

ПЕРЕНЕСЕННЯ В РОСЛИНИ РЯСКИ *Lemna minor* L. ГЕНІВ ТУБЕРКУЛЬОЗНИХ АНТИГЕНІВ ESAT6 ТА AG85В ЗА ДОПОМОГОЮ *Agrobacterium rhizogenes*

Н. А. Матвєєва
О. М. Кіщенко
А. М. Шаховський
М. В. Кучук

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії
НАН України, Київ

E-mail: joyna56@gmail.com

Розроблено методику генетичної трансформації ряски *Lemna minor* L. (*Lemnaceae*, *Monocotyledons*) з використанням *Agrobacterium rhizogenes* без застосування ацетосерингону. Трансгенні рослини ряски з генами туберкульозних антигенів ESAT6 та Ag 85В було отримано з частотою 2% прямою регенерацією з пазушних меристем без стадій утворення «бородатих коренів» та калюсу. Така методика дозволяє істотно скоротити час одержання трансгенних рослин та створювати трансформовані рослини ряски з генами, що становлять практичний інтерес.

Ключові слова: *Lemna minor*, *Agrobacterium rhizogenes*, генетична трансформація, гени туберкульозних антигенів ESAT6 та Ag 85В.

Ряска *Lemna minor* L. — водна рослина, що належить до родини *Lemnaceae* (*Araceae*) класу однодольних. Рослини ряски, як й інші види цієї родини (*Lemna gibba*, *Lemna minor*, *Spirodela polyrhiza*, *Wolffia borealis*, *Wolffia arryza* та ін.) флотують на поверхні водойм. У рослин відсутні стебло та листки, організм являє собою фотосинтезуючу пластинку — листець з боковими листецями та корінець (корінці). Ряска швидко розмножується вегетативним шляхом [1], за якого з пазух листеців (кишенюк) утворюються нові пагони, які потім відділяються від материнської рослини (рис. 1).



Рис. 1. Ріст рослин ряски в культурі *in vitro*

Рослини родини *Lemnaceae* є стійкими до високих концентрацій токсичних сполук. Вони здатні очищувати воду від гербіцидів [2], важких металів [3–5], органічних сполук [6]. Виходячи з цих особливостей ряску та інші види можна використовувати для біомоніторингу [7, 8] та фіторе mediaції забруднених водойм [9–13].

У народній медицині ряску застосовують як спазмолітичний, жарознижувальний, сечогінний, антимікробний засіб завдяки наявності флавоноїдів, каротиноїдів та інших сполук [14]. З ряски виділено полісахарид лемнан, який має імуномодулюючі властивості [15, 16]. Ряска містить до 35% протеїну (для порівняння: сухе насіння сої — 38–42%) [17, 18]. З огляду на це її використовують як кормову добавку у тваринництві та птахівництві. Крім того, оскільки рослина містить багато протеїну, швидко розмножується, а отримання біомаси не потребує значних фінансових витрат, вона є ідеальним об'єктом для генно-інженерних досліджень з метою створення трансгенних рослин — продуцентів рекомбінантних протеїнів, зокрема цінних фармацевтичних сполук [19]. Використання генетично модифікованих ряскових як біофабрик дає змогу синтезувати рекомбінантні протеїни у великих кількостях і з низькою собівартістю. До того ж вони є більш безпечними порівняно з рекомбінантними протеїнами бактеріального

чи тваринного походження, оскільки в цьому разі існує ймовірність забруднення екстрагованого продукту вірусами або іншими патогенами.

Для різних видів родини розроблено методи культивування у стерильній культурі, калюсоутворення та регенерації рослин [20, 21]. Для дедиференціювання, утворення калюсу та регенерації використовують регулятори росту рослин: 2,4-дихлорфеноксіоцтову кислоту, тидіазурон, бензиламінопурин, кінетин. Калюсні тканини утворюються протягом 6–8 тижнів, регенерація рослин відбувається ще через 4 тижні [21]. Показано також, що на процес калюсоутворення впливають цукри, які містяться в живильному середовищі (галактоза, сахароза, сорбітол) [22].

Для трансформації рослин родини ряскових застосовують методи бомбардування [23] та трансформації за допомогою *Agrobacterium tumefaciens* [24]. У результаті цих експериментів спостерігали транзійтну експресію перенесених генів у *Wolffia columbiana* [23, 24], *Lemna gibba* [25]. Низку досліджень було спрямовано на розроблення методик трансформації з використанням селективних *nptII* та *bar* [18, 26] або репортерних генів [23, 24]. Водночас було створено рослини родини ряскових, що можуть мати практичне застосування [27]. Зокрема, отримано рослини *Spirodela*, що синтезують апротинін [28], *Lemna minor*, які накопичують ензим ендоглюканазу E1 [29], інтерферон [30], моноклональні антитіла [31] тощо. Зареєстровано патенти на розроблення методики трансформації ряски [32–35].

В експериментах з генетичної трансформації експлантів, які культивують спільно з агробактеріями, одержують калюсну тканину і потім ініціюють з неї регенерацію рослин [18, 26]. Такий спосіб потребує витрат часу, адже отримання регенованих рослин у ряски — процес тривалий (більше 3–4 місяців). З огляду на це становить інтерес отримання трансгенних рослин ряски безпосередньо з листеців шляхом їх трансформації та вегетативного розмноження без проміжних етапів калюсоутворення та регенерації. Рослини ряски містять меристематичну ділянку у пазухах листеців, з якої відбувається ріст нових рослин, отже, є можливість трансформувати саме ці клітини та одержати трансформовані рослини. У такому разі термін отримання трансформованих рослин значно скорочується.

У біотехнології для одержання трансгенних рослин поряд із *A. tumefaciens* використовують також *A. rhizogenes* — ґрунтова

бактерію, що спричинює захворювання «бородатий корінь» у широкого кола дводольних рослин [36]. Причиною виникнення хвороби є перенесення, стабільна інтеграція в геном рослини-хазяїна та експресія частини ДНК (Т-ДНК) онкоплазміди pRi бактерії *A. rhizogenes*. *In vitro* «бородаті корені» мають ряд специфічних рис: інтенсивний гормононезалежний ріст, відсутність позитивного геотропізму, високий ступінь галуження. Найчастіше *A. rhizogenes* використовують для отримання трансгенних рослин класу дводольних, хоча нині визначено умови, за яких є можливість застосовувати цей вид бактерій для трансформовування геному однодольних рослин [37]. Оскільки в здійснених дослідженнях для одержання трансгенних рослин ряски використовували лише *A. tumefaciens*, становить інтерес вивчення можливості використання іншого виду — *A. rhizogenes*, не застосовуючи при цьому спеціальних сигнальних сполук. Позитивний результат таких досліджень дасть змогу зробити висновок не тільки щодо можливості використання цих бактерій для трансформовування геному ряски, але й буде непрямым свідченням того, що ряска, яка належить до класу однодольних, здатна до синтезу сполук, що сприяють процесингу та перенесенню Т-ДНК в клітини рослини.

Для трансформації ряски нами було використано агропіновий штам *A. rhizogenes* A4 з векторною конструкцією, що містила селективний ген неоміцинофосфотрансферази II (*nptII*) і цільові гени, що кодують синтез туберкульозних антигенів ESAT6 (*esxA*) та Ag 85B (*fbpB^{ATMD}*).

Матеріали і методи

Об'єктом досліджень були рослини ряски малої *Lemna minor* з природної водойми (озеро Опечень, м. Київ.).

Рослини стерилізували протягом 1 хв у 70%-му етанолі, 1–10 хв у розчині комерційного препарату «Білизна» (НПФ «Біолайт», Україна) та промивали стерильною дистильованою водою (60 хв). Після стерилізації рослини вирощували у чашках Петрі на агаризованому середовищі 1/2 МС (середовище *Murashige, Skoog*) [38] зі зменшеним удвічі вмістом макроелементів) при 16-годинному світловому фотоперіоді та температурі 24°C.

У роботі використовували векторну конструкцію pCB158 (рис. 2). Під час конструювання вектора pCB158 за основу було взято бінарний вектор pCB064, який

містив зливу послідовність генів *esxA::fbpB^{ΔTMD}*, що кодують антигени ESAT6 та Ag85B (без трансмембранного домену ΔTMD) з *Mycobacterium tuberculosis*, під контролем промотору 35S вірусу мозаїки цвітної капусти та селективний ген нео-міцинфосфотрансферази II *nptII*. Фрагмент *EcoRI-NcoI* бінарного вектора pCB064 [39], який містить промотор 35S (1338 п.н.), було заміщено послідовністю промотору *Mll* (*EcoRI-NcoI* розміром 1735 п.н.), клонованого нами раніше [40]. Усі маніпуляції з ДНК проводили відповідно до [41] та рекомендацій виробника ендонуклеаз рестрикції, лігази і Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Fermentas, Литва). Плазмідну ДНК бінарного вектора pCB158 було перенесено до агропінового штаму *A. rhizogenes* A4, який у подальшому використовували для генетичної трансформації рослин.

Бактерії вирощували на середовищі LB [41] з карбеніциліном (100 мг/л) упродовж 24 год при температурі 28 °C. Бактеріальні

клітини осаджували центрифугуванням (3 000g, 10 хв), осад ресуспендували в розчині 10 мМ MgSO₄. Рослини розділяли на окремі листочки, які інкубували в бактеріальній суспензії 30 хв, промокали фільтрувальним папером та культивували протягом двох діб на середовищі 1/2 МС. Потім експланти переносили на середовище 1/2 МС, до якого додали 25 мг/л канаміцину та 600 мг/л цефатоксиму.

Сумарну ДНК виділяли з асептичних рослин ЦТАБ-методом [42]. ПЛР геномної ДНК проводили на ампліфікаторі Mastercycler personal 5332 (Eppendorf). Реакційна суміш складалася з однократного ПЛР-буфера із сульфатом амонію, 0,2 мкМ відповідних праймерів, 200 мкМ кожного з дезоксинуклеозидтрифосфатів, 0,5 од. Таq-полімерази, 10–50 нг ДНК-проби. Загальний об'єм реакційної суміші становив 20 мкл. При цьому використовували праймери, специфічні до кодувальної частини генів *nptII*, *esxA*, *fbpB^{ΔTMD}*, *rolB* (табл.).

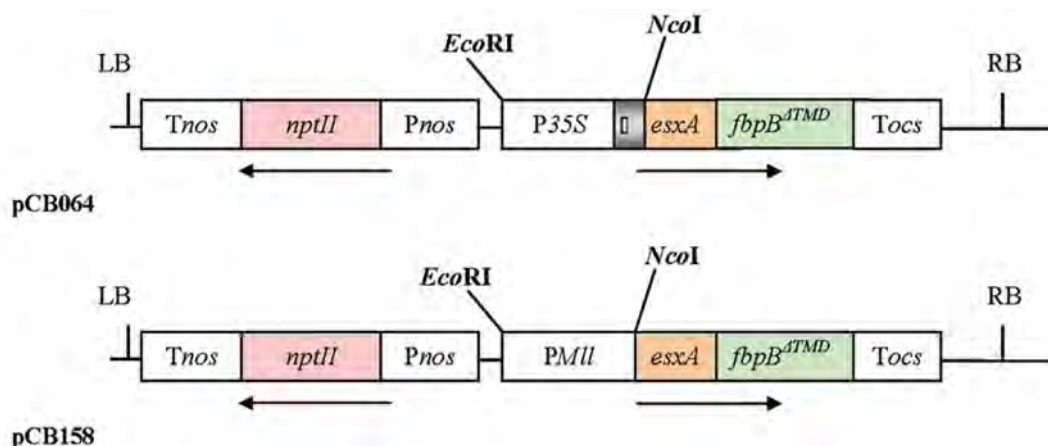


Рис. 2. Схематичне зображення Т-ДНК бінарних векторів pCB064 та pCB158

Праймери, що їх було використано для ПЛР-аналізу присутності генів *nptII*, *esxA*, *fbpB^{ΔTMD}*, *rolB*

Ген	Праймери	Розмір ампліфікованого фрагмента, п. н.
<i>nptII</i>	5'-cctgaatgaactccaggacaggca-3' 5'-gctctagatccagagtcgccgctcagaag-3'	622
<i>esxA</i>	5'-ctgaccatggcagagcagcagtggaatttcgc-3' 5'-gagaattctgcgaacatcccagtgctcg-3'	299
<i>fbpB^{ΔTMD}</i>	5'-tctacagcgactggtagcagc-3' 5'-tcaggttgctgctacgaacg-3'	484
<i>rolB</i>	5'-atggatccaaattgctattcttccacga-3' 5'-ttaggtctctttcttcagggttactgcagc-3'	780

Умови ампліфікації: первинна денатурація — 94 °C, 3 хв, потім 30 циклів ампліфікації (94 °C, 30 с — 62 °C, 30 с — 72 °C, 30 с), кінцевий синтез — 72 °C, 3 хв. Для детекції *rolB* у циклах ампліфікації тривалість синтезу була дещо довша — 40 с (72 °C).

Результати та обговорення

У процесі стерилізації рослин спостерігалася висока чутливість їх до використовуваного стерилізаційного агента. Так, якщо під час обробки препаратом «Білизна» (1:5) протягом 1 хв виживало 100% експлантів, то зі збільшенням терміну стерилізації до 5 та 10 хв виживання рослин становило відповідно 5 і 1%; бактеріальної та мікроміцетної контамінації виявлено не було.

Стерильні рослини трансформували за допомогою *A. rhizogenes* за методикою, описаною в розділі «Матеріали і методи». Відомо, що процес агробактеріальної трансформації включає кілька етапів: прикріплення бактерій до рослинних клітин; перенесення частини бактеріального геному; вбудовування перенесених генів. У зв'язку з цим необхідно протягом певного часу культивувати рослинні експланти з культурою бактерій, а далі переносити їх на середовища з антибіотиком, що перешкоджає росту агробактерій. У наших експериментах листеці протягом двох днів витримували на середовищі МС, після чого додавали цефатоксим для елімінації агробактерій та канаміцин для селекції трансформованих рослин. Попередніми експериментами було визначено, що використання канаміцину в концентрації 25 мг/л дає змогу проводити селекцію трансформованих рослин за ознакою збереження зеленого забарвлення.

Процес росту нових листеців із кишеньок експлантів, підданих трансформації, розпочинався через 2–3 дні. Через 2 тижні було відібрано 2 клони, листеці яких мали зелене забарвлення на селективному середовищі, що становило 2% від загальної кількості експлантів. Рослини розмножували шляхом відокремлення і вирощували впродовж 3 місяців на селективному середовищі (рис. 3).

Оскільки для трансформації використовували бактерії *A. rhizogenes*, можна було очікувати інтенсивного росту коренів та вияву специфічних для трансформованих цією бактерією особливостей (наприклад, відсутності позитивного геотропізму) [43]. Однак, відібрані під час селекції рослини за розмірами, морфологією не відрізнялися від контрольних нетрансформованих. Вони так само утворювали нові листеці та мали по одному корінцю завдовжки близько 10 мм (або ж корінці були відсутні). Подібну пряму регенерацію трансгенних рослин з експлантів (без стадії коренеутворення) після трансформації за допомогою *A. rhizogenes* описано для троянди [44], киви [45], лайму [46] та цукрового буряку [47]. Хоча слід зазначити, що

в цитованих роботах, на відміну від наших експериментів, поряд із регеноерованими рослинами формувалися також «бородаті корені».

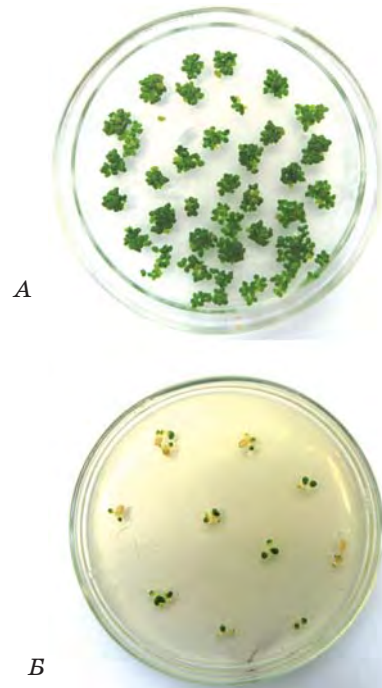


Рис. 3. Трансформовані (А) та контрольні (Б) рослини ряски на середовищі з 25 мг/л канаміцину

Як відомо, плазмід *pRi* агропінових штамів *A. rhizogenes* має два окремих фрагменти Т-ДНК, що переносяться до рослинної клітини: правий Т_Р-ДНК і лівий Т_Л-ДНК [48]. Останній містить гени *rolA*, *B*, *C*, *D*, які задіяні в процесі коренеутворення і відповідають за специфічність фенотипу «бородатих коренів» [49]. Т_Л- і Т_Р-ДНК переносяться в геном незалежно, тому трансформовані кореневі культури й отримані з них рослини можуть розрізнятися за кількістю копій, довжиною фрагментів, а також сайтами інтеграції Т-ДНК [50]. Інтеграція Т-ДНК бінарного вектора також відбувається незалежно, завдяки чому можна одержати трансгенні рослини, які містять лише Т-ДНК бінарного вектора без Т_Л- і Т_Р-ДНК з онкоплазмиди *pRi* у разі прямої регенерації рослин (без стадії «бородатих коренів») на селективному середовищі. У випадку, коли відбирають кореневі культури, фенотип яких зумовлений кількістю та експресією перенесених *rol*-генів Т_Л-ДНК, трансгенні рослини, які регенерують з таких культур, містять як трансгени бінарного вектора, так і *rol*-гени. Проте в наступних поколіннях під час мейозу може відбутися генетична сегрегація Т-ДНК, що дозволяє отримати нормальні

за фенотипом трансгенні рослини, які містять лише Т-ДНК бінарного вектора без генів *pRi* та асоційованих із цим морфологічних змін [51, 52].

У наших дослідках відсутність появи коренів специфічного фенотипу можна пояснити тим, що в процесі трансформування рослин ряски не відбулося перенесення *rol*-генів *A. rhizogenes* до рослинного геному, що й було підтверджено ПЛР-аналізом трансформованих клонів (рис. 4). Ампліфікацією сумарної ДНК з використанням праймерів, специфічних до гена *rolB*, який поряд з іншими генами *rol*-локуса задіяний у процесі коренеутворення і відповідає за фенотип «бородатих коренів», не виявлено фрагмента очікуваного розміру (780 п. н.).

Аналіз ДНК рослин ряски на присутність селективного та цільового генів показав наявність як селективного, так і цільових генів (рис. 4). Аналіз на вміст *vir*-генів виявився негативним, отже одержані рослини були вільні від бактерій, використовуваних для трансформації. Таким чином, дійсно відбулося перенесення селективного та цільових генів до рослинних клітин.

Агробактерії як засіб перенесення генів використовують переважно для трансформування дводольних рослин. Застосування цього способу трансформації для рослин класу однодольних є обмеженим унаслідок природного бар'єра, який перешкоджає взаємодії бактерій та рослинних клітин [53]. Це пов'язано, зокрема, з тим, що рослини класу однодольних не виділяють специ-

фічних сигнальних сполук, які активізують гени вірулентності агробактерій. Використання таких сполук (наприклад, ацетосерингону) в процесі трансформування рослин дає можливість зняти природну перешкоду та отримувати трансгенні однодольні рослини із застосуванням *Agrobacterium* [18].

В описаних у літературі експериментах з агробактеріальної трансформації ряскових застосовували ацетосерингон [18, 27], клітинну суспензію дводольних рослин (наприклад, 1–10% -ну суспензію клітин *Nicotiana tabacum*) та інші сполуки або специфічні для цих рослин лінії *Agrobacterium* (*A. tumefaciens* EHA105, EHA101, GVE3103) [35] з метою подолання бар'єру та перенесення трансгенів. Окрім того, автори зазначення публікацій піддавали трансформуванню калюсні тканини з метою отримання шляхом регенерації трансгенних рослин.

У наших експериментах не використовували ацетосерингон під час трансформування рослин ряски за допомогою *A. rhizogenes*. У результаті зі 100 експлантів отримали лише два трансформовані клони, отже, частота трансформації була невисокою. За даними літератури, відсоток трансгенних рослин родини *Lemnaceae* у разі агробактеріальної трансформації за допомогою *A. tumefaciens*, навіть з використанням спеціальних сигнальних сполук (наприклад, ацетосерингону), коливається у широких межах та значною мірою є видозалежним. Так, цей показник становив 92% для *Spirodela punctata*, 14% — для *Lenma obscura*, 8% —

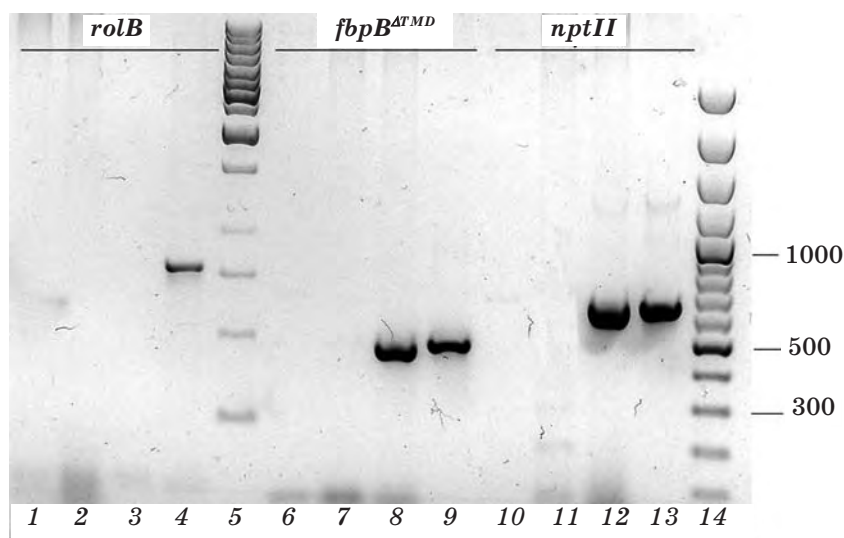


Рис. 4. Електрофореграма продуктів ампліфікації *rolB* (1–4), *fbpB^{ATMD}* (6–9) та *nptII* (10–13):

1, 6, 10 — негативний контроль, без ДНК-матриці; 2, 7, 11 — ДНК вихідної нетрансформованої рослини; 3, 8, 12 — ДНК рослини ряски, трансформованої *A. rhizogenes* pCB158; 4, 9, 13 — позитивний контроль, сумарна ДНК *A. rhizogenes* pCB158; 5, 14 — ДНК-маркери (O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, Fermentas)

Lemna gibba, 9% — *Wolffia australiana*, 0,1% — для *Wolffia brasiliensis* [35]. Разом з тим, цілком очевидно, що ряска, яка належить до класу однодольних, може бути трансформована з використанням агробактерій, зокрема *A. rhizogenes*, і без застосування ацетосерингону або інших сполук.

Наші експерименти відрізнялися від попередніх, проведених іншими авторами [18, 27, 35], тим, що: 1) як засіб перенесення чужорідних генів використовували *A. rhizogenes*; 2) не застосовували ацетосерингон чи іншу сполуку, що уможливило трансформацію рослин, які не синтезують специфічних сигнальних сполук; 3) для трансформації використовували листеці та вегетативне розмноження без стадій калусоутворення і регенерації.

Отримані результати свідчать про те, що:

- *A. rhizogenes* можна застосовувати для перенесення чужорідних генів до рослин ряски;
- очевидно, ряска *L. minor* деякою мірою синтезує сигнальні сполуки, необхідні для перенесення генів з агробактерій до рослин

ЛІТЕРАТУРА

1. Lemon G. D., Posluszny U., Husband B. C. Potential and realized rates of vegetative reproduction in *Spirodela polyrhiza*, *Lemna minor* and *Wolffia borealis* // Aquat. Bot. — 2001. — V. 70, N 1. — P. 79–87.
2. Geoffroy L., Frankart C., Eullaffroy P. Comparison of different physiological parameter responses in *Lemna minor* and *Scenedesmus obliquus* exposed to herbicide flumioxazin // Environm. Pollut. — 2004. — V. 131, N 2. — P. 233–241.
3. Srivastav R. K., Gupta S. K., Nigam K. D. P., Vasudevan P. Treatment of chromium and nickel in wastewater by using aquatic plants // Water Res. — 1994. — V. 28, N 7. — P. 1631–1638.
4. Drost W., Matzke M., Backhaus T. Heavy metal toxicity to *Lemna minor*: studies on the time dependence of growth inhibition and the recovery after exposure // Chemosphere. — 2007. — V. 67, N 1. — P. 36–43.
5. Horvat T., Vidakovic-Cifrek Z., Orescanin V. et al. Toxicity assessment of heavy metal mixtures by *Lemna minor* L. // Sci. Tot. Environ. — 2007. — V. 384, N 1–3. — P. 229–238.
6. Bergmann B. A., Classen J., Cheng J., Stomp A.-M. In vitro selection of duckweed geographical isolates for potential use in swine lagoon effluent renovation // Bioresource Technol. — 2000. — V. 73, N 1. — P. 13–20.
7. Appenroth K.-J., Krech K., Keresztes A. et al. Effects of nickel on the chloroplasts of the duckweeds *Spirodela polyrhiza* and *Lemna minor* and their possible use in biomonitoring

них клітин. Імовірно, концентрація їх є невеликою, про що свідчить низька ефективність одержання трансформованих рослин без використання ацетосерингону (2 клони зі 100 експлантів);

– трансгенні рослини ряски можна отримати за допомогою *A. rhizogenes* прямою регенерацією та подальшим вегетативним розмноженням без проміжних стадій калусоутворення і регенерації. Такий спосіб дає змогу істотно скоротити час, необхідний для отримання трансформованих рослин, адже шляхом трансформування калусних тканин трансгенні рослини можна одержати приблизно через 12–16 тижнів після кокультивування з агробактеріями [18], а в разі прямої регенерації — через 2–3 тижні;

– є можливість отримати трансгенні рослини ряски, що мають цільові гени туберкульозних антигенів ESAT6 та Ag85B. Такі рослини можуть становити практичний інтерес виходячи з фізіологічних особливостей ряски — швидкого вегетативного розмноження та невибагливості до умов росту.

- and phytoremediation // Chemosphere. — 2010. — V. 78, N 3. — P. 216–223.
8. Teisseire H., Guy V. Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*) // Plant Sci. — 2000. — V. 153, N 1. — P. 65–72.
9. Rai P. K. Phytoremediation of heavy metals in a tropical impoundment of industrial region // Environ. Monit Assess. — 2010. — V. 165, N 1–4. — P. 529–537.
10. Rahman M. A., Hasegawa H., Ueda K. et al. Arsenic accumulation in duckweed (*Spirodela polyrhiza* L.): A good option for phytoremediation // Chemosphere. — 2007. — V. 69, N 3. — P. 493–499.
11. Upadhyay A. R., Mishra V. K., Pandey S. K., Tripathi B. D. Biofiltration of secondary treated municipal wastewater in a tropical city // Ecol. Engin. — 2007. — V. 30, N 1. — P. 9–15.
12. Dosnon-Olette R., Couderchet M. L., Eullaffroy P. Phytoremediation of fungicides by aquatic macrophytes: Toxicity and removal rate // Ecotoxicol. Environ. Safety. — 2009. — V. 72, N 8. — P. 2096–2101.
13. Hurd N. A., Sternberg S. P. Bioremoval of aqueous lead using *Lemna minor* // Int. J. Phytoremed. — 2008. — V. 10, N 4. — P. 278–288.
14. Хасина Э. И., Сгребнева М. Н., Оводова Р. Г. и др. Гастроцитопротективное действие лемнана, пектинового полисахарида, выделенного из ряски малой *Lemna minor* L. // ДАН. — 2003. — Т. 390, № 3. — С. 413–415.
15. Cheng L., Kindel P. K. Detection and homogeneity of cell wall pectic polysaccharides of

- Lemna minor* // Carb. Res. — 1997. — V. 301, N 3–4. — P. 205–212.
16. Ovodov Y. S., Ovodova R. G., Popov S. V., Bil'kova T. B. Studies on Lemnan from *Lemna minor* in a comparison with zosteran as apiogalacturonan pectic polysaccharide from zosteraceae family // Abstr. XIXth Intern. Carbohydr. Symp. San Diego, August 9–14, 1998, P. DP041.
17. Rusoff L. L., Blakeney Jr. E. W., Dudley D. Culley Jr. Duckweeds (Lemnaceae family): a potential source of protein and amino acids // J. Agric. Food Chem. — 1980. — V. 28, N 4. — P. 848–850.
18. Yamamoto Y. T., Rajbhandari N., Lin X. H. et al. Genetic transformation of duckweed *Lemna gibba* and *Lemna minor* // In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. — 2001. — V. 37, N 3. — P. 349–353.
19. Stomp A. M. The duckweeds: a valuable plant for biomanufacturing // Biotechnol. Annu. Rev. — 2005. — V. 11, N 1. — P. 69–99.
20. Moon N. K., Stomp A. M. Effects of medium components and light on callus induction, growth, and frond regeneration in *Lemna gibba* (Duckweed) // In Vitro Cell. Develop. Biol. Plant. — 1997. — V. 33, N 1. — P. 20–25.
21. Stefaniak B., Woznyu A., Budna I. Callus induction and plant regeneration in *Lemna minor* L. // Biol. Plant. — 2002. — V. 45, N 3. — P. 469–472.
22. Li J., Jain M., Vunsh R. et al. Callus induction and regeneration in *Spirodela* and *Lemna* // Plant Cell Rep. — 2004. — V. 22, N 7. — P. 457–464.
23. Kruse C., Boehm R., Voeste D. et al. Transient transformation of *Wolffia columbiana* by particle bombardment // Aquat. Bot. — 2002. — V. 72, N 2. — P. 175–181.
24. Boenm R., Kruse C., Voeste D. et al. A transient transformation system for duckweed (*Wolffia columbiana*) using *Agrobacterium*-mediated gene transfer // J. Appl. Bot. — 2001. — V. 75, N 3–4. — P. 107–111.
25. Okubara P. A., Williams S. A., Doxsee R. A., Tobin E. M. Analysis of genes negatively regulated by phytochrome action in *Lemna gibba* and identification of a promoter region required for phytochrome responsiveness // Plant Physiol. — 1993. — V. 101, N 3. — P. 915–924.
26. Гайдюкова С. Е., Ракитин А. Л., Равин Н. В. и др. Разработка системы генетической трансформации ряски малой (*Lemna minor*) // Экол. генет. — 2008. — Т. 6, № 4. — С. 13–15.
27. Cox K. M., Sterling J. D., Regan J. T. et al. Glycan optimization of a human monoclonal antibody in the aquatic plant *Lemna minor* // Nat. Biotechnol. — 2006. — V. 24, N 1. — P. 1591–1597.
28. Rival S., Wisniewski J.-P., Langlais A. et al. *Spirodela* (duckweed) as an alternative production system for pharmaceuticals: a case study, aprotinin // Transgen. Res. — 2008. — V. 17, N 4. — P. 503–513.
29. Sun Y., Cheng J. J., Himmel M. E. et al. Expression and characterization of Acidothermus cellulolyticus E1 endoglucanase in transgenic duckweed *Lemna minor* 8627 // Bioresour. Technol. — 2007. — V. 98, N 15. — P. 2866–2872.
30. De Leede L. G., Humphries J. E., Bechet A. C. et al. Novel controlled-release Lemna-derived IFN-alpha2b (Locteron): pharmacokinetics, pharmacodynamics, and tolerability in a phase I clinical trial // J. Interfer. Cytokine Res. — 2008. — V. 28, N 2. — P. 113–122.
31. Woodard S. L., Wilken L. R., Barros G. O. et al. Evaluation of monoclonal antibody and phenolic extraction from transgenic Lemna for purification process development // Biotechnol. Bioeng. — 2009. — V. 104, N 3. — P. 562–571.
32. Stomp A.-M., Rajbhandari N. Method for producing stably transformed duckweed using microprojectile bombardment // United States Patent 7161064 Application Number: 10/273974 Publication Date: 01/09/2007.
33. Cox K., Peele C. Chloroplast transformation of duckweed // WO/2005/005643, PCT/US2004/021106 Publication Date: 20.01.2005 International Filing Date: 30.06.2004.
34. Stomp A.-M., Rajbhandari N. Genetically engineered duckweed // United States Patent 6040498 Application Number: 09/132536 Publication Date: 03/21/2000.
35. Edelman M., Perl A., Flaishman M., Blumental A. Transgenic Lemnaceae. International Application published under the PCT WO/1999/019498 P. 1–56.
36. Tepfer D. Genetic transformation using *Agrobacterium rhizogenes* // Physiol. Plant. — 1990. — V. 79, N 1. — P. 140–146.
37. Akutsu M., Ishizaki T., Sato H. Transformation of the monocot *Alstroemeria* by *Agrobacterium rhizogenes* // Mol. Breed. — 2004. — V. 13, N 1. — P. 69–78.
38. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture // Phys. Plant. — 1962. — V. 15, N 3. — P. 473–497.
39. Матвеева Н. А., Василенко М. Ю., Шаховский А. М., Кучук Н. В. Агробактериальная трансформация салата (*Lactuca sativa* L.) конструкциями, несущими бактериальные гены из *Mycobacterium tuberculosis* // Цитология и генетика. — 2009. — Т. 43, № 2. — С. 27–32.
40. Кищенко Е. М. Особенности экспрессии репортерного гена β-глюкуронидазы под контролем 35S- и Mtl- промоторов в трансгенных растениях // Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр. / НАН України, УААН, АМН України, Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М. І. Вавилова; редкол.: В. А. Кунах (голов. ред.) та ін. — Т. 7. — К.: Логос, 2010.

41. Маниатис Т., Фрич Е. Ф., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование — М.: Мир, 1984. — 480 с.
42. Дрейпер Дж., Скотт Р. Выделение нуклеиновых кислот из клеток растений. / Генная инженерия растений. — М.: Мир, 1991. — С. 241–245.
43. Veena V., Taylor C. G. *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications // In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. — 2007. — V. 43, N 5. — P. 383–403.
44. Firoozabady E., Moy Y., Courtney-Gutterson N., Robinson K. Regeneration of transgenic rose (*Rosa hybrida*) plants from embryogenic tissue // Biotechnology. — 1994. — V. 12. — P. 609–613.
45. Yamakawa Y., Chen L. H. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) by direct formation of adventitious buds // J. Jap. Soc. Hort. Sci. — 1996. — V. 64. — P. 741–747.
46. Perez-Molphe-Balch E., Ochoa-Alejo N. Regeneration of transgenic plants of Mexican lime from *Agrobacterium rhizogenes*-transformed tissues // Plant Cell Rep. — 1998. — V. 17. — P. 591–596.
47. Кищенко Е. М., Комарницкий И. К., Кучук Н. В. Получение трансгенных растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) с помощью *Agrobacterium rhizogenes* // Цитология и генетика. — 2005. — Т. 39, № 1. — С. 9–13.
48. Huffman G. A., White F. F., Gordon M. P., Nester G. W. Hairy root inducing plasmid: physical map and homology to tumor inducing plasmids // J. Bacteriol. 1984. — V. 157. — P. 269–276.
49. White F. F., Taylor B. H., Huffman G. A. et al. Molecular and genetic analysis of the transferred DNA regions of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes* // Ibid. — 1985. — V. 164. — P. 33–44.
50. Jouanin L., Guerche P., Pamboukdjian N. et al. Structure of T-DNA in plants regenerated from roots transformed by *Agrobacterium rhizogenes* strain A4 // Mol. Gen. Genet. — 1987. — V. 206. — P. 387–392.
51. Hatamoto H., Boulter M. E., Shirsat A. H. et al. Recovery of morphologically normal transgenic tobacco from hairy roots cotransformed with *Agrobacterium rhizogenes* and a binary vector plasmid // Plant Cell Rep. — 1990. — V. 9. — P. 88–92.
52. Braun R. H., Reader J. K., Christey M. C. Evaluation of cauliflower transgenic for resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* // Acta Hort. — 2000. — V. 539. — P. 137–143.
53. Armitage P., Walden R., Draper J. Vectors for transformation of higher plants / Walden (ed), Plant Genetic Transformation and Gene Expression, Blackwell Sci. Pub., Oxford, 1992. — P. 1–67.

**ПЕРЕНОС В РАСТЕНИЯ РЯСКИ
Lemna minor L. ГЕНОВ ТУБЕРКУЛЕЗНЫХ
АНТИГЕНОВ ESAT6 И AG85B
С ПОМОЩЬЮ *Agrobacterium rhizogenes***

Н. А. Матвеева, Е. М. Кищенко,
А. М. Шаховский, М. В. Кучук

Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев

E-mail: joyna56@gmail.com

Разработана методика генетической трансформации ряски *Lemna minor* L. (*Lemnaceae*, *Monocotyledons*) с помощью *Agrobacterium rhizogenes* без использования ацетосерингона. Трансгенные растения ряски с генами туберкулезных антигенов ESAT6 и Ag85B были получены с частотой 2% прямой регенерацией из пазушных меристем без стадий образования «бородатых корней» и каллуса. Такая методика позволяет значительно сократить время получения трансгенных растений и создавать трансформированные растения ряски с генами, представляющими практический интерес.

Ключевые слова: *Lemna minor*, *Agrobacterium rhizogenes*, генетическая трансформация, гены туберкулезных антигенов ESAT6 и Ag85B.

***Agrobacterium rhizogenes*-MEDIATED
TRANSFER OF TUBERCULOSIS
ANTIGENS ESAT6 AND AG85B GENES
Lemna minor L.**

N. A. Matvieieva, O. M. Kishchenko,
A. M. Shakhovsky, M. V. Kuchuk

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of National Academy of Sciences of Ukraine, Kiyv

E-mail: joyna56@gmail.com

Agrobacterium rhizogenes-mediated method for genetic transformation of duckweed *Lemna minor* L. (*Lemnaceae*, *Monocotyledons*) without acetosyringone treatment was developed. Transgenic duckweed plants with genes of tuberculosis antigens ESAT6 and Ag85B were obtained with frequency 2% by direct regeneration from axillary meristem without hairy root or callus stage. Developed technique enables to scale down the time for transgenic plant obtaining and to create duckweed plants transformed with genes of interest.

Key words: *Lemna minor*, *Agrobacterium rhizogenes*, genetic transformation, genes of tuberculosis antigens ESAT6 and Ag 85B.