

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ**

МАТВЄЄВА

Надія Анатоліївна

УДК 575.222.7:581.1

**СТВОРЕННЯ ГЕНЕТИЧНО МОДИФІКОВАНИХ РОСЛИН РОДИН
COMPOSITAE TA SOLANACEAE**

03.00.20 – біотехнологія

Автореферат

дисертації на здобуття вченого ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2009

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у відділі генетичної інженерії Інституту клітинної біології та генетичної інженерії Національної Академії Наук України

Науковий керівник: член-кореспондент НАН України, професор

Кучук Микола Вікторович,
Інститут клітинної біології та
генетичної інженерії НАН України,
в.о. директора Інституту

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук,

Тищенко Олена Миколаївна,
Інститут фізіології рослин
і генетики НАН України,
в.о. зав. відділу генетичної інженерії

кандидат біологічних наук,

Сорочинський Борис Володимирович,
Інститут харчової біотехнології
та геноміки НАН України,
зав. відділу нових технологій

Захист відбудеться « 28 » травня 2009 р. о 16 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д.26.202.01 при Інституті клітинної біології та генетичної інженерії НАН України за адресою: 03680, Київ-143, вул. акад. Заболотного, 148

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України за адресою: 03680, Київ-143, вул. акад. Заболотного, 148

Автореферат розісланий « 15 » квітня 2009 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук



О.А. Кравець

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Генетично модифіковані рослини використовуються в сільському господарстві з 1996 року. За даними на 2006 р. їх вирощували у 22 країнах на загальній площі 102 млн. га. До комерціалізованих трансгенних культур належать соя, кукурудза, бавовник, ріпак (Сорочинський та ін., 2007). Ці трансгенні рослини та багато інших (всього трансформовано близько 100 видів рослин) були створені при застосуванні таких методів генетичної інженерії як трансформація рослин за допомогою ґрунтової бактерії *Agrobacterium tumefaciens*, біолістична трансформація, електропорація та ін. (Barton et al., 1983; Klein et al., 1987; Guerche et al., 1987). Цінність зазначених методів полягає у можливості трансформування як ядерного, так і хлоропластного геному (Willmitzer et al., 1980; Golds et al., 1993). Такі особливості трансформації хлоропластної ДНК, як материнське успадкування генів, високий рівень експресії, специфічність за місцем вбудовування трансгена, поліцистронний тип експресії (Birky, 1995; Mc Bride et al., 1995; 13, Staub et al., 1992), є безумовними перевагами методу та ставлять його в ряд таких, що привертають особливу увагу в дослідженнях, спрямованих на реконструкцію геному рослин.

Особливий інтерес становить використання генетичної інженерії в практичних цілях. Такими є створення рослин, стійких до біотичних та абіотичних факторів, зокрема, рослин, що не вражаються шкідниками (Kota et al., 1999), стійких до бактеріальних та вірусних хвороб (Conrath et al., 2003). Активно розвивається напрямок зі створення трансгенних рослин, стійких до гербіцидів. Нині створено сорти генетично модифікованих рослин сої, кукурудзи, ріпаку, бавовнику, люцерни, що є стійкими до гербіцидів гліфосату, фосфінотрицину та ін.

Останнім часом увага приділяється створенню генетично модифікованих рослин, які можуть бути використані як біопродуценти білків медичного призначення. Рекомбінантні білки, що експресуються в трансгенних рослинах, є основою створення вакцин для захисту людей та тварин від таких вкрай небезпечних хвороб, як холера, туберкульоз, гепатит В та ін. (Kapusta et al., 1999; Dorokhov et al., 2007). Гени, що кодують синтез бактеріальних антигенів, можуть бути інтродуковані як в ядерну, так і в хлоропластну ДНК. Завдяки високому рівню експресії трансгенів в хлоропластах метод трансформації хлоропластної ДНК є привабливим та може стати ефективним інструментом для створення генетично модифікованих рослин, які синтезують фармацевтичні білки. Крім того, такі рослини з трансформованим геномом як салат, томат та ін. можуть бути застосовані як їстівні вакцини для профілактики небезпечних захворювань.

Використання генетично модифікованих рослин сприяє збільшенню продуктивності сільськогосподарських культур, поліпшенню якості продуктів, може знизити вартість профілактики та лікування хвороб. Культивування трансгенних рослин може зменшити забруднення довкілля гербіцидами та пестицидами.

До родин Solanaceae та Compositae належить ряд видів, що культивуються в сільському господарстві. Створення генетично модифікованих рослин картоплі,

томатів, салату, цикорію та ін., що не вражаються хворобами, є стійкими до біотичних та абіотичних факторів середовища, а також рослин-продуцентів фармакологічно активних речовин є актуальним напрямком сучасних біотехнологічних досліджень. Дослідження щодо створення транспластомних рослин *S. rickii* Corr., рослин *Cichorium intybus* L. та *Lactuca sativa* L. з геном інтерферону чи генами, що кодують синтез туберкульозних антигенів, нині відсутні. Разом з тим, вказані рослини цикорію та салату можуть використовуватися в якості так званих істівних вакцин, а транспластомні *S. rickii* - як донор трансформованих хлоропластів. Отже, становить науковий і практичний інтерес оптимізація застосування методів клітинної та генетичної інженерії, зокрема, соматичної гібридизації, біолістичної та *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації для створення трансгенних та транспластомних рослин родів *Solanum*, *Lactuca*, *Cichorium*. Результати таких робіт та отримані генетично модифіковані рослини можуть бути використані як в сільському господарстві, так і в інтересах медицини та фармакології.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дослідження проводились в рамках бюджетних тем відділу генетичної інженерії ІКБГІ НАНУ “Дослідження біологічних процесів в генетично модифікованих рослинах“, державний реєстраційний № 0101U000390; “Вивчення особливостей функціонування геному у генетично змінених рослин”, державний реєстраційний №0105U006035; “Створення трансгенних рослин висококрохмальних сортів картоплі з підвищеною продуктивністю, стійкістю до колорадського жука і гербіцидів з метою використання як джерела біоетанолу”, державний реєстраційний № 0107U008347, цільової комплексної програми “Біомаса як паливна сировина”: “Отримання трансгенних форм картоплі вітчизняної селекції зі стійкістю до колорадського жука”, державний реєстраційний № 0103U008883.

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було створення рослин родин Compositae та Solanaceae з трансформованим ядерним або хлоропластним геномом. Це досягалося *Agrobacterium tumefaciens*-опосередкованою генетичною трансформацією салату-лутуку *Lactuca sativa* і цикорію *Cichorium intybus*, трансформацією рослин *Solanum rickii* біолістичним методом, створенням соматичних гібридів *Lycopersicon peruvianum* + (*S. rickii*) і *Solanum tuberosum* + *S. rickii* з трансформованим пластомом.

В завдання входило:

1. Отримання трансгенних рослин родів *Solanum* та *Lycopersicon* з трансформованим хлоропластним геномом
 - скрінінг 14 видів рослин роду *Solanum* для виявлення тих, що мають найкращу регенераційну здатність;
 - оптимізація умов регенерації рослин з міжвузлів та листків *S. rickii* (дикого виду роду *Solanum*);
 - отримання рослин *S. rickii* з трансформованими пластидами біолістичним методом;

- отримання соматичних гібридів між транспластомними рослинами *S. rickii* та *S. tuberosum* двох сортів (Лугівський та Слов'янка) з трансформованими пластидами;

- отримання соматичних гібридів між транспластомними рослинами *S. rickii* та *L. peruvianum* з трансформованими пластидами.

2. Створення генетично модифікованих рослин салату-латуку з трансформованою ядерною ДНК

- оптимізація умов регенерації рослин з сім'ядольних листків салату-латуку;
- отримання трансгенних рослин салату-латуку з генами, що кодують синтез туберкульозних антигенів.

2. Створення генетично модифікованих рослин цикорію з трансформованою ядерною ДНК

- оптимізація умов регенерації рослин з сім'ядольних листків;
- отримання трансгенних рослин цикорію з геном інтерферону

Об'єкт дослідження – генетична трансформація ядерної ДНК *Lactuca sativa* та *Cichorium intybus*, генетична трансформація хлоропластної ДНК рослин *S. rickii* та соматична гібридизація рослин роду *Solanum* (*S. rickii*, *S. tuberosum*, *L. peruvianum*).

Предмет дослідження – отримання трансгенних рослин *L. sativa* і *C. intybus* з трансформованою ядерною ДНК, транспластомних рослин *S. rickii* та соматичних гібридів *S. tuberosum* + *S. rickii* і *L. peruvianum* + (*S. rickii*) з трансформованими пластидами.

Методи дослідження включали методи культивування рослинних тканин *in vitro*, культивування ізольованих протопластів, соматичну гібридизацію, біолістичну трансформацію, генетичну трансформацію з використанням *Agrobacterium tumefaciens*. Наявність та експресію трансгенів в геномі трансформованих рослин виявляли за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та полімеразної ланцюгової реакції, поєднаної зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР). Гібриди аналізували шляхом рестрикції ампліфікованих ділянок хлоропластної та мітохондріальної ДНК. Для аналізу експериментальних даних використано стандартні методи статистичної обробки.

Наукова новизна

Вперше методом агробактеріальної трансформації отримано трансгенні рослини салату-латуку *L. sativa* сортів “Єралаш”, “Рубінове мереживо”, “Сніжинка” з генами, що кодують синтез туберкульозних антигенів.

Вперше методом агробактеріальної трансформації отримано трансгенні рослини цикорію *C. intybus* сорту “Пала росса” з геном інтерферону.

Вперше методом біолістичної трансформації отримано рослини дикого виду *S. rickii* з трансформованим хлоропластним геномом.

Вперше методом соматичної гібридизації отримано гібридні рослини *L. peruvianum* + (*S. rickii*), що містять трансформовані хлоропласти *S. rickii*.

Вперше показано можливість перенесення трансформованих хлоропластів з дикого виду родини Solanaceae до картоплі та отримано гібридні рослини *S. tuberosum* + *S. rickii* з трансформованою хлоропластною ДНК.

Практичне значення отриманих результатів. Оптимізована методика трансформації салату-латуку та цикорію за допомогою агробактерій дозволяє отримувати трансгенні рослини з високою ефективністю. Вона може бути успішно застосована для створення генетично модифікованих рослин з генами, що становлять практичний інтерес. Трансгенні рослини салату-латуку та цикорію з генами, що кодують синтез туберкульозних антигенів та інтерферону, можуть бути використані як їстівні вакцини для профілактики захворювання на туберкульоз та лікування вірусних захворювань. Гібридні рослини *S. tuberosum* з генетичним матеріалом дикого родича картоплі, *S. rickii*, можуть бути застосовані в селекції рослин картоплі з підвищеною стійкістю до хвороб та шкідників, адже *S. rickii* має такі цінні для селекції ознаки як стійкість до низьких температур, інфекцій та комах.

Особистий внесок здобувача. Особистий внесок здобувача полягає в проведенні всіх експериментів з оптимізації умов регенерації, біолістичної трансформації рослин *S. rickii*, отримання транспластомних рослин *S. rickii*.

Розроблено оптимізовані протоколи культивування мезофільних протопластів *S. rickii*, *S. tuberosum*, *L. peruvianum*. Проведено експерименти з соматичної гібридизації та отримано гібриди *S. tuberosum* + *S. rickii*, *L. peruvianum* + (*S. rickii*). Проведено скрінінг сортів салату-латуку з метою виявлення тих, що мають найвищу регенераційну здатність. Оптимізовано умови регенерації рослин з листових експлантів *L. sativa* та *C. intybus*. Методом агробактеріальної трансформації створено трансгенні рослини салату-латуку з генами, що кодують синтез туберкульозних антигенів, і цикорію з геном інтерферону.

Здобувачем проведено аналіз наукової літератури, підготовлено та написано наукові статті, сформульовано висновки щодо результатів проведеної роботи.

Спільно з науковим керівником проведено вибір об'єктів та напрямку, розробку структури дисертаційної роботи.

Векторна конструкція pCB033 надана проф. Н. Коор (Мюнхенський університет, Німеччина). Векторні конструкції pCB063, pCB064 з генами туберкульозних антигенів, наданими проф. Дороховим Ю.Л. (Інститут фізико-хімічної біології ім. А.Н.Белозерського, МДУ), було переклоновано Василенко М.Ю. (ІКБГІ НАНУ). Векторну конструкцію pCB124 з геном синтезу інтерферону було переклоновано Герасименко І.М. (ІКБГІ НАНУ).

Молекулярно-біологічні аналізи з використанням ПЛР були проведені спільно з Шаховським А.М. (ІКБГІ НАНУ).

Апробація результатів роботи. Результати досліджень було представлено на Науковій конференції товариства генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавілова, Україна, Київ, 19-21 грудня 2004 р., на Міжнародній конференції “Проблемы современной генетики”, Республіка Білорусь, Мінськ, 17-18 листопада 2005, Міжнародній науковій конференції, присвяченій 80-річчю з дня народження академіка А.М. Гродзинського “Алелопатія та сучасна біологія”, Україна, Київ, 17-19 жовтня 2006 р., Міжнародній науковій конференції товариства генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавілова, Україна, Алушта, 24-28 вересня 2007 р., IX конференції “Биология клеток растений in vitro и биотехнология”, Росія, Звенигород, 8-12 вересня 2008 р., IV міжнародній науково-практичній конференції “Біотехнологія. Наука. Освіта.

Практика.”, Україна, Дніпропетровськ, 11-13 листопада 2008 р. та на наукових семінарах відділу генетичної інженерії (2001-2009 р.р.).

Публікації. За результатами дисертаційної роботи опубліковано 9 наукових робіт, що включають 5 статей в фахових наукових журналах, 4 тези у збірках матеріалів конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів, результатів досліджень та їх обговорення, узагальнення, висновків та списку використаних джерел, що містить 349 посилань. Дисертація викладена на 188 сторінках комп'ютерного друку і містить 11 таблиць та 41 рисунок.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Вихідний матеріал.

1. Трансгенні рослини картоплі *Solanum tuberosum* L. сортів “Лугівський”, “Слов’янка” з геном *nptII* з колекції асептичних рослин ІКБГІ НАНУ, Київ, Україна.

2. Рослини *Solanum rickii* Согг. з колекції ІКБГІ НАНУ.

3. Пластомний хлорофілдефектний мутант Lp3-alb *Lycopersicon peruvianum* var. *dentatum* Dun. лінії 3767 з колекції ІКБГІ НАНУ.

4. Насіння салату-латуку *Lactuca sativa* L. листових сортів “Сніжинка”, “Рубінове мереживо”, “Єралаш”, “Ред корал”, “Грін корал” та головчастих сортів “Єва”, “Майська королева”, “Тренада”.

5. Насіння цикорію *Cichorium intybus* L. сорту “Пала росса”.

Асептичні рослини салату-латуку і цикорію отримували шляхом поверхневої стерилізації насіння. Для цього насіння послідовно витримували в 70% етанолі (30 сек.), 25% розчині комерційного препарату “Білизна” (10 хв.), промивали тричі по 10 хв. в стерильній дистильованій воді. Насіння пророщували на агаризованому середовищі Мурасіге і Скуга (MS) (Murashige *et al.*, 1962) в темноті при 26°C.

Рослини *S. tuberosum*, *S. rickii*, *L. peruvianum* культивували на агаризованому середовищі MS при температурі 24° С, 16-годинному світловому періоді і освітленні 4000 люкс та розмножували живцюванням на тому ж середовищі.

Ініціювання калюсо- і пагоноутворення з листових та стеблових експлантів рослин роду *Solanum*. Для ініціювання регенерації пагонів листові пластинки рослин 14 видів роду *Solanum* (*S. rickii*, *S. papita*, *S. cardiophyllum*, *S. simplicifolium*, *S. schickii*, *S. knappei*, *S. boergeri*, *S. saltense*, *S. gibberulosum*, *S. microdontum*, *S. stoloniferum*, *S. nigrum*, *S. verrucosum*, *S. jamesii*) культивували на середовищах, що відрізнялися за наявністю та концентраціями фітогормонів бензиламінопурину (БАП), кінетину, 2,4-дихлорфеноксіоцтової кислоти (2,4-D). Частоту регенерації визначали як відношення кількості експлантів з ознаками регенерації рослин до загальної кількості експлантів, виражене у відсотках. Ініціацію калюсоутворення із сегментів міжвузлів, регенерацію рослин з отриманих калюсних тканин та пряму регенерацію рослин з листових пластинок проводили згідно розробленої методики (Матвеева и др., 2005).

Регенерація рослин *Lactuca sativa* та *Cichorium intybus*. Для регенерації рослин різних сортів салату-латуку використовували сім'ядольні листки 5-20-денних проростків. Експланти культивували на агаризованих середовищах S-1, S-3 та S-4 (Матвеева и др., 2009). Для визначення частоти регенерації рослин з сім'ядольних та листових експлантів цикорію використовували середовища, що відрізнялися як вмістом солей, так і фітогормонів (Матвеева та ін., 2009).

Виділення і культивування протопластів *Solanum rickii*, *Solanum tuberosum* та *Lycopersicon peruvianum*. Для виділення мезофільних протопластів з рослин *S. rickii*, *S. tuberosum*, *L. peruvianum* використовували методику, описану раніше (Матвеева и др., 2005). Ізольовані протопласти культивували на середовищах K3, WSS (Сидоров и др., 1985), ініціювання регенерації рослин проводили на STA, STC (Shepard et al., 1977)

Соматична гібридизація протопластів *Solanum rickii* та *Solanum tuberosum*, культивування продуктів злиття і регенерація гібридних рослин. Злиття протопластів проводили за модифікованою методикою (Menczel et al., 1981). Селекцію гібридних колоній проводили за їх здатністю до біосинтезу хлорофілу на середовищі з 25 мг/л канаміцину (Km), 100 мг/л стрептоміцину (Str) та 50 мг/л спектиноміцину (Spm). Для індукції морфогенезу використовували послідовне культивування на середовищах STA та STC (Сидоров и др., 1985). Через 1 місяць після злиття концентрацію антибіотиків в культуральному середовищі підвищували до 50 мг/л Km, 200 мг/л Str, 100 мг/л Spm. Регенеранти укорінювали на безгормональному агаризованому середовищі MS з антибіотиками в тих самих концентраціях.

Соматична гібридизація протопластів *Solanum rickii* та *Lycopersicon peruvianum*, культивування продуктів злиття і регенерація гібридних рослин. Злиття протопластів проводили за модифікованою методикою (Menczel et al., 1981). Протопласти рослин-донорів *S. rickii* опромінювали γ -променями в дозі 500 Гр (^{60}Co) для запобігання поділу клітин. Культивування продуктів злиття здійснювали в рідкому живильному середовищі KM8p (Као et al., 1975) з додаванням антибіотиків (по 200 мг/л Str і Spm). Селекцію гібридних колоній проводили на основі їхньої здатності до біосинтезу хлорофілу на середовищі, що містить антибіотики.

Для індукції морфогенезу були використані середовища STC, PRM (Ratushnyak et al., 1989), модифіковане TM4 (Shahin et al., 1985) з 2,5 або 30 г/л цукрози. Регенеранти укорінювали на безгормональному середовищі MS з антибіотиками Str і Spm (по 200 мг/л кожного).

Визначення селективних концентрацій антибіотиків. Для визначення селективних концентрацій антибіотиків в культурі тканин *S. rickii* використовували одночасно 50, 100, 200 мг/л Spm і 50, 100, 200, 300 мг/л Str; *Lactuca sativa* та *Cichorium intybus* - 10, 25, 50, 100, 150 мг/л Km.

Генетичні конструкції, які були використані для трансформації. Для трансформації *S. rickii* була використана плазміда pCB033 (рис. 1), люб'язно надана проф. Н. Коор (Мюнхенський університет, Німеччина). Векторна конструкція містила ген *aadA* під контролем промотору 16S рДНК тютюну та термінатор гена *rbcL* (велика субодиниця РУБІСКО) із пластоми *Clamydomonas reinhardtii*.

Селективний ген *aadA* фланкований ділянками хлоропластної ДНК, які включали гени *rpl32* (рибосомальний білок) і *trnL* (тРНК лейцину) тютюнового пластоми, що мало забезпечувати вбудовування гена *aadA* у гомологічну ділянку хлоропластного геному.

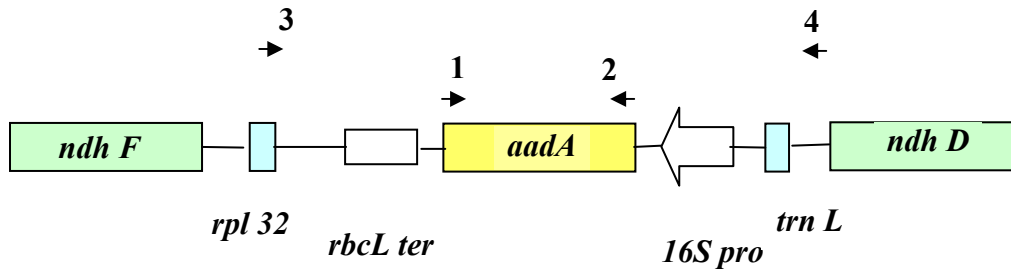


Рис. 1. Схема векторної конструкції, яка була використана для отримання транспластомних рослин *S. rickii*.

При створенні векторних конструкцій pCB063, pCB064, (рис. 2, а, б) для агробактеріальної трансформації *L. sativa* був використаний бінарний вектор, що містить ген *nptII* з регуляторними послідовностями NOS промотору і термінатору. У ділянку Т-ДНК під контролем 35S промотору і OCS термінатору клоновані структурні послідовності генів *esxA* та *esxA-fbpBΔTMD*, що кодують синтез туберкульозних антигенів відповідно ESAT6 (плазмідна pCB063) та ESAT6:Ag85B(-ТМД) (плазмідна pCB064).

Конструкція pCB124 (рис. 2, в) містила селективний ген *nptII*, цільовий ген синтезу інтерферону-α2b, злитий з лідерною послідовністю, що забезпечує транспорт цільового білку в апопласт.

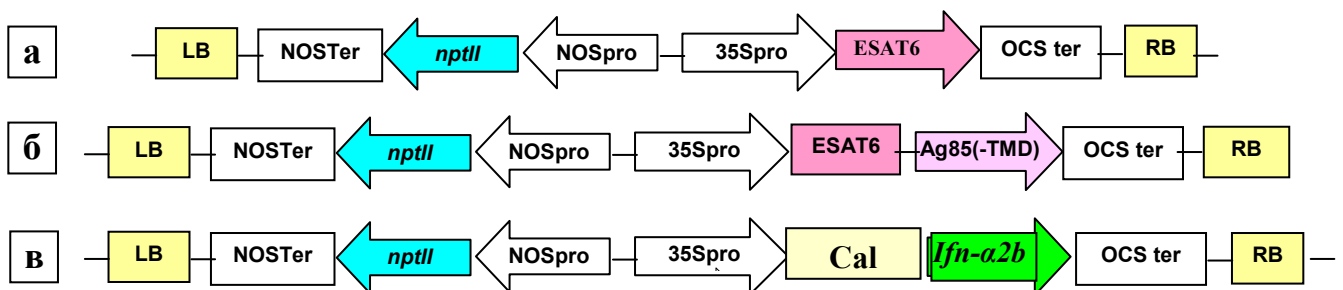


Рис. 2. Схеми Т-ДНК векторів: а - pCB063, б - pCB064, в – pCB124; LB, RB – ліва і права границі Т-ДНК; *nptII* – ген *nptII* (NOS промотор і термінатор); ESAT6 і ESAT6:Ag85B(-TMD) – цільові гени *esxA* та *esxA-fbpBΔTMD*, що кодують синтез туберкульозних антигенів ESAT6 і ESAT6:Ag85B(-TMD) (35S промотор і OCS термінатор), *Ifn-α2b* – ген інтерферону- α2b (35S промотор і OCS термінатор), *cal* – лідерна послідовність

Генетична трансформація *Solanum rickii*. Транспластомні рослини *S. rickii* було створено з використанням методу біолістичної трансформації, як описано в роботі (Матвеева *и др.*, 2005). Після бомбардування експланти переносили на середовище для калусоутворення з додаванням селективних концентрацій антибіотиків Spm 100 мг/л та Str 200 мг/л.

Генетична трансформація салату *Lactuca sativa*. Для трансформації використовували *A. tumefaciens* (штам GV3101) з векторними конструкціями

pCB063, pCB064. Трансформацію сім'ядольних листків проводили за методикою, описаною в роботі (Матвеева и др., 2009).

Для регенерації рослин салату сім'ядольні листки культивували послідовно на середовищах S-1 та S-3 (Матвеева и др., 2009) з додаванням 25 мг/л Km і 500 мг/л цефотаксиму (Cef). Пагони, що утворилися, укорінювали на середовищі S-4 (Матвеева и др., 2009) з антибіотиками в тих самих концентраціях.

Генетична трансформація цикорію *Cichorium intybus*. Для трансформації сім'ядольних листків цикорію використовували *A. tumefaciens* (штам GV3101) з векторною конструкцією pCB124 та методику, описану раніше (Матвеева та ін., 2009).

Виділення плазмідної ДНК. Плазмідну ДНК pCB033 виділяли з *Escherichia coli*, використовуючи колонки QIAGEN-500 згідно з рекомендаціями фірми-виробника.

Виділення тотальної ДНК і аналіз трансформованих та гібридних рослин за допомогою полімеразної ланцюгової реакції. Тотальну рослинну ДНК для проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) виділяли відповідно до протоколу (Murray, 1980).

Інтеграцію трансгенів у геном рослин підтверджували ПЛР-аналізом сумарної рослинної ДНК. Проведення ПЛР (методика, розмір ампліфікованого фрагменту, температура реасоціації, час синтезу, кількість циклів, послідовності праймерів) здійснювали за методиками, описаними раніше (Матвеева и др., 2005а; 2005б; 2008; 2009; Матвеева та ін., 2009). Негативним контролем була ДНК з нетрансформованих рослин, позитивним контролем - ДНК відповідного плазмідного вектору, які були ампліфіковані з тими ж праймерами та за тих самих умов. Аналіз загальної ДНК гібридів проводили за допомогою одиночного праймера (tcc)x5. Хлоропластну та мітохондріальну ДНК аналізували дослідженням рестриктних спектрів ПЛР-ампліфікованих фрагментів *rps7-trnv* (хл-ДНК, *L. peruvianum* + (*S. rickii*), рестриктаза BglII), *atpH-atpI* (хл-ДНК, *S. tuberosum* + *S. rickii*, рестриктаза HaeIII), *ndhI* (мт-ДНК, *S. tuberosum* + *S. rickii*, рестриктаза AluI).

Виділення сумарної РНК та синтез першого ланцюга к-ДНК. Сумарну РНК виділяли за методикою Logemann *et al.* (1987). Матеріалом були листки асептичних і тепличних рослин. Концентрацію РНК вимірювали на спектрофотометрі. Попередньо оброблені ДНКазою I, вільною від РНКаз, препарати сумарної РНК використовували як матрицю для синтезу першого ланцюга кДНК (зворотних транскриптів). Синтез проводили за допомогою набору реактивів «Fermentas» за інструкцією фірми-виробника. Для кожної проби РНК проводили дві паралельні реакції - у присутності і у відсутності (негативний контроль) зворотної транскриптази.

Методи статистичної обробки. Для аналізу експериментальних даних застосовували стандартні методи статистичної обробки (Лакин, 1980).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Створення рослин родів *Solanum* та *Lycopersicon* з трансформованими хлоропластами. Трансформація хлоропластної ДНК є одним із пріоритетних

напрямків у сучасній генетичній інженерії рослин, що пов'язано з її перевагами перед трансформацією ядерної ДНК. Однак, досі існує обмежена кількість успішних робіт. Це пов'язано із залежністю результативності використовуваних методик від регенераційного потенціалу об'єкту трансформації. Подолати об'єктивні труднощі можна перенесенням трансформованих пластид до господарськи цінних рослин. Використовуючи цей шлях, ми створили транспластомні рослини *Solanum rickii* та здійснили перенесення трансформованих хлоропластів до соматичних гібридів *S. rickii* з *S. tuberosum* та *Lycopersicon peruvianum*.

Ініціювання регенерації з листових та стеблових експлантів рослин роду *Solanum*. Було протестовано 14 видів рослин роду *Solanum*. Для отримання прямої регенерації з листових експлантів використовували середовище MS, що містило БАП (№ № 2 та 3; 1 та 5 мг/л) та кінетин (№№ 4 та 5; 1 та 5 мг/л). Виявилось, що з 14 тестованих видів рослин тільки 7 утворювали пагони. Частота регенерації пагонів з експлантів різних видів значно відрізнялася. Максимальною вона була у *S. nigrum* та *S. rickii* і становила 92 та 91% відповідно. Регенерація рослин *S. rickii* спостерігалася при культивуванні на всіх досліджуваних середовищах, хоча її ефективність змінювалася від 42% на середовищі № 2 до 91% на середовищі № 5. Формування пагонів на експлантах таких видів як *S. schickii*, *S. knappei*, *S. simplicifolium*, *S. boergeri*, *S. microdontum*, *S. stoloniferum*, *S. verrucosum* не відбувалося.

Наступним кроком було розроблення протоколу індукції рослин з сегментів стебел та листків *S. rickii* через стадію утворення калюсних тканин, що є, на наш погляд, бажаною для поступової селекції рослин з трансформованою хлоропластною ДНК. Показано, що додавання 2 мг/л 2,4-D та 0,5 мг/л кінетину призводило протягом 4-14 діб до утворення на всіх стеблових експлантах калюсної тканини. В той же час, частота калюсоутворення при культивуванні листків на тому ж середовищі становила 72%. Через два тижні експланти переносили на середовище CIM (2 мг/л 2,4D та 0,5 мг/л зеатину), а потім послідовно на середовище STA з 0,1 мг/л НОК та 0,5 мг/л БАП та STC з 0,1 мг/л НОК, 1 мг/ зеатину і 1 мг/л ГК₃ (Матвеева и др., 2005), де відбувалася регенерація рослин з частотою 71% та 25% (відповідно стеблові та листові експланти).

Таким чином, за результатами тестування 14 видів рослин роду *Solanum* було виділено вид *S. rickii*, який виявив найкращу здатність до регенерації незалежно від наявності того чи іншого (кінетину або БАП) регулятора росту. Крім здатності до ефективної регенерації пагонів з листових експлантів, рослини цього виду мають такі корисні ознаки як природну стійкість до біотичних та абіотичних факторів. Саме тому *S. rickii* було обрано в якості об'єкту для подальших експериментів з генетичної трансформації.

Біолістична трансформація *Solanum rickii*. Була використана методика бомбардування вольфрамовими частинками, на які нанесено плазмідну ДНК з геном *aadA*. Для цього частини стебла розміром 5-10 мм поміщали на середовище MS з додаванням 2 мг/л 2,4-D і 0,5 мг/л кінетину на 4 доби до початку росту калюсної тканини. 20 чашок Петрі з сегментами стебел (5-6 на кожній) піддали бомбардуванню, після чого експланти культивували за оптимізованою методикою (Матвеева и др., 2005) на селективних середовищах CIM, STA та STC. Відбір

трансгенних клонів проводили за ознакою позеленіння на середовищі з двома антибіотиками. Через 2 місяці культивування були виділені дві зони калюсу, що мали блідо-зелене забарвлення. Таким чином, з 20 подій бомбардування було отримано 2 зелених калюсних клони. Така частота трансформації (1 лінія на 10 подій трансформації) є досить високою. Так, в дослідженні Sidorov et al. (1999) з 46 бомбардувань отримано тільки 3 лінії, стійкі до двох антибіотиків, тобто, частота становила близько 1 лінії на 15 бомбардувань. В експерименті Zubko et al. (2004) частота трансформації становила 1 трансформовану лінію на 10 бомбардувань.

Протягом 8 місяців із зелених клонів було отримано 58 рослин, з яких 53 мали зелене забарвлення (рис. 3, а). Для підтвердження трансгенної природи проведено ПЛР аналіз 16 регенерованих рослин. Утворення фрагментів ДНК очікуваної довжини (523 п.н.) свідчило про наявність гена *aadA* в усіх досліджуваних рослинах (рис. 3, б).

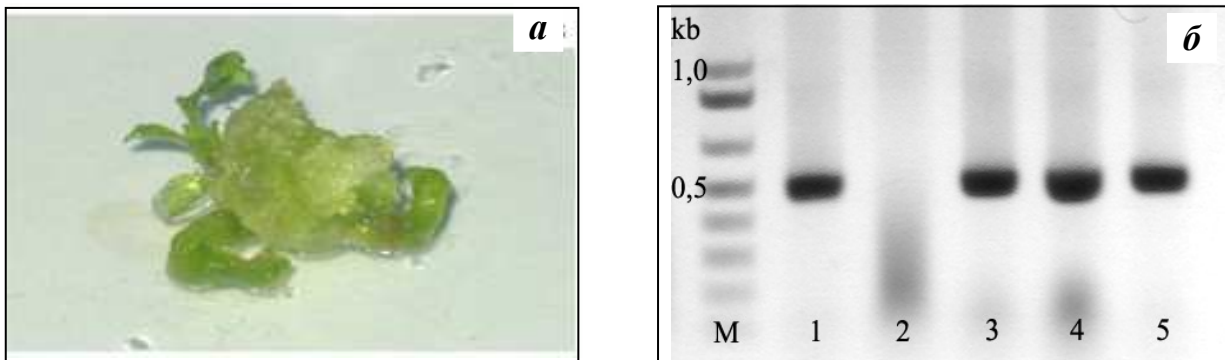


Рис. 3. Регенерація трансформованих рослин *S. rickii* (а) та ПЛР-аналіз сумарної ДНК (б): М – маркер; 1 – плазмідна ДНК; 2 – негативний контроль; 3 – 5 – трансформовані рослини

Оскільки розміри ділянок *rpl32-trnL* хл-ДНК тютюну та *S. rickii* не співпадають (рис. 4, а), для визначення місця вбудовування гена *aadA* запропонована подвійна ампліфікація (рис. 4, б) із застосуванням праймерів 3-4 і 1-2, які відмічені на рис.1.

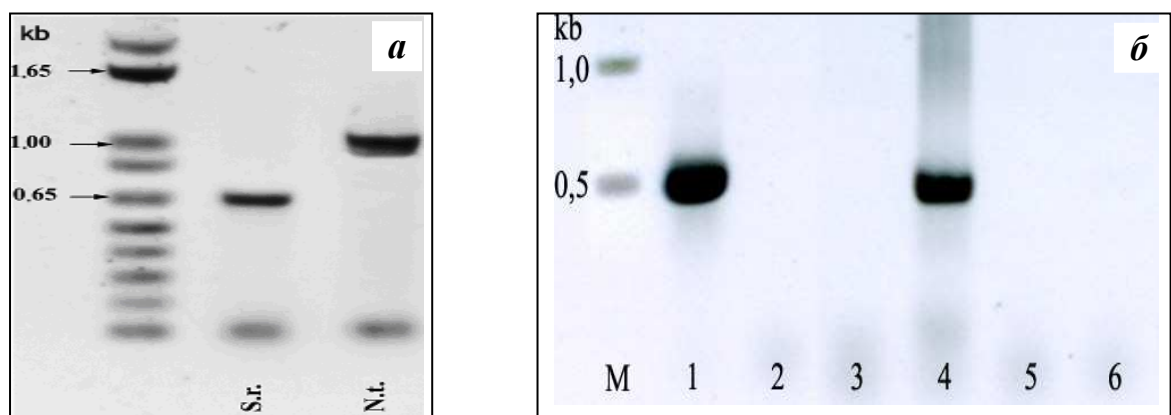


Рис. 4. Ампліфікація ділянки *rpl32-trnL* хлоропластної ДНК *S. rickii* і *N. tabacum* (а) та ПЛР-аналіз подвійної ампліфікації сумарної ДНК (б): М – маркер; 1 - плазмідна ДНК; 2 - (-ДНК); 3, 4- подвійна ампліфікація (праймери 3-4, 1-2); 5, 6 – ампліфікація праймерами 1-2 аліквоти еквівалентного розведення ДНК без ампліфікації праймерами 3-4 (3, 5 – нетрансформована рослина; 4, 6 – трансформант)

Після першої ампліфікації вихідної ДНК із праймерами 3-4 1мкл реакційної суміші використано для повторної ПЛР із праймерами 1-2. Контроль - аліквота (1 мкл) еквівалентного розведення без ампліфікації. Поява сигналу на ген *aadA* після повторної ампліфікації (рис.4б, лінія 4) і відсутність сигналу в контролі (рис. 4б, лінія 6) вказує на наявність послідовності гена *aadA* на ділянці хл-ДНК, що фланкується праймерами 3 і 4. Отже, інтеграція гена відбулася в прогнозованому сайті хл-ДНК поблизу генів *rpl32* і *trnL* (Матвеева и др., 2005 а).

Таким чином, продемонстровано можливість застосування методу біолістичної трансформації для отримання транспластомних рослин *S. rickii*. Показано, що використання одночасно двох антибіотиків дозволяє ефективно проводити селекцію трансформантів та уникати появи спонтанних мутантів, що підтверджено результатами ПЛР аналізу 16 регенерованих рослин.

Отримання гібридних рослин *Lycopersicon peruvianum*+(*S. rickii*) з трансформованою хлоропластною ДНК. Для перенесення трансформованих хлоропластів *S. rickii* до гібридів *L. peruvianum* + (*S. rickii*) було застосовано метод γ -злиття мезофільних протопластів (рис. 5). Однією з проблем, що постає при соматичній гібридизації рослин, є застосування системи селекції гібридних клонів, оптимальної для кожного конкретного епізоду. Нами було використано хлорофілдефектний мутант *L. peruvianum* (реципієнт), інактивацію ядра *S. rickii* (донора) шляхом γ -опромінення та генетичний маркер в хлоропластах (ген *aadA* у *S. rickii*). Злиття проводили відповідно до методики (Menczel et al., 1981) з модифікаціями. Продукти злиття культивували на середовищі KM8P.

Синтез клітинної оболонки спостерігали через 2-3 доби, перший поділ клітин - через 5-6 діб. Ефективність висіву протопластів, що визначали за відношенням кількості мікроколоній через два тижні до загальної кількості клітин у відсотках, дорівнювала 15%. Через 2 тижні до культурального середовища додавали по 200 мг/л Str і Spm. Добір цибридів з трансформованими пластидами проводили за ознакою росту зелених колоній на середовищі, що містить стрептоміцин і спектиноміцин (Матвеева и др., 2005 б).

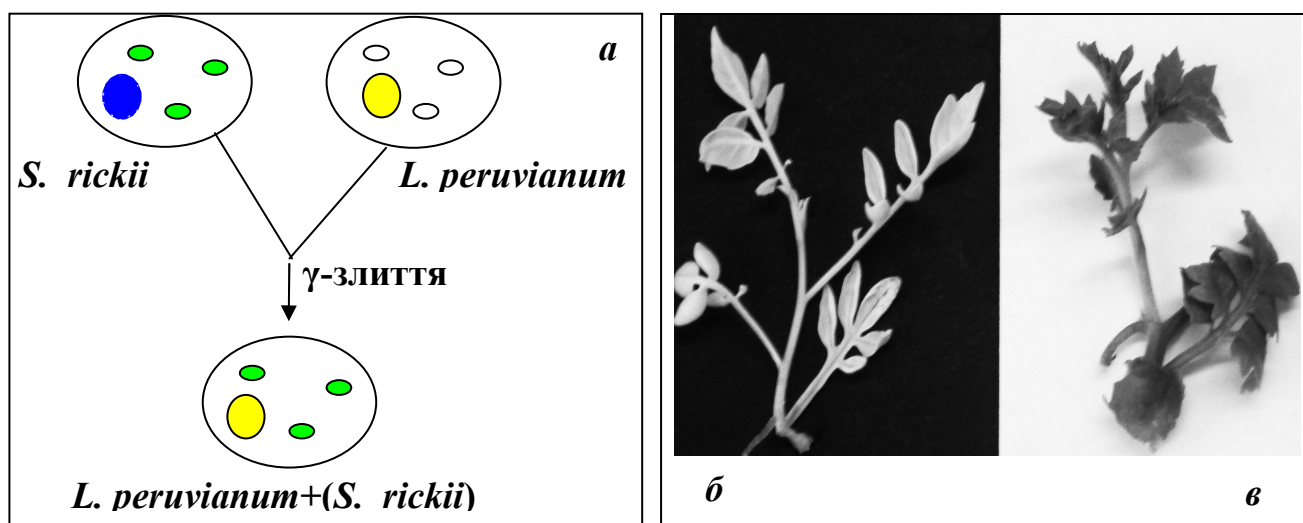


Рис. 5. Схема злиття (а) протопластів з рослин *L. peruvianum* (б) і *S. rickii* (в)

Регеноеровано більше ста зелених рослин (рис. 6, *a*). Для виявлення присутності гена *aadA* аналізовано 8 протоклонів та 8 рослин, що з них регеноеровано. Всі об'єкти мали селективний ген (рис. 6 *б*, лінія 2 – негативний контроль). При дослідженні генома гібридів за допомогою одиночного праймера (tcc)x5 була показана подібність ДНК гібридних калюсних клонів та рослин з ДНК *L. peruvianum* (рис. 6, *в*). Аналіз рестриктних спектрів ампліфікованого фрагменту *rps7-trnv* хлоропластного генома підтвердив наявність у них пластома *S. rickii* (рис. 6, *г*).

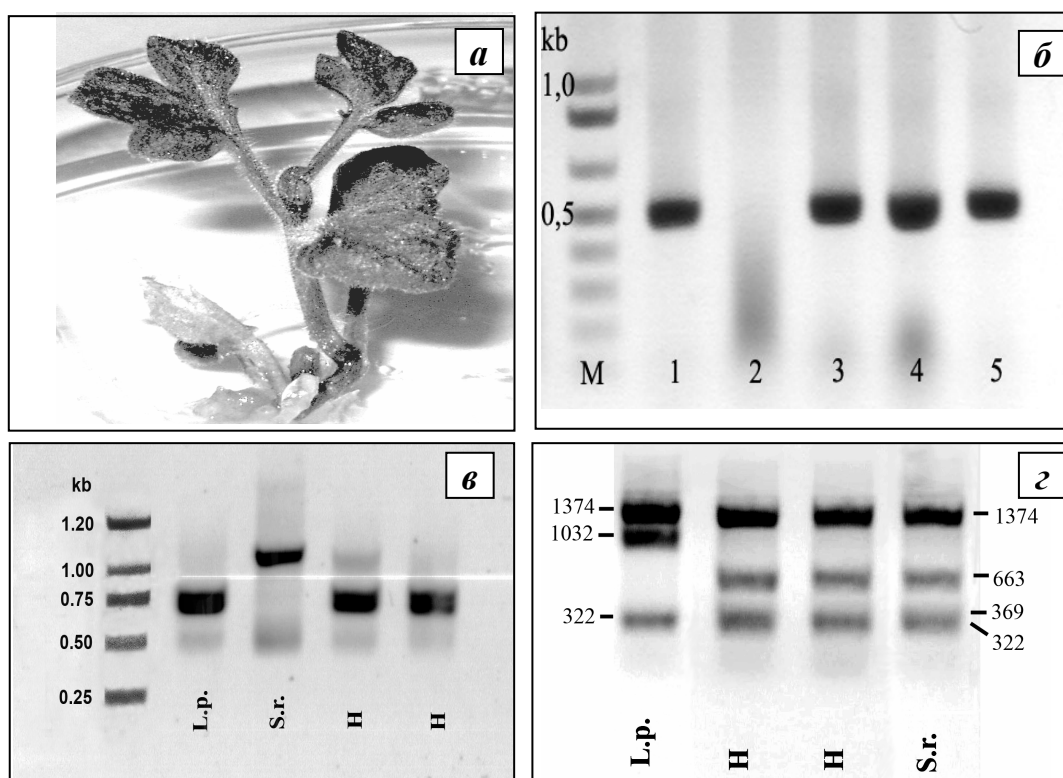


Рис. 6. Гібридна рослина *L. peruvianum* + (*S. rickii*) (*a*) та аналіз гібридів: наявність гена *aadA* (*б*); AFLP-аналіз загальної ДНК (*в*); аналіз рестриктних спектрів ПЛР-ампліфікованого фрагменту *rps7-trnv* хлоропластного генома (*г*)

Таким чином, показано принципову можливість створення рослин роду *Lycopersicon* з чужорідним геном шляхом соматичної гібридизації з транспластними рослинами. Шляхом перенесення хлоропластів *S. rickii* та отримання гібридних рослин, що залишалися зеленими на селективному середовищі зі спектиноміцином та стрептоміцином, було підтверджено хлоропластну природу здійсненої нами раніше трансформації рослин *S. rickii*. Одночасне використання хлорофілдефектного мутанту *L. peruvianum* та селективного маркерного гена в хлоропластах *S. rickii* дозволило відібрати рослини, що мали саме трансформовані хлоропласти *S. rickii*. В той же час, опромінення донора хлоропластів та використання для регенерації рослин поживного середовища, сприятливого для росту *L. peruvianum*, дозволило відібрати рослини з ядерним матеріалом реципієнта. Оскільки в результаті було отримано гібридні рослини з трансформованою хлоропластною ДНК, запропоновану схему відбору можна вважати ефективною.

Перенесення трансформованих пластид *Solanum rickii* в гібридні рослини *S. tuberosum* + *S. rickii*. Перенесення трансформованих хлоропластів від дикого виду *S. rickii* до картоплі було здійснено шляхом соматичної гібридизації мезофільних протопластів (рис.7). Рослини картоплі двох сортів - Лугівський і Слов'янка - містили в ядерній ДНК ген *nptII*, *S. rickii* – ген *aadA* в хлоропластах. Передбачалося, що одночасне додавання до селекційного середовища трьох антибіотиків (Km, Str, Sp) дозволить відселектувати гібридні рослини, що отримали ядерну ДНК від одного з батьків (*S. tuberosum*) та хлоропласти від іншого (*S. rickii*).

Виділення протопластів та соматичну гібридизацію здійснювали як описано нами в роботі (Матвеева и др., 2008). Через 2-3 доби відбувався синтез клітинної оболонки. Перші поділи спостерігали через 5-6 діб. Введення антибіотиків у середовище не пізніше ніж через 14 діб після злиття приводило до істотного збільшення кількості зелених рослин, що регенерували. В чотирьох експериментах після злиття на середовищі STA було відібрано 1001 зелена мікроколонія, з них на селективному середовищі STC отримано 252 зелені рослини. Вони мали нормальну морфологію та укорінювалися на середовищі з антибіотиками.

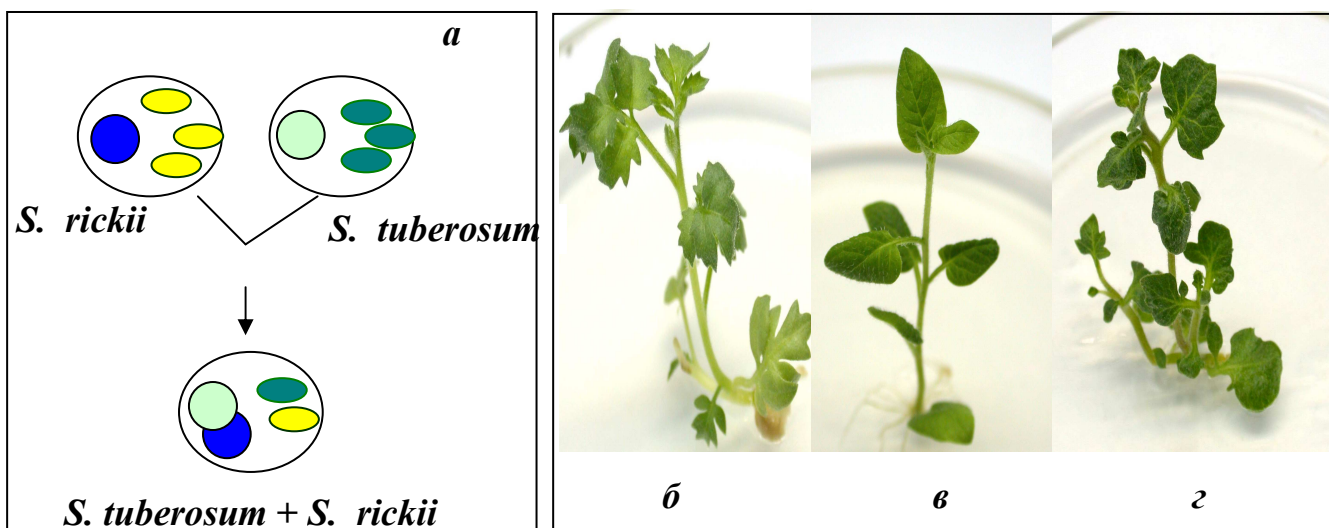


Рис. 7. Схема злиття (а) протопластів з рослин *S. rickii* (б), *S. tuberosum* (в) та їх соматичний гібрид (г)

Аналіз 33 зелених рослин показав, що вони мали як ген *aadA*, так і ген *nptII* (рис.8 а), крім однієї рослини, що мала тільки ген *aadA*. Геном 17 гібридів вивчали за допомогою одиночного праймера (tcc)x5. Було показано, що 16 рослин мали послідовності ДНК, характерні як для *S. rickii*, так і для *S. tuberosum*. Походження пластомного генома 17 рослин визначали за допомогою рестриктного аналізу ділянки хлоропластної ДНК між генами *atpH* і *atpI*. Показано, що 16 з них мали послідовності хлоропластної ДНК обох батьків (рис.8 б). При дослідженні мітохондріального гена *ndhI* виявилося, що його рестриктний спектр відповідав або *S. rickii*, або *S. tuberosum*. Це свідчить про те, що успадкування мітохондрій у гібридів відбувалося випадково.

Таким чином, після злиття мезофільних протопластів транспластомних рослин *S. rickii* і трансгенних *S. tuberosum* було отримано соматичні гібриди з

послідовностями ядерної і хлоропластної ДНК обох батьків. Наявність у гібридних рослин гену *aadA* свідчить про перенесення хлоропластів з трансформованою ДНК в гібриди *S. tuberosum* + *S. rickii*.

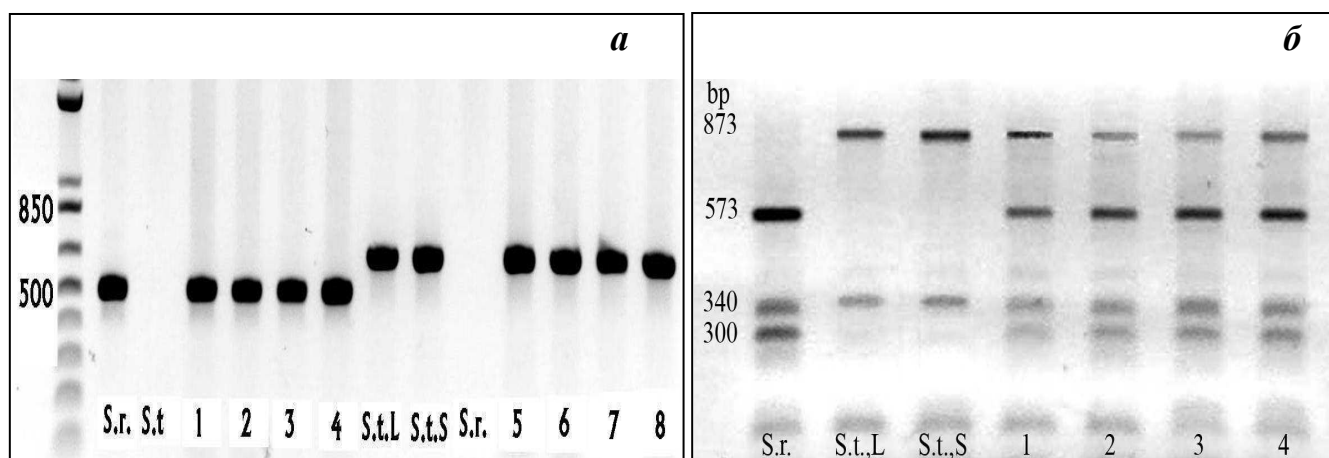


Рис. 8. Аналіз гібридів *S. tuberosum* + *S. rickii*: **a** – присутність генів *aadA* (1-4) і *nptII* (5-8); **б** – *NaelIII* гідроліз ампліфікованого фрагменту *atpH-atpI* хлоропластної ДНК (1-4 – гібридні рослини)

Генетична трансформація салату *Lactuca sativa*. Оскільки відомою є сортозалежність частоти регенерації рослин, нами було здійснено скрінінг 8 сортів салату. Показано, що на середовищі S1 з макро- та мікроелементами MS, 3 мг/л кінетину та 0,5 мг/л НОК спостерігалася висока частота регенерації пагонів для більшості сортів: для сорту Єралаш 95%, Гренада - 96%, Рубінове мереживо - 98%, Сніжинка - 80%, Ред корал - 82 %, Грін корал - 80%, Єва -20%, Майська королева - 5% (Матвеева и др., 2009). Було виявлено, що найвищий регенераційний потенціал мали проксимальні частини сім'ядольних листків салату незалежно від сорту. При їх культивуванні на середовищі S1 пряма регенерація рослин починалася через 7-8 діб. Утворювалося 10-15 пагонів на експлант розміром 3x5мм, в той час як на дистальній та середній частинах листків в цей термін пагони не утворювалися.

Для трансформації салату-латуку *L. sativa* сортів Єралаш, Рубінове мереживо та Сніжинка було використано конструкції pCB063 та pCB064 з генами *esxA* та *esxA-fbpBATMD*, що кодують туберкульозні антигени ESAT6 і ESAT6:Ag85B(-TMD). Після кокультивування з бактерією експланти переносили на середовище S-1 з 25 мг/л Km для селекції трансформованих клонів та 500 мг/л Cef для елімінації бактерій. Завдяки високій регенераційній здатності сорту Єралаш частота трансформації експлантів (відношення кількості експлантів із зеленими на селективному середовищі пагонами до загальної кількості експлантів) склала 62% при використанні конструкції pCB063 і 44% для конструкції pCB064. Для сортів Рубінове мереживо та Сніжинка (pCB064) ці показники становили відповідно 32 % і 18 %. Таким чином, частота трансформації експлантів різних сортів дещо відрізнялася. На нашу думку, це пов'язано з сортовою відмінністю в регенерації рослин. В результаті селекції було отримано більше 100 зелених рослин трьох сортів (рис. 9, а). Аналіз 11 рослин сорту Єралаш (pCB063 та pCB064), 6 рослин сорту Рубінове мереживо (pCB064), 4 рослин сорту Сніжинка

(pCB064) виявив присутність як *nptII*, так і цільових генів *esxA* та *esxA-fbpBATMD* у всіх рослин крім одної (рис. 9, б).

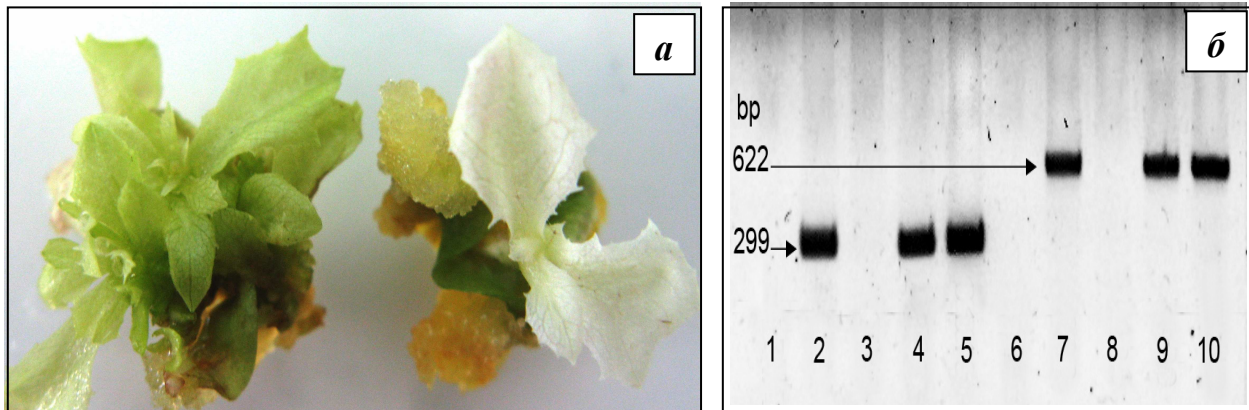


Рис. 9. Селекція (а) та ПЛР-аналіз (б) наявності гена синтезу білку ESAT6 (1-5) та *nptII* (6-10) в трансгенних рослинах салату: 1, 6 – негативний контроль; 2, 7 – плазмідна ДНК; 3, 8 – нетрансформовані; 4-5, 9-10 – трансформовані рослини

Для з'ясування питання щодо експресії гена *nptII* на рівні транскрипції в рослинах сортів Сніжинка (3 зразки), Єралаш (2 зразки) та Рубінове мереживо (2 зразки) проводили полімеразну ланцюгову реакцію, поєднану зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР) (рис.10).

Аналіз наявності мРНК виявив, що транскрипція гена *nptII* здійснювалася у всіх аналізованих рослинах незалежно від сорту та використовуваної для трансформації конструкції (рис.10, лінії 3, 9). У той же час ген *esxA* транскрибувався не у всіх випадках. Виявлено мовчання генів - хоча в геномній ДНК ген білка-антигена ESAT6 був присутній (рис.10, лінії 7, 13), його зворотні транскрипти не завжди детектувались (рис.10, лінії 5, 11). Аналіз успадкування селективного гена *nptII* виявив відсутність розщеплення за цією ознакою в рослинах T_1 та T_2 поколінь. Рослини T_1 та T_2 мали як селективний, так і цільовий гени.

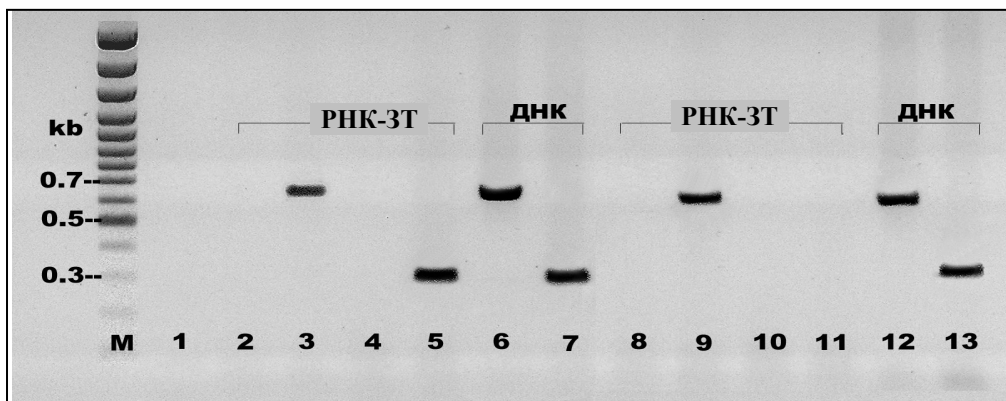


Рис. 10. Аналіз зворотних транскриптів (РНК-ЗТ, 2-5, 8-11) і геномної ДНК (ДНК, 6-7, 12-13) трансформованих рослин салату: М – маркер; 1 – ДНК нетрансформованої рослини; 2-13 – трансформовані рослини: 6, 12 - ген *nptII*; 7, 13 - ген *esxA*; 3, 9 – зворотні транскрипти гена *nptII*; 5, 11 - зворотні транскрипти гена *esxA*; 2, 4, 8, 10 – відсутність синтезу зворотних транскриптів у відсутності ревертази

Таким чином, методом агробактеріальної трансформації з високою частотою створено генетично модифіковані рослини салату трьох сортів з генами бактеріальних антигенів ESAT6 та ESAT6:Ag85B(-ТМД). Показано, що в цих рослинах можлива як наявність, так і відсутність транскрипції цільового гена за стабільної транскрипції селективного гена. Трансгени успадковувалися та детектувалися у рослин наступних поколінь (T_1 та T_2). Салат як об'єкт з високим регенераційним потенціалом може бути використаний для створення генетично модифікованих рослин (їстівних вакцин).

Генетична трансформація цикорію *Cichorium intybus*. Цикорій є відносно новим об'єктом генетичної інженерії. Інтерес до цієї рослини викликаний її природними лікарськими властивостями. Цикорій є антигепатотоксичним, противиразковим, протизапальним, кардіотонічним, діуретичним засобом та застосовується при лікуванні діабету, СНІДу, пухлин, тахікардії та інших хвороб. На основі цикорію створено ряд лікарських препаратів. Крім того, як показали наші дослідження, листові експланти цикорію мають високу здатність до регенерації (Матвеева та ін., 2009). Отже, становить інтерес використання цієї рослини як об'єкта трансформації, зокрема, для створення їстівних вакцин.

Регенераційну здатність цикорію вивчали, культивуючи листові експланти на середовищах з різним вмістом макроелементів та фітогормонів, як описано в роботі (Матвеева та ін., 2009). При культивуванні експлантів утворення пагонів спостерігалось уже через 10-15 діб. Показано, що оптимальною умовою є наявність макроелементів середовища MS (рис.11).

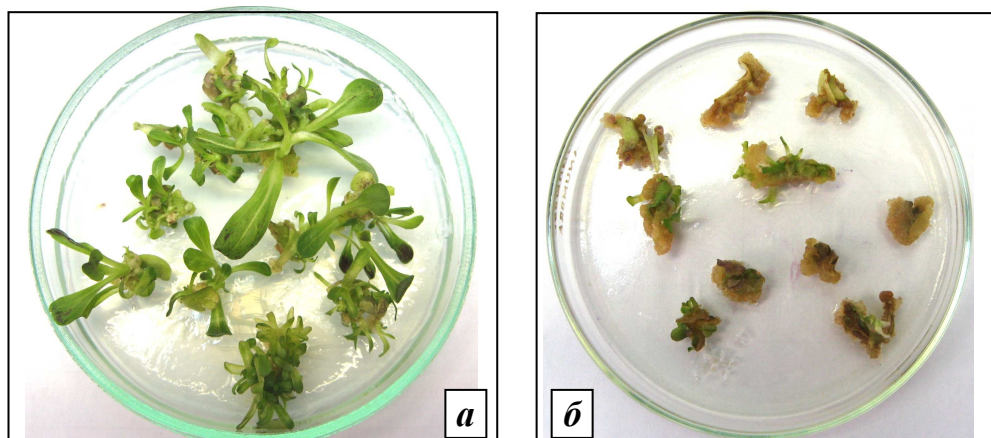


Рис. 11. Вплив мінерального складу середовища з 0,5 мг/л кінетину та 0,5 мг/л α -нафтилоцтової кислоти на регенерацію рослин цикорію: **a** - MS, **b** - B₅

Частота регенерації пагонів на цих середовищах коливалася в межах 60 -100%, в той час як при наявності макроелементів за B₅ цей показник дорівнював 0 - 50%. При порівнянні впливу фітогормонів на процес регенерації пагонів встановлено, що використання кінетину дає можливість отримати значно більшу кількість регенованих рослин. Зокрема, частота регенерації на середовищі № 2 (MS, 0,5 мг/л кінетину) перевищувала таку для середовища № 4 (MS, 0,5 мг/л БАП) та становила 100 та 70 % відповідно. Збільшення концентрації цитокінінів (як кінетину, так і БАП) з 0,5 до 2,5 мг/л не призводило до суттєвого збільшення частоти регенерації.

Для трансформації використовували *A. tumefaciens* (штам GV3101) з вектором pCB124 (селективний ген *nptII*, цільовий ген інтерферону- $\alpha 2b$). Трансформацію цикорію проводили за методикою, описаною в роботі (Матвеєва та ін., 2009). Відбір трансформованих клонів здійснювали при концентрації канаміцину 25 мг/л. На середовищі MS з 2,5 мг/л кін, 0,5 мг/л НОК, 25 мг/л Km та 600 мг/л Cef уже через 7-14 діб спостерігали початок утворення пагонів.

Частота трансформації експлантів становила 26,9%. Очевидно, досить високий показник пов'язаний з високою регенераційною здатністю рослин цього сорту (до 100 %). В ході селекції експлантів на середовищі з Km білі рослини були відсутні.

Аналіз тотальної ДНК восьми регеноерованих рослин показав присутність у всіх як селективного гена *nptII*, так і цільового гена *ifn- $\alpha 2b$* (рис. 12).

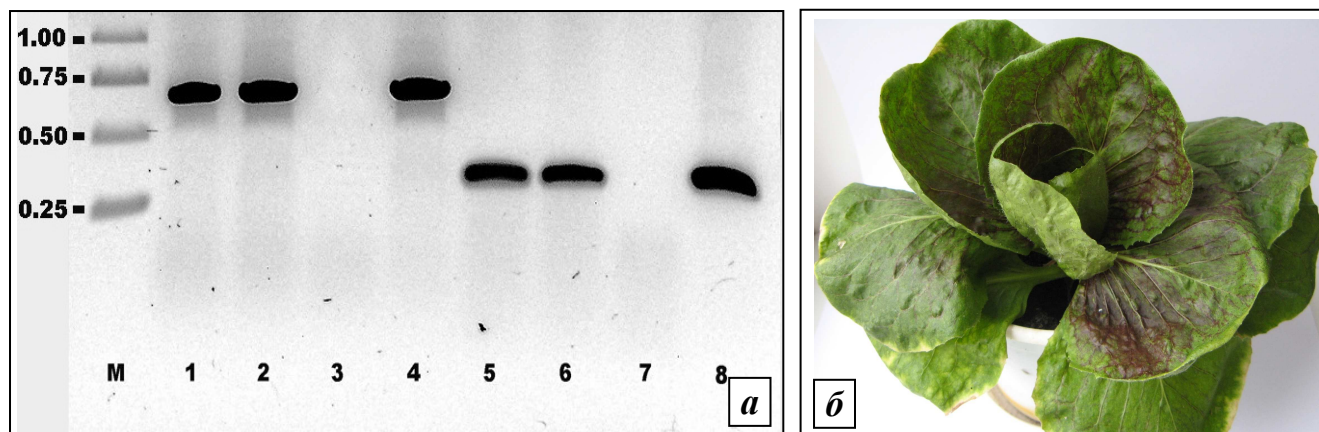


Рис. 12. ПЛР-аналіз тотальної ДНК (а) рослин цикорію (б) на присутність генів *nptII* (1, 2) та *ifn- $\alpha 2b$* (5, 6); 3, 7– негативний контроль; 4, 8 – плазмідна ДНК

Таким чином, було визначено частоту регенерації цикорію сорту “Пала росса”, яка становила до 100%. Показано, що найкращим середовищем для регенерації рослин з сім’ядольних та справжніх листків є таке, що містить макроелементи MS з 0,5–2,5 мг/л кінетину. Після агробактеріальної трансформації конструкцією pCB124 отримано генетично модифіковані рослини з частотою трансформації експлантів 26,9%. За результатами аналізу тотальної ДНК регеноеровані рослини містили як селективний *nptII*, так і цільовий *ifn- $\alpha 2b$* гени. Застосована методика трансформації може бути використана для отримання трансгенних рослин цикорію.

ВИСНОВКИ

1. За допомогою методів клітинної та генетичної інженерії отримані трансгенні і транспластомні рослини родин Compositae та Solanaceae (*Solanum rickii*, *Solanum tuberosum*, *Lycopersicon peruvianum*, *Lactuca sativa*, *Cichorium intybus*), які мають як маркерні гени, так і гени, що кодують білки фармацевтичного призначення.
2. Метод білістичної трансформації був застосований для конструювання транспластомних рослин *S. rickii* з частотою трансформації 1 подія на 10 бомбардувань. Використання одночасно двох антибіотиків, спектиноміцину та

- стрептоміцину, дозволяє ефективно проводити селекцію трансформантів та уникати появи спонтанних мутантів.
3. Шляхом соматичної гібридизації можна здійснювати спрямоване перенесення хлоропластів з трансформованою ДНК до рослин родів *Lycopersicon* та *Solanum*. Таким методом вперше було отримано гібридні рослини *L. peruvianum* + (*S. rickii*) та *S. tuberosum* + *S. rickii* з трансформованим пластомом.
 4. З використанням *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації створено трансгенні рослини цикорію *Cichorium intybus* з цільовим геном *ifn-α2b*, що кодує синтез інтерферону, з частотою трансформації експлантів 26,9 %.
 5. Існує сортозалежність частоти регенерації рослин *Lactuca sativa* з гіпокотилів, що показано на прикладі тестування 8 сортів салату. Частота регенерації рослин з сім'ядольних листків 10-денних проростків салату коливалася від 98% для сорту "Рубінове мереживо" до 5% для сорту "Майская королева".
 6. Методом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації отримано рослини салату *Lactuca sativa* сортів Єралаш, Рубінове мереживо та Сніжинка з генами, що кодують синтез туберкульозних антигенів ESAT6 та ESAT6:Ag85B(-ТМД) з частотою трансформації від 18% (Сніжинка) до 62% (Єралаш).
 7. За допомогою аналізу присутності м-РНК перенесених генів показано, що при стабільній транскрипції селективного гена можлива як наявність, так і відсутність м-РНК цільового гена.
 8. В поколіннях T₁ і T₂ генетично модифікованих рослин салату-латуку зберігається як селективний *nptII*, так і цільові гени, що кодують білки ESAT6 і ESAT6:Ag85B(-ТМД), та відсутнє розщеплення за ознакою стійкості до канаміцину.

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Матвеева Н.А. Генетическая трансформация хлоропластной ДНК *Solanum rickii* / Н.А. Матвеева, А.М.Шаховский, Н.В. Кучук // Цитология и генетика. – 2005. – Т. 39, № 5. - С. 3-8. *Особистий внесок здобувача: оптимізовано методику трансформації та регенерації рослин Solanum rickii, отримано транспластомні рослини, проведено їх аналіз, написано текст статті.*
2. Регенерация цибридных растений *Lycopersicon peruvianum* x (*Solanum rickii*) с трансформированными хлоропластами / Н.А. Матвеева, В.П.Момот, А.М.Шаховский, Н.В. Кучук // Цитология и генетика. – 2005. – Т. 39, № 6. - С. 3 – 8. *Особистий внесок здобувача: оптимізовано методику виділення і культивування протопластів, регенерації гібридних рослин, отримано та аналізовано трансгенні рослини, написано текст статті.*
3. Матвеева Н.А. Соматические гибриды между трансгенными растениями картофеля *Solanum tuberosum* и транспластомными растениями *Solanum rickii* / Н.А. Матвеева, А.М. Шаховський, Н.В. Кучук // Цитология и генетика. - 2008. – Т. 42, № 4. - С. 38 - 44. *Особистий внесок здобувача: оптимізовано методику виділення і*

культивування протопластів, регенерації гібридних рослин, отримано та аналізовано трансгенні рослини, написано текст статті.

4. Агробактериальная трансформация салата (*Lactuca sativa* L.) конструкциями, несущими гены бактериальных антигенов из *Mycobacterium tuberculosis* / Н.А. Матвеева, М.Ю. Василенко, А.М. Шаховский, Н.В. Кучук // Цитология и генетика. – 2009. – Т. 43, № 2. – С. 27 – 32. *Особистий внесок здобувача: розроблено методику регенерації рослин Lactuca sativa з листових експлантів, агробактеріальної трансформації салату, отримано трансгенні рослини, проведено аналіз успадкування трангенів, написано текст статті.*

5. Перенесення гена біосинтезу інтерферону- $\alpha 2b$ в рослини цикорію (*Cichorium intybus* L.) методом агробактеріальної трансформації / Н.А. Матвеева, А.М. Шаховський, І. М. Герасименко, О. Ю. Кваско, М.В. Кучук // Біополімери і клітина. – 2009. – Т.25, №2. – С. 120 - 125. *Особистий внесок здобувача: розроблено методику регенерації рослин цикорію, проведено трансформацію, отримано та аналізовано трансгенні рослини, написано текст статті.*

6. Соматическая гибридизация как способ получения трансгенных растений семейства *Solanaceae* / Н.А.Матвеева, В.П.Момот, А.М.Шаховский, Н.В. Кучук // 3б. наукових праць “Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології”. - Київ, 2007. - Т. 2. - С. 532 - 536. *Особистий внесок здобувача: оптимізовано методику виділення і культивування протопластів, регенерації гібридних рослин, отримано та аналізовано трансгенні рослини, написано текст статті.*

7. Матвеева Н.А. Получение трансформированных гибридных растений *Solanum tuberosum* x *Solanum rickii* / Н.А. Матвеева, А.М. Шаховский, Н.В. Кучук // «Алелопатія та сучасна біологія»: Міжнародна наукова конференція, присвячена 80-річчю з дня народження академіка А.М.Гродзинського, Київ, 17-19 жовтня 2006 р. - Київ, 2006. - С. 238 - 239. *Особистий внесок здобувача: оптимізовано методику виділення і культивування протопластів, регенерації гібридних рослин, отримано та аналізовано трансгенні рослини, написано текст тез.*

8. Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Agrobacterium transformation mediated by *Mycobacterium tuberculosis* genes ESAT6 and Ag85 / N.A. Matvieieva, M.Y. Vasylenko, A.M. Shahovsky, N.V. Kuchuk // “Биология клеток растений in vitro и биотехнология”: IX Международная конференция, Звенигород, 8-12 сентября 2008 г. – Москва, 2008. – С. 244-245. *Особистий внесок здобувача: розроблено методику регенерації рослин салату, агробактеріальної трансформації салату, отримано трансгенні рослини, проведено аналіз успадкування трангенів, написано текст тез.*

9. Трансгенные растения салата и цикория с генами бактериальных антигенов из *Mycobacterium tuberculosis* / Н.А. Матвеева, М.Ю. Василенко, А.М. Шаховский, Н.В. Кучук // “Біотехнологія. Наука. Освіта. Практика.”: IV Міжнародна науково-практична конференція, Дніпропетровськ, 11-13 листопада 2008 р. – Дніпропетровськ, 2008. - С.167-168. *Особистий внесок здобувача: розроблено методику регенерації рослин та агробактеріальної трансформації салату, отримано та аналізовано трансгенні рослини, написано текст тез.*

АНОТАЦІЯ

Матвєєва Н.А. Створення генетично модифікованих рослин родин Compositae та Solanaceae. - Рукопис.

Дисертація на здобуття вченого ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. - Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Київ, 2009.

В дисертаційній роботі за допомогою методів клітинної та генетичної інженерії отримані трансгенні і транспластомні рослини родин Compositae та Solanaceae (*Solanum rickii*, *Solanum tuberosum*, *Lycopersicon peruvianum*, *Lactuca sativa*, *Cichorium intybus*), які мають як маркерні гени, так і гени, що кодують білки фармацевтичного призначення.

Методом біолістичної трансформації отримано транспластомні рослини *S. rickii*. Шляхом соматичної гібридизації здійснено спрямоване перенесення хлоропластів з трансформованою ДНК до рослин родів *Lycopersicon* та *Solanum* та вперше отримано гібридні рослини *L. peruvianum* + (*S. rickii*) та *S. tuberosum* + *S. rickii* з трансформованим пластомом.

Отримано рослини салату *Lactuca sativa* сортів Єралаш, Рубінове мереживо та Сніжинка з генами туберкульозних антигенів ESAT6 та ESAT6:Ag85B(-ТМД) з частотою агробактеріальної трансформації експлантів від 18% (Сніжинка) до 62% (Єралаш). В поколіннях T₁ і T₂ рослин салату-латуку зберігаються як селективний, так і цільові гени, та відсутнє розщеплення за ознакою стійкості до канаміцину. При стабільній транскрипції селективного гена можлива як наявність, так і відсутність транскрипції цільового гена. Методом агробактеріальної трансформації створено трансгенні рослини цикорію *Cichorium intybus* сорту Пала росса з цільовим геном *ifn-α2b*, що кодує синтез інтерферону, з частотою трансформації експлантів 26,9%. Показано присутність в регеноерованих рослинах цільового та селективного генів.

Ключові слова: *Lactuca sativa*, *Cichorium intybus*, *Solanum rickii*, *Solanum tuberosum*, *Lycopersicon peruvianum*, біолістична трансформація, агробактеріальна трансформація, соматична гібридизація.

АННОТАЦИЯ

Матвеева Н.А. Создание генетически модифицированных растений семейств Compositae и Solanaceae. - Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.20 – биотехнология. - Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев, 2009.

В диссертационной работе методами клеточной и генетической инженерии созданы трансгенные и транспластомные растения семейств Compositae и Solanaceae (*Solanum rickii*, *Solanum tuberosum*, *Lycopersicon peruvianum*, *Lactuca sativa*, *Cichorium intybus*), которые имеют как маркерные гены, так и гены, кодирующие белки фармацевтического назначения.

Методом биолістической трансформации созданы транспластомные растения дикого вида *S. rickii* с геном *aadA*. Использование для селекции

трансформированных растений одновременно двух антибиотиков, спектиномицина и стрептомицина, дало возможность эффективно осуществлять отбор трансформантов и избегать появления спонтанных мутантов, что подтверждено ПЦР-анализом тотальной ДНК регенерантов.

Показана возможность перенесения методом соматической гибридизации трансформированных пластид *S. rickii* в цибридные растения *L. peruvianum* + (*S. rickii*) и гибриды *S. tuberosum* + *S. rickii*. После γ -слияния мезофильных протопластов хлорофиллдефектного мутанта *L. peruvianum* и транспластомного растения *S. rickii* на селективной среде с антибиотиками спектиномицином и стрептомицином получены цибриды, имевшие трансформированные хлоропласты *S. rickii* и ядерный геном *L. peruvianum*. Такой результат подтвержден анализом хлоропластной и ядерной ДНК цибридов. Путем переноса хлоропластов *S. rickii* и получения в условиях селекции зеленых цибридных растений была подтверждена хлоропластная природа осуществленной нами трансформации растений *S. rickii*. Одновременное использование хлорофиллдефектного мутанта *L. peruvianum* и селективного маркерного гена в хлоропластах *S. rickii* позволило отобрать растения, имевшие трансформированные хлоропласты *S. rickii*. В то же время, облучение донора хлоропластов способствовало селекции растений, имевших ядерную ДНК реципиента.

Проведены эксперименты по слиянию мезофильных протопластов *S. tuberosum* сортов Луговской и Славянка с геном *nptII* в ядерной ДНК и транспластомного *S. rickii* с геном *aadA* в хлоропластах. На селективной среде с тремя антибиотиками - канамицином, спектиномицином и стрептомицином - получены гибридные растения. Они имели гены *aadA* и *nptII*, хлоропластную ДНК *S. rickii* и *S. tuberosum*, гибридный ядерный геном. Использование селективного давления при наличии у одного из родителей маркерного гена в хлоропластах, а у другого – в ядерной ДНК, позволяет без инактивации ядерной ДНК донора с высокой вероятностью получить гибридные растения, содержащие оба маркерных гена.

Путем агробактериальной трансформации конструкциями pCB063 и pCB064 с селективным геном *nptII* и целевыми генами белков-антигенов ESAT6 и ESAT6:Ag85B(-ТМД) получены трансгенные растения трех сортов салата. Частота трансформации эксплантов составила 18 – 62%. Анализ геномной ДНК выявил наличие в регенерированных растениях как селективного, так и целевых генов. В то же время, анализ обратных транскриптов показал, что при стабильной транскрипции селективного гена возможно как наличие, так и отсутствие мРНК целевого гена. В четырех из шести анализировавшихся растений детектировалась транскрипция как селективного, так и целевого генов. Анализ наследования селективного гена *nptII* показал отсутствие расщепления по этому признаку в растениях T₁ та T₂ поколений. Все анализировавшиеся растения T₁ та T₂ имели как селективный, так и целевой гены.

Оптимизированы условия регенерации растений из семядольных эксплантов цикория *Cichorium intybus*. Частота регенерации на питательной среде MS с 0,5 – 2,5 мг/л кинетина составляла 100%. Методом агробактериальной трансформации конструкцией pCB124 с селективным *nptII* и целевым *ifn- α 2b* генами получены

трансгенные растения, причем частота трансформации эксплантов составляла 26,9%. По результатам анализа регенерированные растения имели как селективный, так и целевой гены.

Ключевые слова: *Lactuca sativa*, *Cichorium inhybus*, *Solanum rickii*, *Solanum tuberosum*, *Lycopersicon peruvianum*, биолистическая трансформация, агробактериальная трансформация, соматическая гибридизация.

SUMMARY

Matvieieva N.A. Construction of transgenic plants of Compositae and Solanaceae families. Manuscript.

Thesis for a candidate degree on the speciality 03.00.20 – biotechnology. – Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, NASU, Kyiv, 2009.

The thesis is devoted to construction of Solanaceae and Compositae plants (*Solanum rickii*, *Solanum tuberosum*, *Lycopersicon peruvianum*, *Lactuca sativa*, *Cichorium intybus*) with transformed nuclear or chloroplast DNA. For this purpose the methods of somatic hybridization, biolistic and *Agrobacterium*-mediated transformation have been used.

The biolistic method have been used for *Solanum rickii* chloroplast transformation with *aadA* gene. The hybrid plants with transformed plastids were regenerated after PEG fusion of chlorophyll-deficient *L. peruvianum* leaf mesophyll protoplasts and leaf mesophyll protoplasts from the *S. rickii* plants, which previously have been transformed. The hybrids were identified by PCR analysis of nuclear and plastid DNA.

The hybrid plants with transformed plastids were regenerated after mesophyll protoplasts fusion of *S. rickii* with *aadA* chloroplast selective marker gene and *S. tuberosum* with *nptII* nuclear selective marker gene. The analysis have shown that regenerated plants were the somatic hybrids containing *aadA*, *nptII* genes, nuclear and chloroplast DNA from *S. rickii* and *S. tuberosum*.

Transgenic plants of *Lactuca sativa* L. with genes of bacterial antigens from *Mycobacterium tuberculosis* have been obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation. The DNA PCR-analysis has shown the presence of both selective and target genes. At the same time, the RT-PCR has shown, that both presence and absence of a transcription of ESAT6 protein gene at a stable transcription of a *nptII* gene is possible.

The efficient method for plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation with interferon - $\alpha 2b$ gene has been developed for *Cichorium intybus* L.. Regeneration with efficiency 100% was induced on the MS medium (0,5-2,5 mg/l kinetin and 0,5 mg/l NAA). Transformed plantlets were recovered at 26,9% frequency. According to PCR-analysis the *nptII* and *ifn- $\alpha 2b$* genes were integrated in the genome of transformed plants.

Key words: *Solanum rickii*, *Solanum tuberosum*, *Lycopersicon peruvianum*, *Lactuca sativa*, *Cichorium intybus*, *Agrobacterium*-mediated transformation, biolistic transformation, somatic hybridization.