dadantii* с двумя заменами P101S и T97I (pZH501).

Для оценки эффективности работы данного мутантного гена в клетках растений нами был сконструирован бинарный вектор с экспрессионной кассетой 35S-СТР-*aroA*. Регенерация предположительно трансформированных побегов льна проходила через стадию формирования каллуса на гипокотильных эксплантах при культивировании на селективной среде. Наибольшее число первичных трансформантов получено у сорта льна масличного Alaska (Франция). Для подтверждения трансгенного статуса проводили комплексный ПЦР-скрининг, позволяющий исключить ложно положительные результаты. При тестировании анализируемых образцов ДНК первичных трансформантов на присутствие бактериальных генов обнаружено, что в четырех образцах присутствует бактериальная ДНК и амплификация последовательности 35S промо-

тора, *nptII* гена и *aroA* гена происходит с экспрессионного вектора, который встроен в плазмиду бактериальной клетки. Истинный трансгенный статус подтвержден у 4 растений, укорененных и высаженных в грунт «Биона» (Белреахим, РБ).

При использовании любых методов агробактериальной трансформации большое значение имеют температура, состав среды для инокуляции, концентрация бактериальных клеток, использование индукторов генов вирулентности, штамм агробактерии, тип векторной конструкции и генотип растения. Все эти ограничения делают проблему регенерации стабильных фертильных трансформантов наиболее острой. Технология трансформации клеток растения *in planta* позволяет преодолеть трудности и упростить дорогостоящую, трудозатратную, требующую специального оборудования стадию регенерации и укоренения трансгенных растений. Мы использовали наиболее эффективные (до 70%) модификации метода *in planta* для создания трансгенных растений льна [13, 14]. Стерильной иглой для инъекций накалывали гипокотиль или плюмулу ростка. Место укола обрабатывали агробактериальной суспензией. Инокулированные проростки высаживали в грунт. Эффективность трансформации по данным комплексного ПЦР-скрининга (амплификация последовательности фрагментов ДНК почвенной бактерии, целевого гена, 35S промотора и гена *nptII*) предположительно транс-

генных растений льна T0 составила 25%. Однако не следует исключать вероятность контаминации растительных тканей поколения T0 агробактериями и получение ложных положительных результатов ПЦР-анализа. По данным некоторых авторов передача T-ДНК в эндофитную микрофлору растения во время трансформации *in planta* и выращивание в почве без селективного давления может стать причиной получения ложных положительных результатов гибридизации по Саузерену в поколении T0 [15]. Следовательно, для корректной оценки эффективности данного метода необходимо получить и проанализировать семенное поколение. Наследование T-ДНК в поколениях T1 и T2 изучалось многими исследователями, использующими методы трансформации *in planta*, и в большинстве случаев показано менделевское наследование вставки [16, 17].

В результате наших исследований созданы оригинальные векторные конструкции, имеющие экспрессионную кассету 35S-СТР-*aroA*, и проведена агробактериальная трансформация льна методом со-культивации и модифицированным методом *in planta*. Получены первичные трансформанты льна, молекулярно-генетический анализ которых подтвердил трансгенный статус. Предложен модифицированный метод *in planta* для льна, который может стать альтернативой широко применяемым методам трансформации.

*Работа выполнена при поддержке БРФФИ.*

### Литература

1. Monsanto Company History / Monsanto Web Site [Electronic resource] – Mode of access: monsanto.com.
2. Comai L. Expression in plants of a mutant *aroA* gene from *Salmonella typhimurium* confers tolerance to glyphosate // *Nature*. – 1985. – Vol. 317, №6039. – P. 741–744.
3. Ishida Y. High Efficiency Transformation of Maize (*Zea mays* L.) Mediated by *Agrobacterium tumefaciens* // *Nature Biotechnol.* – 1996. – Vol. 14, №6. – P. 745–750.
4. Гузенко Е.В., Лемеш В.А., Сакович В.И., Орловская О.А., Николайчик Е.А., Присяженко О.К., Евтушенков А.Н., Хотылева Л.В. Агробактериальная трансформация льна-долгунца генетической конструкцией с геном *aroA*, несущим устойчивость к гербициду глифосату // Доклады НАН Беларуси. – 2010. – Т. 54, №6. – С. 68 – 71.
5. Mazur B.J. Isolation and Characterization of Plant Genes Coding for Acetolactate Synthase, the Target Enzyme for two Classes of Herbicides // *Plant Physiol.* – 1987. – Vol. 85, №4. – P. 1110–1117.
6. Li Z. Sulfonylurea Herbicide Resistance Gene from *Arabidopsis thaliana* as a New Selectable Marker for Production of Fertile Transgenic Plants // *Plant Physiol.* – 1992. – Vol. 100, №2. – P. 662–668.
7. De Block M. Engineering Herbicide Resistance in Plants by Expression of a Detoxifying Enzyme // *EMBO J.* – 1987. – Vol. 6, №9. – P. 2513–2518.
8. Bayley C. Engineering 2,4 D Resistance into Cotton // *Theor. Appl. Genet.* – 1992. – Vol. 83, №5. – P. 645–649.
9. Buchaman-Wollaston V. Plant Selectable Marker Gene Based on the Detoxication of the Herbicide Dalapon // *Plant Cell. Rep.* – 1992. – Vol. 11, №12. – P. 627–632
10. Николайчик Е.А., Гуцинская Н.Н., Евтушенков А.Н. Конструирование вариантов бактериального гена *aroA* со сниженной чувствительностью к гербициду глафосату // Труды БГУ. Сб. науч. тр. – 2011. – Т. 6, ч. 1. – С. 174–180.
11. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. – М.:

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.<sup>1</sup>, GUZENKO E.V.<sup>1</sup>, SAKOVICH V.I.<sup>1</sup>, NIKOLAICHUK Y.A.<sup>2</sup>,  
EVTUSHENKOV A.N.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*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*

<sup>2</sup>*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.<sup>1,2</sup>, ЛУЧАКІВСЬКА Ю.С.<sup>1</sup>**

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

<sup>2</sup>*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