

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

РЕГЕНЕРАЦИЯ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ИЗ «БОРОДАТЫХ» КОРНЕЙ ЦИКОРИЯ *CICHORIUM* *INTYBUS L. VAR. FOLIOSUM HEGI*



После трансформации семядоль цикория *Cichorium intybus L. var. foliosum Hegi* диким штаммом *Agrobacterium rhizogenes A4* из культуры «бородатых» корней получены трансгенные растения, которые несут ген интерферона- $\alpha 2b$ человека или гены *esxA::fbrB^{ΔTMD}* антигенов *ESAT6* и *Ag85B* *Mycobacterium tuberculosis*. Показана возможность прямого (без образования каллусной ткани) формирования побегов из трансгенных корней на питательной среде без регуляторов роста. Перенос и транскрипция генов в растениях подтверждены результатами ОТ-ПЦР и ПЦР-анализов.

© Н.А. МАТВЕЕВА, Е.М. КИЩЕНКО, А.М. ШАХОВСКИЙ,
А.А. ПОТРОХОВ, Н.В. КУЧУК, 2011

Введение. Генетическая инженерия как способ получения растений с новыми свойствами представляет интерес не только для фундаментальных исследований, но также имеет практическую ценность, так как этим способом получают растения, которые синтезируют различные соединения, в том числе белки, имеющие применение в медицине, например интерферон.

Одним из объектов генетической инженерии является цикорий, обладающий рядом лечебных свойств и легко культивируемый *in vitro*. Это растение проявляет противовоспалительную, иммуностимулирующую, антиоксидантную, противоязвенную, противоопухолевую, кардиотоническую активность и используется для лечения диабета и других заболеваний [1–5]. На основе трансгенных растений, в том числе листового цикория, могут быть созданы так называемые съедобные вакцины – растения, экспрессирующие гены бактериальных антигенов и продуцирующие иммуногенные белки [6, 7].

Растения, продуцирующие не свойственные для них соединения, получают путем генетической трансформации, в том числе с помощью бактерий рода *Agrobacterium*. *Agrobacterium* – фитопатогены, имеющие природную способность вызывать у растений образование «корончатых галлов» (*A. tumefaciens*) или «бородатых» корней (*A. rhizogenes*) вследствие наличия Ti- или Ri-плазмид. После инфицирования растений Т-ДНК этих плазмид переносится в растительные клетки, в которых экспрессия бактериальных генов изменяет гормональный баланс, что и приводит к возникновению у инфицированных растений специфического фенотипа [8]. Указанный метод может быть использован для трансформации разных видов растений [8]. Для многих видов двудольных растений после *A. rhizogenes*-опосредованной трансформации были получены не только трансгенные «бородатые» корни, но и регенерированы растения [9].

Регенерация растений является неотъемлемым этапом получения трансгенных растений независимо от того, какой метод трансформации (агробактериальная, биолистическая) используется, а также какие экспланты (листья, корни, протопласты) подвергаются трансформации. Очень часто именно этот этап бывает лимитирующим звеном в процессе получения

растений с трансформированным геномом, так как эффективность регенерации растений видо- и сортозависима. Цикорий обладает высокой способностью к регенерации растений из различных эксплантов. Так, нами ранее было показано, что частота регенерации растений сорта Пала росса из семядоли составляет 100 % [10]. Эксплантами для получения растений цикория также могут быть листья [11–15] и корни [14, 15]. Возможна регенерация через стадию образования каллуса [14, 16], эмбриоидов [17, 18], а также прямая регенерация [10, 19]. Для получения растений в культуре *in vitro* используют такие регуляторы роста: кинетин [15], α -нафтилуксусную кислоту (НУК) и 2-изопентениладенин (2-іР) [17], кинетин и ИУК, кинетин и НУК, бензиламинопури́н (БАП) и ИУК, БАП–НУК, тидиазурон – ИУК [13] и др. [11, 20].

Целью настоящей работы была регенерация трансгенных растений цикория после генетической трансформации диким штаммом *A. rhizogenes* A4 с векторами, несущими последовательность генов *esxA::fbpB^{ΔTMD}* (гены антигенов ESAT6 и Ag85B *Mycobacterium tuberculosis*) или ген лейкоцитарного интерферона человека *ifn- α 2b*.

Материалы и методы. Для трансформации использовали семядоли 10-дневных проростков цикория *C. intybus* L. сорта Пала росса. Трансформацию проводили путем кокультивирования семядоль с агропиновым штаммом *A. rhizogenes* A4, содержащим векторные конструкции pCB158 [21] и pCB161 [22], Т-

ДНК которых включали селективный ген неомизинфосфотрансферазы II (*nptII*) с промотором гена нопалинсинтетазы, а также целевые гены соответственно *esxA::fbpB^{ΔTMD}* и ген лейкоцитарного интерферона *ifn- α 2b* с кальретикулиновым сигналом под контролем корнеспецифического промотора *MII* сахарной свеклы [23].

Трансформацию растений цикория проводили согласно методике, использованной ранее [10]. Трансгенные линии корней субкультивировали каждые 3 недели на среде Мурасиге и Скуга [24] с уменьшенным в два раза содержанием макроэлементов ($1/2$ МС), 25 мг/л канамицина («Киевмедпрепарат», Украина) и 600 мг/л цефотаксима («Дарница», Украина). Для регенерации растений из корней и их субкультивирования использовали среду того же состава.

Геномную ДНК выделяли ЦТАБ-методом [25]. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили на амплификаторе Mastercycler personal 5332 (Eppendorf). Использовали реакционную смесь такого состава: однократный ПЦР-буфер с сульфатом аммония, 0,2 мкМ праймеров, 200 мкМ дезоксинуклеотидтрифосфатов, 0,5 ед. Таq-полимеразы, 10–50 нг ДНК; объем реакционной смеси 20 мкл. Для выявления генов *nptII*, *ifn- α 2b*, *rolB*, *fbpB^{ΔTMD}* использовали соответственно праймеры 5'-cctgaatgaactccaggacgaggca-3' и 5'-gctctagatccagagtcscgctcagaag-3' (622 п.н.), 5'-ttgatgctctggcacag-3' и 5'-tctgctctgacaacctc -3' (396 п.н.), 5'-atggatccaaattgctattcctccacga-3' и 5'-ttaggctcttcttcaggtt-



Рис. 1. Регенерация растений после трансформации с помощью *A. rhizogenes*: а – рост «бородатых» корней; б, в – формирование побегов на трансгенных корнях. Масштабный отрезок – 1 см

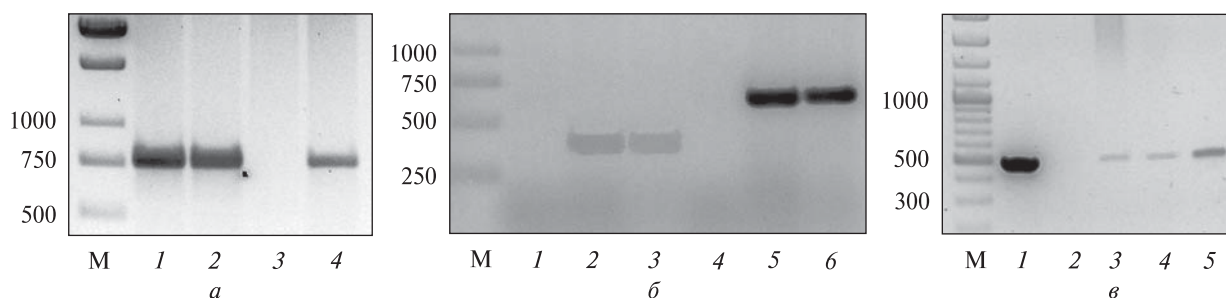


Рис. 2. ПЦР-анализ растений цикория с использованием праймеров к генам *rolB* (а), *ifn-α2b* (б, 1–3), *nptII* (б, 4–6) и *fbpB^{ΔTMD}* (в): а – М – ДНК-маркер (O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, «Fermentas»), 1, 2 – суммарная ДНК растений, трансформированных рСВ161, 3 – отрицательный контроль, ДНК нетрансформированного растения, 4 – положительный контроль, плазмидная ДНК рСВ161; б – М – ДНК маркер (O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, «Fermentas»), 1, 4 – отрицательный контроль, ДНК нетрансформированного растения, 2, 3, 5, 6 – суммарная ДНК растений, трансформированных рСВ161; в – М – ДНК-маркер (O'GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder, «Fermentas»), 1 – положительный контроль, плазмидная ДНК РСВ158, 2 – отрицательный контроль, ДНК нетрансформированного растения, 3–5 – суммарная ДНК растений, трансформированных рСВ158

tactgcagc-3' (780 п.н.), 5'-tctacagcgactggtacagc-3' и 5'-tcaggttgctgctacgaacg-3' (484 п.н). Условия амплификации: первичная денатурация – 94 °С, 3 мин, 30 циклов (94 °С, 30 с – 62 °С, 30 с – 72 °С, 30 с для *nptII*, *ifn-α2b*, *fbpB^{ΔTMD}*; для *rolB* – длительность синтеза 40 с, 72 °С), заключительная полимеризация – 72 °С, 3 мин.

Для выявления транскрипции перенесенных генов в трансформированных корнях и регенерированных растениях проводили ПЦР, сопряженную с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Выделяли суммарную РНК [26], обработанные ДНКазой I (свободной от РНКазы) препараты которой использовали в качестве матрицы для синтеза первой цепи кДНК с помощью набора реактивов «Fermentas» (согласно инструкции). Далее 2–5 мкл реакционной смеси использовали как матрицу для ПЦР с соответствующими праймерами. Кроме того, проводили ПЦР для контроля качества препаратов РНК, чтобы убедиться в отсутствии примеси ДНК, которая могла бы привести к ложноположительным результатам ОТ-ПЦР.

Результаты исследований и их обсуждение. Рост «бородатых» корней цикория на семядольных эксплантах инициировался на среде 1/2 МС с канамицином и цефотаксимом уже через 10–12 сут после трансформации *A. rhizogenes*. Было получено 24 линии корней. При перенесении участков корней (около 10 мм) на селективную среду без регуляторов роста наблюдался их интенсивный рост, причем

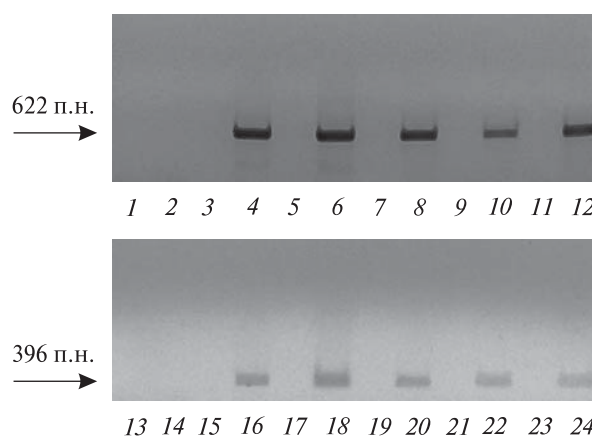


Рис. 3. ОТ-ПЦР-анализ растений цикория с использованием праймеров к генам *nptII* (1–12) и *ifn-α2b* (13–24): 1, 13 – отрицательный контроль, суммарная РНК нетрансформированного растения, 2, 14 – отрицательный контроль, кДНК нетрансформированного растения; 3, 5, 7, 9, 11, 15, 17, 19, 21, 23 – отрицательный контроль, суммарная РНК трансгенных растений; 4, 6, 8, 10, 12, 16, 18, 20, 22, 24 – кДНК трансгенных растений

корни имели характерный для «бородатых» корней (Ri-корней) фенотип (рис. 1, а), который обусловлен переносом T_L-фрагмента T-ДНК плазмиды pRi агропинового типа с генами *rolA*, *B*, *C*, *D* [8].

При культивировании трансгенных корней в селективной среде на свету через 1 мес на них наблюдали прямое (без образования каллуса) формирование побегов (рис. 1, б, в). При

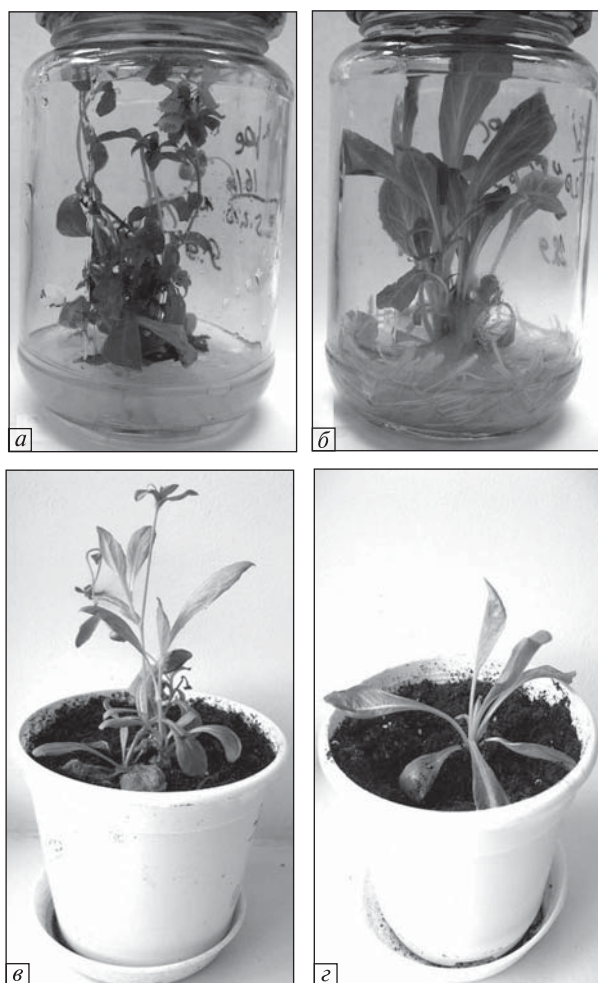


Рис. 4. Формирование цветоноса у трансгенного растения с геном *ifn-α2b* (а, в) и розеточная форма (б, г) контрольного растения в культуре *in vitro* (а, б) и в почве (в, г)

этом отмечали позеленение и небольшое утолщение корней. Растения формировались на корнях всех линий растений, полученных после трансформации.

Для подтверждения факта присутствия в регенерированных растениях T_L-фрагмента T-ДНК плазмиды pRi проводили амплификацию суммарной ДНК с праймерами, специфичными гену *rolB*. Анализ выявил во всех протестированных образцах присутствие фрагмента ДНК размером 780 п.н., что указывает на наличие гена *rolB* в трансформированных растениях цикория (рис. 2, а). Был проведен ПЦР-анализ растений, регенерированных из

корней (8 линий корней, трансформированных вектором pCB161, и 1 линия pCB158). Все анализированные с помощью ПЦР растения имели селективный ген *nptII* и последовательности целевых генов (рис. 2, б, в). Анализ обратных транскриптов генов *ifn-α2b* и *nptII* показал присутствие мРНК селективного и целевого генов (рис. 3).

После трансформации с помощью *A. rhizogenes* трансгенные растения могут быть получены как из образовавшихся «бородатых» корней, так и в редких случаях непосредственно в результате прямой регенерации из эксплантов, которые обрабатывали агробактериями. Регенерация растений из трансгенных корней может быть спонтанной или индуцироваться регуляторами роста, а формирование растений-регенерантов может быть светозависимым или не зависеть от освещенности [8, 27–31].

В наших экспериментах регенерация непосредственно из использованных в качестве эксплантов семядоль отсутствовала, все растения были получены после формирования корней (рис. 1, б, в). После *A. rhizogenes*-опосредованной трансформации цикория не возникала необходимость в использовании регуляторов роста, так как образование побегов происходило спонтанно при культивировании «бородатых» корней на среде 1/2 МС. При этом каллусная ткань не образовывалась, растения регенерировали непосредственно из корней. Побеги образовывались только на свету, причем регенерация отмечена для всех полученных трансгенных линий «бородатых» корней, а время начала регенерации с момента трансформации составляло 6–8 нед. Регенерация растений из изолированных корней дикого типа при тех же условиях отсутствовала.

Все полученные линии трансгенных корней (как с вектором pCB158, так и pCB161) имели высокий регенерационный потенциал. Из каждой линии были получены растения-регенеранты, причем при этом корни не теряли способности к регенерации и при длительном пассировании в оптимальных условиях (на свету).

Известно, что степень выраженности R_i-фенотипа трансгенных растений зависит от экспрессии *rol* генов. «Молчание» этих генов приводит к формированию побегов с фе-

нотипом дикого типа. Для розеточных растений, к которым относятся и цикорий в первый год вегетации, после трансформации *A. rhizogenes* укорочение междоузлий не является характерным признаком Ri-фенотипа. Полученные нами трансформированные растения цикория как в культуре *in vitro*, так и в условиях теплицы не отличались от контрольных, хотя в них присутствовал T_L-фрагмент T-ДНК pRi плазмиды. Вместе с тем трансгенные растения быстрее формировали корни, для которых был характерен плагиотропный рост.

Для растений, трансформированных *A. rhizogenes* с геном *ifn-α2b*, наблюдалось быстрое (через 2–3 месяца после трансформации) *in vitro* формирование цветоноса, что отличало их от контрольных растений, имеющих типичную для цикория розеточную форму (рис. 4). Аналогичное явление нами ранее наблюдалось у растений цикория, трансформированных вектором pCB124 с геном *ifn-α2* [10]. В то же время цветение в первый год растений цикория, полученных нами после трансформации векторами pCB063 [32] и pCB158 с генами туберкулезных антигенов ESAT6 и Ag85B, отсутствовало. Обнаруженный феномен полученных трансгенных растений представляет интерес и требует дополнительного изучения.

Таким образом, из полученных после трансформации с помощью *A. rhizogenes* корней регенерированы растения, имеющие гены интерферона (*ifn-α2b*) и туберкулезных антигенов (*esxA::fbpB^{ΔTMD}*). Регенерация растений наблюдалась непосредственно на корнях (без образования каллусной ткани), была светозависимой и гормоннезависимой. Анализированные растения имели селективные и целевые гены, а также ген *rolB A. rhizogenes*. Анализ обратных транскриптов генов *ifn-α2b* и *nptII* показал присутствие мРНК селективного и целевого генов.

N.A. Matvieieva, O.M. Kishchenko,
A.M. Shakhovskiy, A.O. Potrochov, M.V. Kuchuk

REGENERATION OF TRANSGENIC PLANTS
FROM *CICHORIUM INTYBUS* L. VAR. *FOLIOSUM*
HEGI HAIRY ROOTS

Transgenic plants were regenerated from *Cichorium intybus* L. hairy roots transformed with genes of tuberculosis antigens ESAT6 and Ag85B or human interferon *α2b*.

The plant regeneration was light-dependent and occurred on the media without growth regulators. The DNA PCR and RT-PCR analyses have shown the presence and expression both selective and target genes in all root lines and regenerated plants.

N.A. Matvieieva, O.M. Kishchenko,
A.M. Shakhovskiy, A.O. Potrochov, M.V. Kuchuk

РЕГЕНЕРАЦІЯ ТРАНСГЕННИХ РОСЛИН ІЗ
«БОРОДАТИХ» КОРЕНІВ ЦИКОРІЮ *CICHORIUM*
INTYBUS L. VAR. *FOLIOSUM* HEGI

Після трансформації сім'ядоль цикорію *Cichorium intybus* L. var. *foliosum* Hegi диким штамом *Agrobacterium rhizogenes* A4 із культури «бородатих» коренів отримано трансгенні рослини з геном інтерферону-*α2b* людини та генами *esxA::fbpB^{ΔTMD}* антигенів ESAT6 і Ag85B *Mycobacterium tuberculosis*. Показано можливість прямого (без утворення калусної тканини) формування пагонів із трансгенних коренів на живильному середовищі без регуляторів росту. Перенесення та транскрипція генів підтверджені результатами ЗТ-ПЛР та ПЛР-аналізів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ki C.G., Yim D., Lee S.Y. Biological activities of root of *Cichorium intybus*// Nat. Prod. Sci. – 1999. – 5, № 4 – P. 155–158.
2. Gadgoli C., Mishra S.H. Antihepatotoxic activity of *Cichorium intybus* // Ethanopharmacology. – 1997. – 58, № 2. – P. 131–134.
3. Ahmad K.D., Gilani S.N., Akhta A.H., Khan L. Antiulcerogenic evaluation of aqueous extracts of *Cichorium intybus* and *Phyllanthus emblica* in normal and aspirin-treated rats // Pakistan. J. Sci. and Industrial Res. – 1998. – 41, № 2. – P. 92–96.
4. Hughes R., Rowland I.R. Stimulation of apoptosis by two prebiotic Chicory fructans in the rat colon // Carcinogenesis. – 2001. – 22, № 1. – P. 43–47.
5. Monde K.O., Shira A., Takasugi M. A guaianolids phytoalexin, cichorlexin, from *Cichorium intybus* // Phytochemistry. – 1990. – 29, № 1. – P. 3449–3451.
6. Streatfield S.J. Mucosal immunization using recombinant plant-based oral vaccines // Methods. – 2006. – 38, № 2. – P. 150–157.
7. Young Sook Kim, Bang Geul Kim, Tae Geum Kim et al. Expression of a cholera toxin B subunit in transgenic lettuce (*Lactuca sativa* L.) using *Agrobacterium*-mediated transformation system // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2006. – 87, № 2. – P. 203–210.
8. Tepfer D. Genetic transformation using *Agrobacterium rhizogenes* // Physiol. Plant. – 1990. – 79, № 1. – P. 140–146.
9. Christey M.C. Transgenic crop plants using *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation // Hairy roots: culture and applications / Ed. P.M. Doran. – Amsterdam : Harwood Acad. Publ., 1997. – P. 99–110.

10. Матвеева Н.А., Шаховский А.М., Герасименко И.М. *in vitro*. Перенесення гена біосинтезу інтерферону- $\alpha 2b$ в рослини цикорію (*Cichorium intybus* L.) методом агробактеріальної трансформації // *Biopolym. Cell.* – 2009. – **25**, № 2. – С. 120–125.
11. Rehman R.U., Israr M., Srivastava P.S. *et al.* In vitro regeneration of witloof chicory (*Cichorium intybus* L.) from leaf explants and accumulation of esculin // *In Vitro Cel. Devel. Biol. Plant.* – 2003. – **39**, № 2. – P. 142–146.
12. Cheng Lin Mei, Cao Qiu Fen, Huang Jing *et al.* Establishment of a highly efficient genetic transformation system in *Cichorium intybus* // *Acta Pratacult. Sin.* – 2004. – **13**, № 6. – P. 112–116.
13. Buhara Yucesan, Arzu Ucar Turker, Ekrem Gurel. TDZ-induced high frequency plant regeneration through multiple shoot formation in witloof chicory (*Cichorium intybus* L.) // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* – 2007. – **91**, № 3. – P. 243–250.
14. Velayutham P., Ranjitha Kumari B.D., Baskaran P. An efficient *in vitro* plant regeneration system for *Cichorium intybus* L.— an important medicinal plant // *J. Agricult. Technol.* – 2007. – **2**, № 2. – P. 287–298.
15. Profumo P., Gastaldo P., Caffaro L. *et al.* Callus induction and plantlet regeneration in *Cichorium intybus* L. 2. Effect of different hormonal treatments // *Protoplasma.* – 1985. – **126**, № 3. – P. 215–220.
16. Caffaro L., Dameri R.M., Profumo P., Bennici A. Callus induction and plantlet regeneration in *Cichorium intybus* L. 1. A cytological study // *Protoplasma.* – 1982. – **111**, № 2. – P. 107–112.
17. Sidikou-Seyni R., Rambaud C., Dubois J., Vasseur J. Somatic embryogenesis and plant regeneration from protoplasts of *Cichorium intybus* L. \times *Cichorium endivia* L. // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* – 1992. – **29**, № 2. – P. 83–91.
18. Heirwegh K.M.G., Nirmalya Banerjee, van Nerum K., de Langhe E. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Cichorium intybus* L. (Witloof, Compositae) // *Plant Cell Rep.* – 1985. – **4**, № 2. – P. 108–111.
19. Velayutham P., Ranjitha Kumari B.D. Direct shoot regeneration from leaf explants of Chicory (*Cichorium intybus* L.) // *Plant Cell Biotechnol. and Mol. Biol.* – 2003. – **4**, № 3/4. – P. 125–130.
20. Nenz E., Varotto S., Lucchin M., Parrini P. An efficient and rapid procedure for plantlet regeneration from chicory mesophyll protoplasts // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* – 2000. – **62**, № 1. – P. 85–88.
21. Матвеева Н.А., Кищенко О.М., Шаховський А.М., Кучук М.В. Перенесення в рослини ряски *Lemna minor* L. генів туберкульозних антигенів ESAT6 та AG85B шляхом *Agrobacterium rhizogenes*-опосередкованої трансформації // *Біотехнологія.* – 2011. – **46**, № 2. – С. 46–53.
22. 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.
23. Borisjuk N., Borisjuk L., Logendra S. *et al.* Production of recombinant proteins in plant root exudates // *Nat. Biotechnol.* – 1999. – **17**, № 5. – P. 466–469.
24. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture // *Phys. Plant.* – 1962. – **15**, № 3. – P. 473–497.
25. Дрейнер Дж., Скогг П. Выделение нуклеиновых кислот из клеток растений // *Генная инженерия растений.* – М.: Мир, 1991. – С. 241–245.
26. Logemann J., Schell J., Willmitzer L. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues // *Anal. Biochem.* – 1987. – **163**, № 1. – P. 16–20.
27. Nilsson O., Olsson O. Getting to the root : The role of the *Agrobacterium rhizogenes rol* genes in the formation of Hairy roots // *Physiol. Plant.* – 1997. – **100**, № 3. – P. 463–473.
28. Hamill J.D., Rhodes M.J.C. A spontaneous, light independent and prolific plant regeneration response from hairy roots of *Nicotiana glauca* transformed by *Agrobacterium rhizogenes* // *J. Plant Physiol.* – 1988. – **133**, № 1. – P. 506–509.
29. Ohara A., Akasaka Y., Daimon H., Mii M. Plant regeneration from hairy roots induced by infection with *Agrobacterium rhizogenes* in *Crotalaria juncea* L. // *Plant Cell Rep.* – 2000. – **19**, № 6. – P. 563–568.
30. Yang D.-C., Choi Y.-E. Production of transgenic plants via *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Panax ginseng* // *Plant Cell Rep.* – 2000. – **19**, № 5. – P. 491–496.
31. Moghaieb R.E., Saneoka H., Fujita K. Shoot regeneration from GUS-transformed tomato (*Lycopersicon esculentum*) hairy root // *Cell Mol Biol Lett.* – 2004. – **9**, № 3. – P. 439–449.
32. Матвеева Н.А., Василенко М.Ю., Шаховський А.М. *и др.* Эффективная агробактериальная трансформация растений цикория (*Cichorium intybus* L.) вектором с геном туберкулезного антигена ESAT6 // *Цитология и генетика.* – 2011. – **45**, № 1. – С. 11–17.

Поступила 09.11.10