

## БИОТЕХНОЛОГІЇ У МЕДИЦИНІ ТА СІЛЬСЬКОМУ ГОСПОДАРСТВІ

БЕЛОКУРОВА В.Б., КИЩЕНКО Е.М., ЛИСТВАН Е.В., КУЧУК Н.В.

Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины,  
Украина, 03680, Киев-143, ул. Акад. Заболотного, 148, E-mail: iicb@iicb.kiev.ua

### КУЛЬТУРА *IN VITRO* И ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ КОРНЕЙ *PSORALEA DRUPACEA* BUNGE (LEGUMINOSAE)

Фармакологически активные соединения составляют значительную часть вторичных метаболитов растений. Список лекарственных растений, которые находятся под угрозой исчезновения, по разным оценкам насчитывает от 4 тысяч до 10 тысяч видов. В связи с этим всё более важной становится роль исследований, связанных с использованием методов биотехнологии для возобновляемого культивирования таких видов и получения фармакологических соединений на основе культур *in vitro*. *Psoralea drupacea* Bunge (Leguminosae) является представителем лекарственных растений флоры Средней Азии и Казахстана, продуцентом ряда биологически активных соединений - бакучиола, псоралена и изопсоралена, друпацина [1, 2]. Активные соединения *P.drupacea* синтезируются также другими видами рода *Psoralea*, в частности, *P.corylifolia* [3]. В настоящее время ведётся разработка биотехнологических методов получения ценных вторичных метаболитов ряда видов *Psoralea* [4-9], среди которых нет, однако, *P.drupacea*. Целью нашей работы было создание различных типов асептических культур *P.drupacea*, в том числе трансгенных, для изучения возможности их использования для получения фармакологически активных соединений.

#### Материалы и методы

Инициация и поддержание различных типов асептических культур *P.drupacea*. В работе использовали семена *P.drupacea* из банка зародышевой плазмы растений мировой флоры, созданного в ИКБГИ НАНУ. Поверхностную стерилизацию семян для введения в культуру *in vitro* проводили согласно ранее описанному методу [10]. Семена предварительно инкубировали в концентрированной серной кислоте в течение 30 мин. После тщательной отмывки в стерильной дистиллированной воде семена переносили на безгормональную среду Мурасиге-Скуга с вдвое уменьшенным содержанием макросолей и сахарозы (среда MS/2) и культивировали при 25°C и 16-часовом фотопериоде. Сформировавшиеся проростки культивировали на безгормональных средах с различными комбинациями минеральных компонентов (MS, MS/2, среда Гамборга B<sub>5</sub>, среда Шенка-Хильдебрандта SH). Субкультивирование проводили путём переноса частей междоузлий, содержащих верхушечные или пазушные почки, на свежую среду. Интервал субкультивирования составлял 2-3 месяца. Для увеличения коэффициента размножения растений *in vitro* использовали цитокинины (БАП, кинетин) в различных концентрациях. Четыре прописи питательных сред с различными комбинациями регуляторов роста [10] сравнивали в отношении их эффективности для индукции и культивирования каллусных линий.

Генетическая трансформация с помощью *Agrobacterium rhizogenes* и получение культуры трансгенных корней. В исследованиях по генетической трансформации *P.drupacea* использовали агропиновый штамм *Agrobacterium rhizogenes* A4. Бактериальные культуры выращивали в жидкой среде LB на шейкере при 150 rpm при температуре 28°C в темноте в течение суток. Бактериальную суспензию центрифугировали при 6000 g в течение 10 мин, ресуспендировали в жидкой среде MS с вдвое уменьшенной концентрацией солей и далее использовали в экспериментах по кокультивированию с эксплантами *P.drupacea* (листья и междоузлия асептически культивируемых растений через 1-1,5 месяца после их субкультивирования на свежую среду). Экспланты нарезали на фрагменты величиной около 1 см, помещали в бактериальную суспензию на 20 мин и далее выдерживали на агаризованной безгормональной среде MS при 22°C в течение 48 часов в темноте. После этого

экспланты отмывали в стерильной дистиллированной воде, подсушивали на фильтровальной бумаге и переносили на агаризованную среду MS, содержащую 500 мг/л цефотаксима для элиминации агробактерий. Культивировали при 26°C и 16-часовом фотопериоде до формирования корней. В качестве контроля использовали листовые экспланты *P. drupacea*, которые культивировали на безгормональной среде MS в тех же условиях. Индуцированные корневые культуры выращивали с интервалом субкультивирования 2 недели, постепенно снижая концентрацию цефотаксима в питательной среде.

ПЦР-анализ культур индуцированных корней. Геномную ДНК выделяли согласно [11]. ПЦР проводили в амплификаторе Mastercycler® personal (Eppendorf). Реакционная смесь, суммарный объём которой составлял 20 мкл на пробу, содержала 50 нг ДНК, солевой буфер (10 mM трис-HCl, pH 9.0, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 0.01% Тритон X-100), по 200 мкМ каждого из праймеров, по 200 мкМ дезоксинуклеотидтрифосфатов и 1 единицу Taq ДНК-полимеразы (Fermentas). Реакцию начинали с денатурации при 94°C (3 мин); далее следовало 34 цикла: денатурация - при 94°C (30 с), отжиг - при 65°C (30 с) и синтез – при 72°C (45 с); а затем синтез при 72°C (3 мин). Для идентификации гена *rolB* использовали праймеры 5'ATGGATCCCAAATTGCTATTCCCTTCCACGA3' и 5'TTAGGCTTCTTTCTTCAGGTTTACTGCAGC3'. Продукты реакции анализировали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле в присутствии бромистого этидия в трис-боратной буферной системе.

#### **Результаты и обсуждение**

Индукция и поддержание асептических культур *P. drupacea*. Семена растений рода *Psoralea* покрыты жёсткой защитной оболочкой. В ряде публикаций отмечены трудности их проращивания [10], что является препятствием успешного введения этих видов в асептическую культуру. Для индукции прорастания семян *P. drupacea* применяли обработку концентрированной серной кислотой. Используемые в экспериментах семена, прошедшие такую обработку, проросли и сформировали проростки в течение 3-4 недель (Рис. 1. А). Эффективность прорастания составила 95%. Необработанные семена не проросли в течение этого времени; позже стратифицировать их также удалось с помощью серной кислоты.

Полученные проростки культивировали на безгормональных средах разного состава при 25°C и 16-часовом фотопериоде (Рис. 1, Б). Оказалось, что способность к укоренению и темпы роста побегов *P. drupacea* в определённой степени зависели от минерального состава культуральных сред (MS, MS/2, B<sub>5</sub>, SH). Оптимальными оказались среды SH и MS/2, тем не менее, частота укоренения побегов на них также была невысокой. Использование цитокининов в составе питательной среды позволило значительно повысить коэффициент размножения растений *P. drupacea* путём индукции множественных побегов. Добавление БАП в концентрации 0,2 мг/л стимулировало развитие побегов из пазушных почек, а дальнейшее повышение концентрации БАП до 1 мг/л существенно не увеличивало число формирующихся побегов, но значительно тормозило их рост (Рис. 1, В).

Каллусные культуры *P. drupacea* были индуцированы из эксплантов листьев с применением всех четырёх прописей культуральных сред, которые используются нами для поддержания коллекции клеточных культур растений различных таксономических групп. В то же время на средах разного состава морфология и темпы роста каллуса значительно различались. Формирование рыхлого каллуса интенсивно-зелёного цвета и максимальные темпы роста (удвоение биомассы в течение 10-14 дней) наблюдались на среде К (1 мг/л 2,4-Д + 1 мг/л БАП).

*Agrobacterium*-опосредованная генетическая трансформация и получение культуры трансгенных корней. Генетическая трансформация эксплантов растений с использованием *A. rhizogenes* индуцирует формирование культур трансгенных корней, которые рассматриваются как эффективная биологическая система получения

вторичных метаболитов. Целью нашей работы было разработать эффективный и воспроизводимый метод генетической трансформации *P.drupacea* с помощью *A.rhizogenes*. Генетическую трансформацию проводили с использованием модифицированного метода листовых дисков так, как описано выше. Формирование корней начиналось на эксплантах листьев в течение 3-5 недель после агробактериальной инфекции (Рис. 1, Г). В контрольных эксплантах корни не формировались. Не удалось индуцировать трансгенные корни в эксплантах междоузлий, что подчёркивает значение правильного выбора экспланта для успеха эксперимента. В каждом листовом экспланте после кокультивирования формировалось до 10 центров индукции корней. Корни, сформировавшиеся в разных частях одного и того же экспланта, культивировали как индивидуальные клоны. Темпы роста и характер латерального ветвления индуцированных корневых культур были различными. Некоторые из них в течение 1-2 недель прекращали рост и погибали, в то время как другие росли быстро. Большинство индуцированных клонов формировали каллус на частях корней, находящихся непосредственно в толще питательной среды, в отличие от воздушных ответвлений корней (Рис. 1, Д). Снижение вдвое концентрации макрокомпонентов и сахарозы в питательной среде позволяло уменьшить интенсивность каллусообразования корнями.

В целом получен 21 клон быстро растущих культур корней *P.drupacea*. Формирование и рост корневых культур на безгормональной среде (в отличие от контрольных экспериментов) и отсутствие у них геотропизма являются косвенными доказательствами их трансгенной природы. Кроме того, наличие гена *rolB* в ДНК индуцированных корней было подтверждено с помощью ПЦР-анализа (Рис. 1,Е).

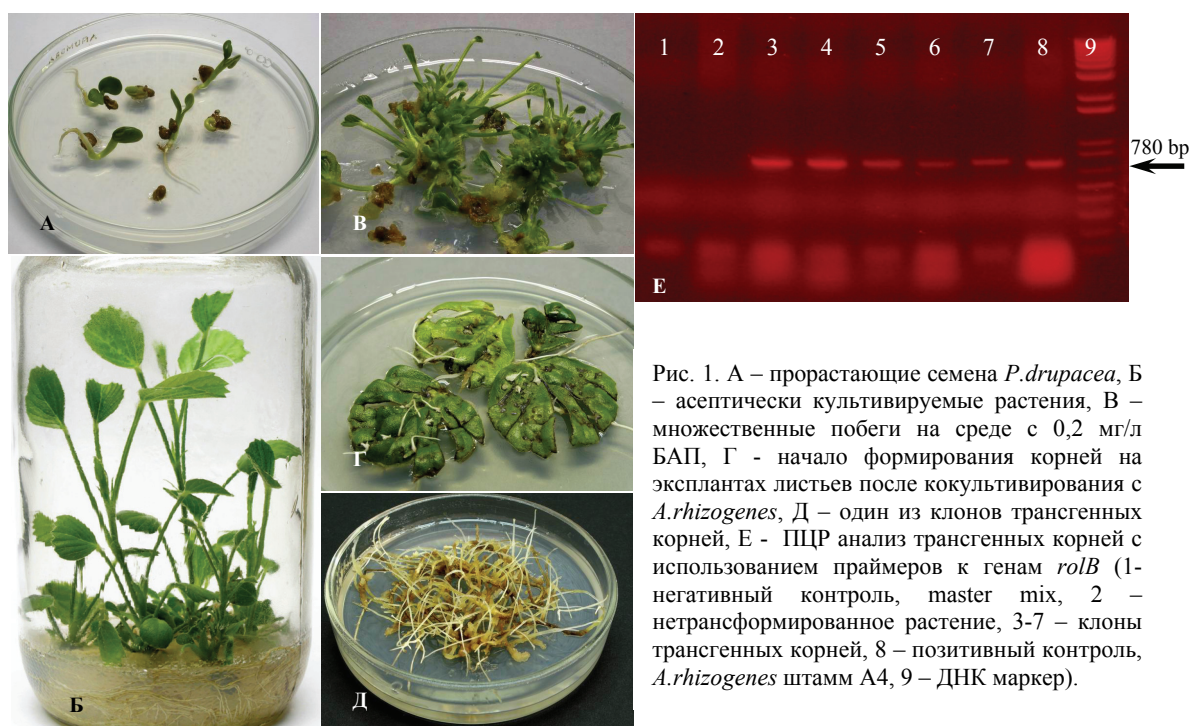


Рис. 1. А – прорастающие семена *P.drupacea*, Б – асептически культивируемые растения, В – множественные побеги на среде с 0,2 мг/л БАП, Г - начало формирования корней на эксплантах листьев после кокультивирования с *A.rhizogenes*, Д – один из клонов трансгенных корней, Е - ПЦР анализ трансгенных корней с использованием праймеров к генам *rolB* (1- негативный контроль, master mix, 2 – нетрансформированное растение, 3-7 – клоны трансгенных корней, 8 – позитивный контроль, *A.rhizogenes* штамм А4, 9 – ДНК маркер).

## Выводы

Основные трудности работы с *P.drupacea* в культуре *in vitro* возникают на стадии прорастивания семян и при укоренении размножаемых побегов. Обработка семян серной кислотой является эффективным способом стратификации, а подбор оптимального минерального состава среды и концентрации сахарозы дают возможность повысить число укоренённых побегов. Модифицированный метод

листовых дисков может с успехом применяться для индукции культур трансгенных корней *P. drupacea*.

Работа выполнялась в рамках проекта "Створення та застосування клітинних культур-продуцентів для отримання антимікробних та антигрибкових речовин рослинного походження" в рамках комплексної програми НАН України "Новітні медико-біологічні проблеми та навколишнє середовище людини".

### Література

1. Лікарські рослини. Енциклопедичний довідник. За ред. А.М. Гродзинського. – Київ, Головна редакція Української Радянської Енциклопедії. - 1990.

2. Смирнов В.В. Эколого-таксономические и биотехнологические аспекты исследования бактерий и высших растений – продуцентов биологически активных веществ. // Микробиологічний журнал – 1998. – vol. 60, № 5. - с. 3–18.

3. Mar W, Je KH, Seo EK Cytotoxic constituents of *Psoralea corylifolia*. // Arch Pharm Res. – 2001. – v. 24, № 3. – p. 211-213.

4. Nguyen C., Bourgaud F., Forlot P., Guckert A. Establishment of hairy root cultures of *Psoralea* species. // Plant Cell Reports. – 1992. – v.11. – p. 424-427.

5. Bourgaud F., Nguyen C., Guckert A. *Psoralea* species: in vitro culture and production of furanocoumarins and other secondary metabolites // In: Bajaj Y.P.S. (Ed.) "Biotech. in agriculture and forestry". Medicinal and aromatic plants". – 1995. – v. 33. - p. 388-411.

6. Bouque V., Bourgaud F., Nguyen C., Guckert A. Production of daidzein by callus cultures of *Psoralea* species and comparison with plants. // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 1998. – v. 53, № 1. – p. 35-40.

7. Rout G.R., Das P. Studies of *in vitro* somatic embryogenesis of *Psoralea corylifolia* L. – an endangered medicinal plant // Gartenbauwissenschaft. – 2001. – v.4. – p. 202-206.

8. Sahrawat A.K., Chand S. Continuous somatic embryogenesis and plant regeneration from hypocotyl segments of *Psoralea corylifolia* Linn., an endangered and medicinally important Fabaceae plant // Current Science. – 2001. - v. 1. – p. 1328-1331.

9. Abhyankar G., Reddy V.D., Giri C.C., Rao K.V., Lakshmi V.V.S., Prabhakar S., Vairamani M., Thippeswamy B.S., Bhattacharya P.S. Amplified fragment length polymorphism and metabolomic profiles of hairy roots of *Psoralea corylifolia* L. // Phytochemistry. – 2005. – v. 66, № 20. – p. 2441-2457.

10. Белокурова В.Б., Листван Е.В., Майстров П.Д., Сукура Й.Й., Глеба Ю.Ю., Н.В.Кучук "Использование методов биотехнологии растений для сохранения и изучения биоразнообразия мировой флоры" // Цитология и генетика. – 2005. – v. 14. – p. 41-51.

11. Cheung, W.Y., Hubert, N. and Landry, B.S. A simple and rapid DNA microextraction method for plant, animal and insect suitable for RAPD and other PCR analysis. // PCR Meths. Applics. – 1993. – v. 3. – p. 69-70.

### Резюме

Для фармакологічно цінного виду рослин *Psoralea drupacea* Bunge (Leguminosae) розроблені методи введення в культуру *in vitro*, вирощування асептичних рослин та їх клонального розмноження, індукції калусних культур. Методом генетичної трансформації з допомогою *A.rhizogenes* індукуються клони трансгенних коренів. Отримані культури вивчаються як можливе джерело біологічно активних сполук.

Для фармакологічно цінного виду рослин *Psoralea drupacea* Bunge (Leguminosae) розроблено методи введення в культуру *in vitro*, вирощування асептичних рослин та їх клонального розмноження, індукції калусних культур. Методом генетичної трансформації за допомогою *A.rhizogenes* індукуються клони трансгенних коренів. Отримані культури вивчаються як можливе джерело біологічно активних сполук.

Methods of introduction into aseptic culture, *in vitro* cultivation and clonal propagation of shoots and methods of callus culture have been elaborated for medicinal plant species

*Psoralea drupacea* Bunge (Leguminosae). Hairy roots have been induced in leaf explants using *A.rhizogenes*-mediated genetic transformation. All these types of aseptic cultures are studied as a possible source of biologically active compounds.

**БЕРДИЧЕВЕЦ И.Н., ГОРДУКОВА М.А., ШИМШИЛАШВИЛИ Х.Р., СИНДАРОВСКАЯ Я.Р.<sup>1</sup>, ШЕЛУДЬКО Ю.В.<sup>1</sup>, ФАДЕЕВ В.С., ГОЛДЕНКОВА-ПАВЛОВА И.В.**

*Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН,*

*Россия, 119991, Москва, ул. Губкина, 3, e-mail: i\_berdichevets@hotmail.ru;*

*<sup>1</sup>Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины,*

*Украина, 03143, Киев, ул. Заболотного, 148, e-mail: sindarovskaya@ukr.net*

### **ДИЗАЙН СИСТЕМЫ ПРАЙМЕРОВ И УСЛОВИЙ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОГО ОТБОРА И АНАЛИЗА ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ**

Важным этапом в процессе создания трансгенных растений является эффективный отбор первичных трансформантов, содержащих в геноме вставку целевого гена, а также последующий анализ наследования трансгена в ряду поколений. Простым и экономичным методом для этого является полимеразная цепная реакция. Однако для того, чтобы проанализировать трансформанты необходимо решить ряд задач и провести несколько полимеразных цепных реакций, условия для каждой из которых необходимо подбирать индивидуально, что в конечном итоге занимает достаточно много времени. В связи с этим оптимизация условий ПЦР для эффективного отбора и анализа трансгенных растений является актуальной задачей.

Известно, что встройка трансгена в геном растения-реципиента довольно редкое событие. Поэтому для трансформации используются вектора с маркерными генами, экспрессия которых обеспечивает толерантность трансформантов к селективному давлению. Присутствие селективного агента в среде культивирования повышает эффективность отбора предположительных трансформантов и значительно сокращает объем работы. Наибольшее распространение получили маркерные гены, обеспечивающие устойчивость к таким селективным агентам как антибиотики или гербициды, например *nptII* ген, обеспечивающий резистентность к антибиотику канамицину, или ген *bar*, обеспечивающий устойчивость к фосфинотрицину – действующему началу гербицида с коммерческим названием «Баста». Однако, следует отметить, что для ряда видов растений селекционное давление негативно сказывается на процессах каллусо- и морфогенеза, поэтому зачастую приходится либо использовать меньшие концентрации селективного агента, либо вообще на ранних этапах не использовать селективный агент [1]. Это может приводить к отбору ложных трансформантов, способных расти на селективных средах. ПЦР с праймерами, комплементарными последовательностям селективных генов, позволяет провести анализ растений-регенерантов и исключить ложные трансформанты из эксперимента уже на начальных стадиях их появления.

В настоящее время одним из наиболее часто используемых методов трансформации растений является перенос генов с помощью агробактерий. Известно, что агробактерии способны сохраняться в сосудистой системе растений в течение нескольких поколений. Присутствие агробактерий в растительных образцах также может привести к ложноположительным результатам – могут быть отобраны ложные трансформанты растений. Поэтому для того, чтобы доказать, что амплификация последовательностей исследуемых генов проходит с геномной ДНК, а не с