

УДК 576.535+57.085.23

## **AGROBACTERIUM RHIZOGENES-ОПОСРЕДОВАННАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ И РЕГЕНЕРАЦИЯ ДВУХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ ИЗ СЕМЕЙСТВА АРОСУНАСЕАЕ**

**Л.Г. ЛЕШИНА, О.В. БУЛКО**

*Институт биоорганической химии и нефтехимии Национальной академии наук Украины  
02660 Киев, ул. Мурманская, 1  
e-mail: llioshina@ukr.net*

Исследовали *Agrobacterium rhizogenes*-опосредованную трансформацию и регенерацию барвинка малого *Vinca minor* L. и катарантуса розового (барвинка розового) *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. В результате трансформации на безгормональной среде получены культуры «бородатого корня». Показано, что наиболее эффективным штаммом является *A. rhizogenes* R-1601. Результаты морфологического и генетического анализов подтвердили трансформацию растений. Из культур корней на среде МС, содержащей 1 мг/л НУК, 1 мг/л БАП для *C. roseus* и 1 мг/л НУК для *V. minor*, инициированы растения-регенеранты. Показано высокое содержание индольных алкалоидов в растениях-регенерантах.

*Ключевые слова:* *Catharanthus roseus* (L.) G. Don., *Vinca minor* L., *Agrobacterium rhizogenes*, трансформация, регенерация, индольные алкалоиды.

Барвинок малый (*Vinca minor* L.) и катарантус розовый (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don. syn. *Vinca rosea* L.) — лекарственные и декоративные растения из семейства кутровых (Аросунасеае) являются уникальными источниками ценных алкалоидов, которые используются при производстве препаратов, улучшающих мозговое кровообращение (*V. minor*), и препаратов с противоопухолевой активностью (*C. roseus*). Эти растения растут медленно, размножаются в основном черенками, их количество ограничено, поэтому актуальной является разработка биотехнологических приемов культивирования *in vitro* с сохранением в них биосинтеза биологически активных веществ.

Установлено, что культуры клеток растений *in vitro* способны синтезировать практически все классы вторичных метаболитов [10], однако они недостаточно продуктивны и нерентабельны при биотехнологическом выращивании. Одним из методов активации биосинтеза является трансформация растений грамотрицательной почвенной бактерией *Agrobacterium rhizogenes*, в результате чего происходит разрастание растительных клеток, фенотипически подобное корням и называемое культурой «бородатого корня», или «hairy roots». Рост такой культуры корней инициируется ранением растительной ткани и переносом фрагмента ДНК Ri-плазмиды *A. rhizogenes* в клеточный геном, вызывающей корнеподобное разрастание растительной клетки. Для ряда растений показано, что Ri-опосредованная трансформация изменяет их биохимические и морфологические показатели [7, 11, 19].

Целью нашей работы были *A. rhizogenes*-опосредованная трансформация барвинков, получение культуры «бородатого корня», регенерация растений и первичный анализ полученных линий на содержание биологически активных веществ.

### Методика

**Растительный материал.** Асептические растения *V. minor* и *C. roseus* культивировали на среде для пролиферации МС [14] с добавлением растительных гормонов: 0,5 мг/л ИМК + 0,8 мг/л БАП для *C. roseus*, 0,4 мг/л ИМК + 0,5 мг/л БАП с удвоенным количеством ионов железа для *V. minor*. Побеги растений субкультивировали ежемесячно на той же среде при 26 °С, 16-часовом фотопериоде, освещенности 3000 лк.

**Бактериальные штаммы.** *A. rhizogenes* A4, R-1601, 8196, 15834, трансформированные бинарным вектором pBin35S-GFP, содержащим маркерные гены: *gfp* — репортерный ген белка с зеленой флуоресценцией, *npt II* — селективный ген неомицинофосфотрансферазы, кодирующий устойчивость к канамицину. Условия культивирования: среда для агробактерий YEB [20], инкубация 120 об/мин, 28 °С, 24 ч, в темноте.

**Трансформация и регенерация.** Стерильные эксплантаты листьев и стебля *V. minor*, *C. roseus*, выдержанные в бактериальной суспензии в течение 20 мин, помещали на 1 %-й агар для кокультивирования. После 3-суточной инкубации растительный материал переносили на безгормональную среду МС с добавлением антибиотиков: 500 мг/л цефотаксима и 50 мг/л канамицина до появления адвентивных корней.

Частоту трансформации вычисляли по соотношению количества трансформированных эксплантатов к общему их количеству (см. таблицу; приведены среднеарифметические данные и их стандартные отклонения).

Регенерацию из культуры корней проводили на среде МС с добавлением 1 мг/л НУК, 1 мг/л БАП для барвинка розового и 1 мг/л НУК для барвинка малого. Полученные регенеранты инкубировали на среде МС без гормонов при 25 °С, 16-часовом фотопериоде и поддерживали перенесением апексов через каждые 25—30 сут.

**Полимеразная цепная реакция (ПЦР).** Суммарную ДНК получали по Эдвардсу [8]. Праймеры для *rolB*-гена: 5'-ATGGATCCCAAATTGCTATT-CCTCCACGA, 3'-TTAGGCTTCTTTCTTCAGGTTTACTGCAGC; праймеры для *virD1*-гена: 5'-ATGTCGCAAGGACGTAAGCCCA, 3'-GGA-GTCTTTCAGCATGGAGCAA. В качестве положительного контроля использовали плазмидную ДНК агробактерии. Реакцию проводили в термоциклере «Терцик» (Пушино, Россия). Конечный объем реакционной смеси составлял 30 мкл: 1 мкл ДНК (50 нг), 0,2 мкМ каждого праймера, 200 мкМ каждого дНТФ (дезоксинуклеозидтрифосфата), 0,5 единицы Taq-полимеразы, 3 мкл 10×ПЦР-буфера. Условия реакции: для *rolB*-гена — денатурация при 94 °С в течение 1 мин, отжиг при 60 °С в течение 1 мин, элонгация при 72 °С 1 мин — 30 циклов, последний цикл — элонгация при 72 °С 7 мин; для *virD1*-гена — денатурация при 94 °С, 30 с, отжиг при 55 °С в течение 30 с, элонгация при 72 °С 1 мин — 35 циклов, последний цикл — элонгация при 72 °С 7 мин. Амплифицированные фрагменты длиной 780 и 450 пн анализировали разделением электрофорезом в 2 %-м агарозном геле, визуализировали добавлением этидиума бромида.

*Тонкослойная хроматография.* Экстракцию алкалоидов проводили 1 %-м раствором HCl с последующей обработкой полученных экстрактов хлороформом. Разделительная система для хроматографии: *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (5 : 1 : 4). Хроматографические пластины с сорбентом Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Merck, Германия). Экспозиция — 2—3 ч с последующими УФ-детекцией (длина волны  $\lambda = 254$  нм) и обработкой реактивом Драгендорфа [1]. В качестве контроля использован спиртовой раствор фармацевтического препарата оксибрал (действующее вещество — винкамин).

### Результаты и обсуждение

Для трансформации отбирали листовые и стеблевые эксплантаты 8-недельных стерильных растений барвинка малого, барвинка розового, применяли агробактериальные штаммы A4, R-1601, 8196, 15834, любезно предоставленные И.Н. Кузовкиной (Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Россия). Агробактериальную суспензию культивировали с добавлением экстракта табака *Nicotiana tabacum* [4]. После 3-суточного кокультивирования эксплантаты переносили на безгормональную среду МС и МС 0,5N (среда МС с половинным содержанием солей азота). Наш выбор сред согласуется с результатами работы [21], в которой после тестирования ряда сред (МС, МС 0,5N, В5, Whites media) успешно использовались МС и МС 0,5N с 3 г/л мальтозы.

Для элиминации агробактерий добавляли 500 мг/л цефотаксима, для селекции pBin35S-GFP-трансформантов — 50 мг/л канамицина. Полученные эксплантаты выставляли на свет до образования трансформированных корней. После проявления трансформации образовавшиеся корни отделяли от листового и стеблевого сегментов и переносили на среду с уменьшенной дозой цефотаксима до полной элиминации бактерий. При первой пересадке оставляли часть ювенильного растения для сохранения ростовой активности корней.

Линии корней получены после отделения субкультуры от первичных эксплантатов и культивирования их на пролиферативной среде.

Трансформанты идентифицировали по морфологическим, физиологическим и генетическим признакам. Морфологическими и физиологическими маркерами были быстрый и активный рост корней, пониженное апикальное доминирование, латеральное ветвление, плагиотропность корней [18], генетическими — гены *rolB* и *virD1* [6]. Детекция *rolB*-гена ПЦР-методом подтвердила перенос трансформирующей последовательности Ri-плазмиды, отсутствие *virD1*-последовательности свидетельствовало об отсутствии не трансформирующей ДНК агробактерии (рис. 1).

Трансформация разными агробактериальными штаммами (A4, 8196, 15834 — агропиновыми и R-1601 — маннопиновым) имела неодинаковую эффективность (таблица). Самым эффективным оказался штамм R-1601. Наименьшее количество трансформантов наблюдалось при трансформации растительных эксплантатов штаммом 15834.

Появление адвентивных корней у *C. roseus* зафиксировано на 14—16-е, у *V. minor* — на 20—22-е сутки. Замечены отличия при инфицировании различных эксплантатов. У барвинка розового корни появлялись из черешка листа, у барвинка малого — в основном из стеблевых сегментов (рис. 2).

Темпы роста и характер образования корней различались у обеих культур. У барвинка розового латеральное ветвление индуцированных

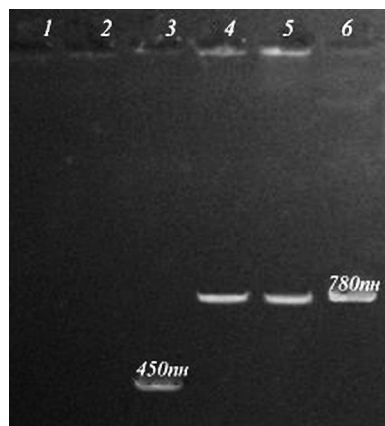


Рис. 1. Анализ трансформированных корней с помощью полимеразной цепной реакции:

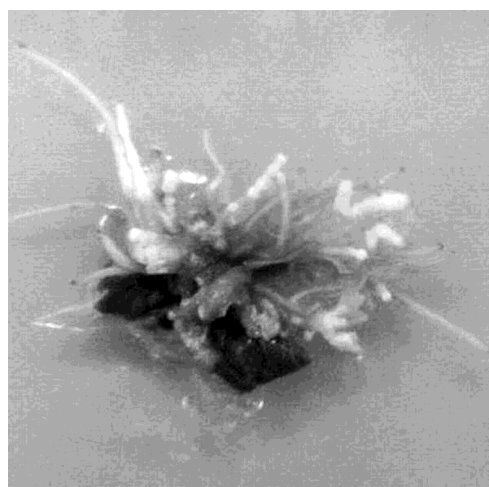
1 — *virD1*-ген *V. minor*; 2 — *virD1*-ген *C. roseus*; 3 — положительный контроль *virD1*-гена (450 пп); 4 — *rolB*-ген *V. minor*; 5 — *rolB*-ген *C. roseus*; 6 — положительный контроль *rolB*-гена (780 пп)

корней было интенсивным, у барвинка малого — более мелкие ответвления росли медленнее, чем у *C. roseus*, но значительно быстрее, чем у контрольных эксплантатов *V. minor*. Такое отличие может быть обусловлено зависимостью трансформации от множества факторов, среди которых — тип трансформируемой ткани или органа. Листья барвинка малого достаточно плотные, кожистые, что может препятствовать как эффективно-му проникновению бактерий, так и дальнейшей пролиферации трансформированных клеток.

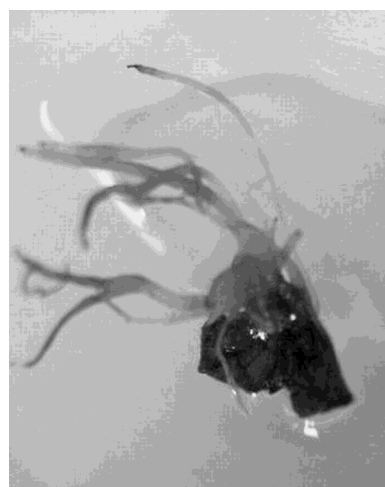
Побеги из корней регенерировали на среде МС с добавлением 1 мг/л НУК, 1 мг/л БАП для барвинка розового и 1 мг/л НУК — для барвинка малого, что хорошо согласуется с другими исследованиями этих растений [16, 17]. Однако в нашей работе помимо индуцирован-

Частота трансформации (%) разными штаммами *A. rhizogenes*

Штамм	<i>V. minor</i>		<i>C. roseus</i>
	Среда YEB	Среда YEB + экстракт <i>N. tabacum</i>	
A4	2,33±0,9	8,95±0,3	30,36±0,8
R-1601	10,01±0,7	35,59±0,5	54,27±0,5
8196	0,00±0,0	5,77±0,7	24,21±0,7
15834	3,38±0,5	14,29±0,9	20,72±0,9



а



б

Рис. 2. Формирование адвентивных корней на растительных эксплантатах после кокультивирования с *A. rhizogenes* R-1601:

а — *C. roseus*; б — *V. minor*

ной регенерации у барвинка малого наблюдалась также спонтанная регенерация на среде без гормонов, хотя и с меньшей интенсивностью.

У полученных регенерантов выявлены морфологические изменения. Их масса не превышала массу нетрансформированных растений, но некоторые листья барвинка розового были морщинистыми, этиолированными. У барвинка малого зафиксированы ветвление стебля, быстро развивающаяся корневая система, что кардинально отличало трансформанты от интактных растений.

На сегодня большое количество работ посвящено изучению изменений вторичного метаболизма в клеточных культурах барвинка розового [3, 9, 15]. Барвинку малому уделено значительно меньше внимания, поэтому с помощью ТСХ мы провели первичную оценку изменения биосинтетического потенциала растений-регенерантов *V. minor* по сравнению с интактными.

При визуальной оценке полученных хроматограмм установлено, что уровень содержания алкалоидов в растениях-регенерантах не меньше, чем в интактных растениях (рис. 3).

Активация вторичного метаболизма у агробактериальных трансформантов объясняется экспрессией *rol*-генов тДНК *A. rhizogenes* и (или) дифференцировкой клеток, а также органогенезом растения-регенеранта [5, 12, 13]. Полученные результаты подтвердили теорию, что для синтеза многих вторичных метаболитов необходима определенная степень дифференцировки клеток [2].

Таким образом, в результате проведенной работы установлено, что самым эффективным агробактериальным штаммом является *A. rhizogenes* R-1601. Барвинок розовый — более отзывчивый объект для трансформации. При работе с барвинком малым мы столкнулись с определенными трудностями, связанными с плотным слоем кутикулы, покрывающей листья. Добавлением экстракта из листьев табака к бактериальной суспензии удалось получить частоту трансформации 35,6 % для барвинка малого и 54,3 % — для барвинка розового. Растения-регенеранты из культуры «бородатого корня» получены на среде МС с добавлением 1 мг/л НУК, 1 мг/л БАП для барвинка розового и 1 мг/л НУК — для барвинка малого. Хроматографическим анализом выявлено высокое содержание суммарных алкалоидов в растениях-регенерантах барвинка малого.

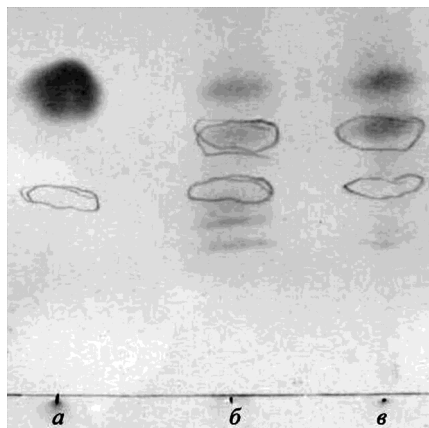


Рис. 3. Разделение суммарных алкалоидов барвинка малого с помощью тонкослойной хроматографии:

*а* — контроль; *б* — исходное растение; *в* — растение-регенерант (обведены пятна, видимые под УФ-освещением)

1. Крамаренко В.Ф. Токсикологическая химия. — Киев: Вища шк., 1989. — 447 с.
2. Alfermann A.W. Production of natural products by plant cell and organ cultures // Annu. Plant Rev. — 2009. — 39. — P. 381–399.
3. Ataei-Azimi A., Hashemloian B.D., Ebrahimzadeh H., Majd A. High in vitro production of anticanceric indole alkaloids from periwinkle (*Catharanthus roseus*) tissue culture // Afr. J. Biotechnol. — 2008. — 7, N 16. — P. 2834–2839.

4. Bolton G.W., Nester E.W., Gordon M.P. Plant phenolic compounds induce expression of the *Agrobacterium tumefaciens* loci needed for virulence // Science. — 2009. — **232**. — P. 983—985.
5. Bonhomme V., Laurain-Mattar D., Fliniaux M.A. Effects of the *rol C* gene on hairy root: induction development and tropane alkaloid production by *Atropa belladonna* // J. Nat. Prod. — 2000. — **63**, N 9. — P. 1249—1252.
6. Chandran R.P., Potty V.P. Induction of hairy roots through the mediation of four strains of *Agrobacterium rhizogenes* on five host plants // IJBT. — 2008. — **7**. — P. 122—128.
7. Christensen B., Muller R. The use of *Agrobacterium rhizogenes* and its *rol*-genes for quality improvement in ornamentals // Eur. J. Hort. Sci. — 2009. — **74**, N 6. — P. 275—287.
8. Edwards K., Johnstone C., Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis // Nucl. Acids Res. — 1991. — **19**. — P. 1349.
9. Hughes E.H., Hong S.B., Gibson S.I. et al. Expression of feedback-resistant anthranilate synthase in *Catharanthus roseus* hairy roots provides evidence for tight regulation of terpenoid indole alkaloid levels // Biotechnol. Bioeng. — 2004. — **20**. — P. 718—727.
10. Karuppusamy S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures // J. Med. Plants Res. — 2009. — **3**, N 13. — P. 1222—1239.
11. Kuzovkina I.N., Schneider B. Genetically transformed root cultures — generation, properties and application in plant sciences // Progress in Botany. — 2006. — **67**, N 3. — P. 275—314.
12. McCoy E., O'Connor S.E. Natural products from plant cell cultures // Prog. Drug Res. — 2008. — **65**. — P. 330—370.
13. Moyano E., Fornale S., Palazo J. et al. Effect of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA on alkaloid production in Solanaceae plants // Phytochem. — 1999. — **52**. — P. 1287—1292.
14. Murashige I., Scoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. — 1962. — **15**, N 3. — P. 473—497.
15. Runguphan W., O'Connor S.E. Metabolic reprogramming of periwinkle plant culture // Nat. Chem. Biol. — 2009. — **5**. — P. 151—153.
16. Taha H.S., El-Bahr M.K., Seif-El-Nasr M.M. In vitro studies on Egyptian *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. 1. Calli production, direct shootlets regeneration and alkaloids determination // J. Appl. Sci. Res. — 2008. — **4**, N 8. — P. 1017—1022.
17. Tanaka N., Takao M., Matsumoto T. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation and regeneration of *Vinca minor* L. // Plant Tiss. Cult. Lett. — 1994. — **11**, N 3. — P. 191—198.
18. Tepfer D. Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*: sexual transmission of the transformed genotype and phenotype // Cell. — 1984. — **37**. — P. 959—967.
19. Tzfira T., Lacroix B., Citovsky V. *Agrobacterium* T-DNA integration: molecules and models // Trends Genet. — 2004. — **20**. — P. 375—383.
20. Vervliet M., Holsters H., Teuchy M., Van Montagu J. Characterization of different plaque-forming and defective temperate phages in *Agrobacterium* strains // J. Gen. Virol. — 1975. — **26**. — P. 33—48.
21. Xu T., Zang L., Sun X. et al. Production and analysis of organic acids in hairy root cultures of *Isatis indigotica* Fort (indigo woad) // Biotechnol. Appl. Biochem. — 2004. — **39**. — P. 123—128.

Получено 12.11.2010

#### AGROBACTERIUM RHIZOGENES-ОПОСЕРЕДКОВАНА ТРАНСФОРМАЦІЯ ТА РЕГЕНЕРАЦІЯ ДВОХ ВИДІВ РОСЛИН ІЗ РОДИНИ АРОСУНАСЕАЕ

Л.Г. Лєшина, О.В. Булко

Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії Національної академії наук України, Київ

Досліджували *Agrobacterium rhizogenes*-опосередковану трансформацію й регенерацію барвінку малого *Vinca minor* L. і катарантуса рожевого (барвінку рожевого) *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. У результаті трансформації на безгормональному середовищі отримано культури «бородатого кореня». Показано, що найефективнішим штамом є *A. rhizogenes* R-1601. Результати морфологічного й генетичного аналізів підтвердили трансформацію рослин. Із культур коренів на середовищі МС, що містило 1 мг/л НОК, 1 мг/л БАП для *C. roseus* і 1 мг/л НОК для *V. minor*, ініційовано рослини-регенеранти. Показано високий вміст індольних алкалоїдів у рослинах-регенерантах.

AGROBACTERIUM RHIZOGENES-MEDIATED TRANSFORMATION AND  
REGENERATION OF TWO SPECIES APOCYNACEAE FAMILY

L.G. Lioshina, O.V. Bulko

Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine  
1 Murmanska St., Kyiv, 02660, Ukraine

Hairy roots cultures have been received from two species of periwinkles: lesser periwinkle (*Vinca minor* L.) and pink periwinkle (*Catharanthus roseus* G. Don syn. *Vinca rosea* L.) with agrobacterium-mediated transformations. Among the four strains of *A. rhizogenes*, R-1601 was found to be the most efficient for transformation and initiation of hairy roots. Results of the morphological and genetic analysis have confirmed plants transformation. Regenerants was obtained from root cultures on MC medium with 1 mg/l NAA and 1 mg/l BAP for *C. roseus* and 1 mg/l NAA for *V. minor*. High contents of indole alkaloids was shown in regenerants.

*Key words:* *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, *Vinca minor* L., *Agrobacterium rhizogenes*, transformation, regeneration, indole alkaloids.