

от 9,8% до 73,3%. Максимальная частота морфогенеза отмечалась у селекционного образца №7р.1. Из 3-х изученных типов эксплантов (лист, стебель, меристема) морфогенетическими способностями на испытанных питательных средах обладали только каллусные ткани полученные из меристем.

Литература

1. Калинин Ф. Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф.Л. Калинин, В.В. Сарнацкая, В.Е. Полищук. — К.: Наук. Думка. — 1980. — 488 с.
2. Мельничук М. Д. Биотехнологія рослин. Підручник. / М.Д. Мельничук, Т.В. Новак, В.А. Кунах. — К.: Поліграф Консалтинг, 2003. — 520 с.
3. Спринчану Е. К. Размножение в культуре *in vitro* полыни лимонной путем индукции образования почек тканями первичного экспланта и каллуса / Е. К.Спринчану, Р.Г. Бутенко // Физиология и биохимия культурных растений. — 1991. — Т.23, №3. — С. 295–301.
4. Хорт Т. П. Дикорастущие полыни Крыма в природе и культуре / Т.П. Хорт, И.Е. Логвиненко // Бюллетень Никитского ботанического сада. — 1987. — Вып.62. — С. 68–73.
5. Kumar Pradeep S. Effect of amino acid and growth regulators on indirect organogenesis in *Artemisia vulgaris* L. / S. Pradeep Kumar, B.D. Ranjitha Kumari // Asian Journal of Biotechnology. — 2010. — V.2, N1. — P. 37–45.
6. Zia M. Hormonal regulation for callogenesis and organogenesis of *Artemisia absintium* L. / M. Zia, Riaz-ur-Rehman, M. F. Chaudhary // African Journal of Biotechnology. — 2007. — Vol.6 (16). — P. 1874–1878.

Резюме

Исследована индукция каллусогенеза и морфогенеза в культуре *in vitro* полыни эстрагон (*Artemisia dracunculus* L.). Показана зависимость этих процессов от генотипа, состава питательной среды и типа экспланта.

Досліджено індукцію калусогенезу та морфогенезу в культурі *in vitro* полину естрагон (*Artemisia dracunculus* L.). Показано залежність цих процесів від генотипу, складу живильного середовища та типу експланта.

Callusogenesis and morphogenesis induction of *Artemisia dracunculus* L. *in vitro* were researched. It was showed dependence of these processes from genotype, medium composition and explant type.

КИЩЕНКО Е.М.

Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины,
Украина, 03680, г. Киев, ул. Заболотного, 148, e-mail: iicb@iicb.kiev.ua

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ РЕПОРТЕРНОГО ГЕНА β -ГЛЮКУРОНИДАЗЫ ПОД КОНТРОЛЕМ 35S И MII ПРОМОТОРОВ В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ

В генноинженерной биотехнологии растений актуальной остается проблема обеспечения высокоэффективной экспрессии рекомбинантных генов. В некоторых случаях, конститутивная сверхэкспрессия нежелательна,

т.к. может привести к сайленсингу трансгена либо повлиять на процессы жизнедеятельности, используют тканеспецифические или индуцируемые промоторы. В последнее время множество таких высокоспецифичных промоторов было клонировано и охарактеризовано, среди них корнеспецифический промотор *Mll* [1]. Использование корнеспецифической экспрессии трансгенов представляет интерес для решения различных задач, среди них создание а) растений-биоремедиаторов, б) растений, накапливающих рекомбинантные белки в корнеплодах, в) растений, устойчивых к засухе, засолению, нематодам и насекомым, повреждающим корни.

Целью исследовательской работы было клонировать корнеспецифический промотор *Mll* из сахарной свеклы, получить трансгенные растения табака и моркови, содержащие ген β -глюкуронидазы под контролем *35S* и *Mll* промоторов и проанализировать экспрессию введенного репортерного гена.

Материалы и методы

В качестве источника промотора *Mll* была использована суммарная ДНК растения сахарной свеклы линии Ритма 6/36 (Институт сахарной свеклы УААН, г. Киев, Украина), выделенная СТАВ-методом [2]. Последовательность промотора *Mll* была амплифицирована с помощью ПЦР с использованием пары праймеров 5' gcagaattcGTTTGTTAACTGAACTGAACTGTTA ATT 3' и 5' gcatccatggCTTTTGAAAA TTTTGAAACGCTCAC 3'. Последовательности сайтов узнавания рестриктазами *EcoRI* и *NcoI* подчеркнуты. Для ПЦР использовали программу: денатурация 94 °C/3 мин; 34 цикла (денатурация 94 °C/30 с, отжиг 60 °C/40 с, синтез 72 °C/2 мин); заключительный синтез 72 °C/10 мин. Продукты амплификации фракционировали с помощью электрофореза в 0,7% агарозном геле в трис-ацетатном буфере. Амплифицированный фрагмент ДНК (около 1750 п.н.) был очищен с помощью Silica Bead DNA Gel Extraction Kit ("Fermentas", Литва), а затем клонирован в pGEM®-T Easy Vector (Promega). Для клонирования полученного промежуточного вектора использовали *Escherichia coli* штамм XL-Blue. Все стандартные процедуры молекулярного клонирования выполняли согласно [3]. Клонированная последовательность *Mll* была секвенирована с использованием праймеров, гомологичных последовательности вектора pGEM®-T Easy (праймеры к промоторам SP6 и T7), и праймера Mllfwd2 5' CCTTCCACCA ATCTCAACAAA 3', специфического к последовательности внутренней части промотора *Mll*.

При конструировании вектора для трансформации растений за основу был взят бинарный вектор pICBV16 (Icon Genetics GmbH, г. Халле, ФРГ), содержащий репортерный ген β -глюкуронидазы *gusA* под контролем промотора *35S* вируса мозаики цветной капусты и селективный ген неомицинофотрансферазы II *nptII*. Фрагмент *EcoRI-NcoI* бинарного вектора pICBV16, содержащий промотор *35S*, был замещен последовательностью промотора *Mll*, вырезанного теми же рестриктазами из промежуточного вектора. Результирующий вектор был обозначен как pCB129. Плазмидная ДНК бинарных векторов pICBV16 и pCB129 была перенесена в нопалиновый

штамм *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 и агропиновый штамм *A. rhizogenes* A4.

Для генетической трансформации моркови (*Daucus carota* L. subsp. *sativa*) использовали асептические проростки. Для этого семена моркови сортов Красный Великан и Перфекция поверхностно стерилизовали и проращивали на агаризованной среде MS [4], содержащей 2 мг/л дикамба, при +24 °С в темноте. Ночную агробактериальную культуру осаждали, ресуспендировали питательной средой MS с 0,2 мМ ацетосерингона и инкубировали 2 часа на шейкере (200 об/мин), далее проводили вакуум-инфильтрацию асептических проростков, как описано в [5]. После инфильтрации проростки оставляли на фильтровальной бумаге на 2 суток при рассеянном свете, а затем переносили на питательную среду MS, содержащую 2 мг/л дикамба, 500 мг/л цефотаксима (Сх) и 100 мг/л канамицинсульфата (Км). Первичный каллус, сформировавшийся при +24°С в темноте, переносили на безгормональную среду MS, содержащую 300 мг/л Сх и 100 мг/л Км, и культивировали для дальнейшей регенерации при +24 °С и 16-часовом световом периоде.

В качестве исходного материала для генетической трансформации *Nicotiana tabacum* использовали листовые диски асептических растений сорта Wisconsin, выращиваемых при +24 °С и 16-часовом световом периоде. *A. tumefaciens*-опосредованную трансформацию табака проводили согласно общепринятой методике [6], а трансформированные побеги отбирали на селективной среде MS, содержащей 1 мг/л ВАР, 0,1 мг/л NAA, 500 мг/л Сх и 100 мг/л Км. После трансформации табака с помощью *A. rhizogenes* листовые экспланты переносили на безгормональную среду MS, содержащую 300 мг/л Сх и 100 мг/л Км. Образовавшиеся корни и побеги отсекали и переносили на питательную среду того же состава. Трансгенные растения табака T₀ высаживали в почву в условиях теплицы и получали семена при самоопылении.

ДНК из растительных тканей выделяли СТАВ-методом [2]. Реакцию амплификации ДНК проводили в термоциклере Mastercycler® personal (Eppendorf) с использованием праймеров 1) 5' CCTGAATGAACTCCAGGACGAGGCA 3' и 5' GCTCTAGATCCAGAGTCCCCGCTCAGAAG3', амплифицирующих фрагмент гена *nptII* длиной 649 п.н., 2) 5' TGGGTGGACGATACACCGTGGTGA 3' и 5' GGCCCAATCCAGTCC ATTAATGCG 3', амплифицирующих 423 п.н. гена *gusA*, 3) 5' ATGGATCCCAAATTGСТАТТССТТССАСГА 3' и 5' TTAGGСТТСТТСТТCAGGТТТАСТGСА GC 3', специфических к гену *rolB* (продукт амплификации — 780 п.н.).

Гистохимический анализ экспрессии β-глюкуронидазы проводили согласно [7] с наименьшими модификациями. GUS-анализ полученных корней и побегов проводили в 100 мМ фосфатном буфере pH 7,0, содержащем 1 мг/мл X-Gluc, 10 мМ ЭДТА, 0,1% Triton X-100, 50 мкМ K₃[Fe(CN)₆], 50 мкМ K₃[Fe(CN)₆], 2 мМ дитиотрейтол и 20% метанол, при 37 °С в течение ночи.

Результаты и обсуждение

Последовательность промотора *Mll* была амплифицирована с помощью ПЦР, матрицей для которой служила суммарная ДНК, выделенная из сахарной свеклы линии Ритма 6/36. Для определения первичной последовательности клонированной ДНК было проведено ее секвенирование. Анализ обнаружил характерные для промоторов ТАТА- и СААТ-мотивы и показал 99% гомологию с участком в 1742 п.н. заявленного тканеспецифического промотора (WO0240687). Используя базы данных PlantCARE и PLACE, в клонированной последовательности *Mll* были выявлены сайты связывания с MYB, АТВР-1, E2F-DP, GT-1 и Dof-протеинами, цис-регуляторные элементы, индуцируемые низкой температурой, повреждением, дегидратацией, анаэробными условиями, ауксинами и цитокининами, а также регуляторная последовательность, вовлеченная в циркадный контроль. Среди обнаруженных регуляторных элементов следует отметить ряд последовательностей, контролирующих экспрессию в корнях и корнеплодах (SPBF ТАСТАТТ-, АТАТТ-, АААГ- и СТСТТ-мотивы) и которые были ранее описаны для промоторов *rolD*, домена А35S вируса мозаики цветной капусты, *Mec1* маниока, *gSPO-A1*, *gSPO-B1*, β -*Amy* батата, *PHev2.1* гевети, *VfLb29* бобов, *TobRB7* табака и др. [8–13].

Для оценки специфичности и функциональности клонированного промотора *Mll* был сконструирован бинарный вектор рСВ129, содержащий репортерный ген *gusA* под контролем промотора *Mll* и селективный ген *nptII*. Соответствие полученной конструкции подтверждено методом рестриктоного анализа. Бинарные вектора рICBV16 и рСВ129 были перенесены в агробактериальные штаммы, которые в дальнейшем использовали для генетической трансформации.

В результате трансформации табака с помощью *A. tumefaciens*, содержащей бинарный вектор рICBV16 или рСВ129, были получены растения-регенеранты, способные укореняться на селективной среде с 100 мг/л Km. Присутствие генов *gusA* и *nptII* у отобранных растений табака было показано с помощью ПЦР. При гистохимическом окрашивании растения, трансформированные рICBV16, демонстрировали ожидаемую конститутивную экспрессию репортерного гена. Гистохимический анализ растений, трансформированных рСВ129, выявил экспрессию гена *gusA* в корнях, базальной части стебля и первых листьях, сформированных регенерирующими побегами. У зрелых листьев не было соответствующей окрашенности, что указывает на тканеспецифичность промотора *Mll*, контролирующего экспрессию гена *gusA*. У части трансформантов T₁, содержащих *Mll::gusA*, наблюдали конститутивную экспрессию репортерного гена.

Генетическую трансформацию моркови сортов Красный Великан и Перфекция проводили с помощью штамма *A. tumefaciens* GV3101, содержащего бинарный вектор рICBV16 или рСВ129. В результате экспериментов были отобраны растения моркови, устойчивые к 100 мг/л Km и проанализированы на наличие перенесенных генов *gusA* и *nptII* с помощью ПЦР. При гистохими-

мическом анализе трансгенные растения, содержащие *Mll::gusA*, целиком и интенсивно окрашивались, т.е. промотор *Mll* проявлял себя как сильный конститутивный промотор.

Поскольку “hairy roots”, широко используемые для синтеза вторичных метаболитов, могут также служить системами продукции рекомбинантных белков [14], мы решили изучить возможность экспрессии репортерного гена под контролем промотора *Mll* в трансгенных корнях. При генетической трансформации табака с помощью *A. rhizogenes*, содержащей бинарный вектор pICBV16 или pCB129, были получены культуры “бородатых корней”, активно растущие на селективной среде с 100 мг/л Km. Для дальнейшего анализа было отобрано по 8 клонов, трансформированных каждым из векторов. Наличие генов *rolB*, *gusA* и *nptII* в препаратах ДНК, выделенных из корневых культур, было подтверждено с помощью ПЦР-анализа. Клоны, трансформированные pCB129, характеризовались спонтанной регенерацией побегов, большая часть которых имела измененный фенотип: морщинистые листья, укороченные междоузлия и т.д. Гистохимический анализ выявил экспрессию гена *gusA* у 6 из 8 линий, трансформированных pICBV16, и у 7 из 8, трансформированных pCB129. Кроме того, листья растений, регенерировавших из 2 наиболее интенсивно окрашивающихся корневых линий, также демонстрировали активность β-глюкуронидазы.

Oltmanns et al. (2006), клонировавшие и исследовавшие промотор *Mll*, сообщают о его активности у трансгенных растений свеклы в корнях, гипокотылях и корнеплодах, а у табака — в корнях, гипокотылях и проводящих пучках листьев [1]. Результаты данной работы в целом согласуются с [1], хотя у моркови и некоторых растений табака активность промотора *Mll* в зеленых тканях не была фоновой, а имела скорее конститутивный характер. Возможным объяснением этого результата может быть то, что последовательность данного промотора *Mll* отличается от использованного в [1], или то, что у гетерологичных видов отсутствуют некие эндогенные факторы, что снижает специфичность активности промотора *Mll*.

Выводы

Был успешно клонирован промотор *Mll* из сахарной свеклы. В проведенных исследованиях промотор *Mll* функционировал как корнеспецифический, хотя в некоторых случаях его активность не ограничивалась только корнями и носила скорее конститутивный характер. Промотор *Mll* может быть использован в метаболической инженерии и для экспрессии генов, участвующих в синтезе и накоплении фармакологически ценных белков в корнях и корнеплодах.

Литература

1. Oltmanns H., Kloos D.U., Briess W. et al. Taproot promoters cause tissue specific gene expression within the storage root of sugar beet // *Planta*.— 2006.— Vol.224.— P. 485–495.
2. Генная инженерия растений. Лабораторное руководство: Пер. с англ. / Под ред. Дж. Дрейпера, Р. Скотта, Ф. Армидджа, Р. Уолдена.— М.: Мир, 1991.— 408 с.

3. Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual / Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.— Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed., 1989.— 1500 p.
4. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.*— 1962.— Vol.15.— P. 473–497.
5. Kapila J., De Rycke R., Van Montagu M., Angenon G. An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves // *Plant Sci.*— 1997.— Vol.122.— P. 101–108.
6. Horsch R.B., Fraley R.T., et al. Inheritance of functional foreign genes in plants // *Science.*— 1984.— Vol.223.— P. 496–498.
7. Jefferson R.A. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system / *Plant Mol. Biol. Rep.*— 1987.— Vol.5.— P. 387–405.
8. Elmayer T., Tepfer M. Evaluation in tobacco of the organ specificity and strength of the rolD promoter, domain A of the 35S promoter and the 35S2 promoter // *Transgenic Res.*— 1995.— Vol.4.— P. 388–396.
9. de Souza C.R., Arago F.J., Moreira E.C.O. et al. Isolation and characterization of the promoter sequence of a cassava gene coding for Pt2L4, a glutamic acid-rich protein differentially expressed in storage roots // *Genet. Mol. Res.*— 2009.— Vol.8, N1.— P. 334–344.
10. Ishiguro S. and Nakamura K. The nuclear factor SP8BF binds to the 5'-upstream regions of three different genes coding for major proteins of sweet potato tuberous roots // *Plant Mol. Biol.*— 1992.— Vol.18.— P. 97–108.
11. Pujade-Renaud V., Sanier C., Cambillau L. et al. Molecular characterization of new members of the *Hevea brasiliensis* hevein multigene family and analysis of their promoter region in rice // *Biochim. Biophys. Acta.*— 2005.— Vol.1727.— P. 151–161.
12. Vieweg M.F., Fruhling M., Quandt H.J. et al. The promoter of the *Vicia faba* L. leghemoglobin gene Vflb29 is specifically activated in the infected cells of root nodules and in the arbuscule-containing cells of mycorrhizal roots from different legume and nonlegume plants // *Mol. Plant Microbe Interact.*— 2004.— Vol.17.— P. 62–69.
13. Yamamoto Y.T., Taylor C.G., Acedo, G.N. et al. Characterization of cis-acting sequences regulating root-specific gene expression in tobacco // *Plant Cell.*— 1991.— Vol.3.— P. 371–382.
14. Chun J.-A., Lee W.-H., Han M.-O. et al. Optimization of abiotic factors for improved growth and extracellular production of recombinant fungal phytase in sesame hairy root culture // *Biotech. Bioprocess Eng.*— 2007.— Vol.12.— P. 242–249.

Резюме

Сконструирован бинарный вектор, содержащий ген β-глюкуронидазы под контролем корнеспецифического промотора *Mll*, клонированного из сахарной свеклы. Получены трансгенные растения табака и моркови и корневые линии табака, содержащие ген *gusA* под контролем *35S* и *Mll* промоторов. Гистохимический анализ растений и корневых линий табака, трансформированных *Mll::gusA*, показал корнеспецифическую экспрессию гена *gusA*. У растений моркови экспрессия *Mll::gusA* имела скорее конститутивный профиль.

Сконструйовано бінарний вектор, що містить ген β-глюкуронідази під контролем корнеспецифічного промотору *Mll*, клонованого з цукрового буряку. Отримано трансгенні рослини тютюну і моркви та кореневі лінії тютюну, що містять ген *gusA* під контролем *35S* та *Mll* промоторів. Гістохімічний аналіз рослин і корневих ліній тютюну, трансформованих *Mll::gusA*, показав корнеспецифічну експресію

гена *gusA*. У рослин моркви експресія *Mll::gusA* мала скоріше конститутивний профіль.

Mll promoter was cloned from sugar beet and linked to *gusA* gene to design binary vector. Transgenic tobacco and carrot plants and tobacco hairy roots harboured *Mll::gusA* and *35Sl::gusA* were obtained. GUS-analysis of transgenic tobacco plants and hairy roots transformed with *Mll::gusA* revealed root-specific gene expression. Reporter gene driven by *Mll* promoter has more likely constitutive expression in transgenic carrot.

КЛОЧКО В.В., ЗЕЛЕНА Л.Б., САФРОНОВА Л.А., АВДЄЄВА Л.В.

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Україна, Київ, 03680, вул. Заболотного, 154, e-mail: vvk@serv.imv.kiev.ua

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ПРОБІОТИЧНИХ ШТАМІВ *BACILLUS SUBTILIS* УКМ В-5139 ТА УКМ В-5140

Пробіотичні препарати на основі бактерій роду *Bacillus* широко використовуються для корекції дисбіотичних станів. Застосування таких препаратів сприяє відновленню нормальної мікрофлори організму, покращує травлення, має імуностимулюючий та дезінтоксикуючий ефекти. Відібрані штами *B. subtilis* УКМ В-5139 та УКМ В-5140 впливають на неспецифічну резистентність теплокровних організмів: підвищують імунний статус і фагоцитарну активність лейкоцитів крові, стимулюють активність лімфоцитів і лімфоїдних структур, позитивно впливають на білковий склад крові і посилюють індукцію ендogenous інтерферону [1, 2]. Також дані штами характеризуються широкою антагоністичною активністю щодо ряду умовно-патогенних та патогенних мікроорганізмів [3].

До цього часу недостатньо вивченим є питання про межі окремих видів бацил. Широка мінливість цих бактерій і різноманітна біологічна активність обумовлюють високу внутрішньовидову гетерогенність деяких видів бацил. Застосування нових молекулярно-біологічних методів дослідження дало змогу встановити генетичну гетерогенність виду *Bacillus cereus*, однак такі дослідження не проводились для *Bacillus subtilis* — виду, який найчастіше виділяють з довкілля. Останнім часом з використанням сучасних генетичних методів досліджень було встановлено, що вид *B. subtilis* складається з групи споріднених видів і підвидів, які можна відокремити один від одного методами генетичного типування [4, 5].

Метою роботи було визначення штамової специфічності *B. subtilis* УКМ В-5139 та УКМ В-5140 з використанням методів молекулярно-біологічного аналізу.

Матеріали і методи

Об'єкти досліджень — штами *B. subtilis* УКМ В-5139 та УКМ В-5140, що зберігаються в Українській колекції мікроорганізмів та підтримуються у відділі антибіотиків Інституту мікробіології і вірусології НАН України.