

© С. Е. Гайдукова,
А. Л. Ракитин, Н. В. Равин,
К. Г. Скрябин,
А. М. Камионская

РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ РЯСКИ МАЛОЙ *LEMNA MINOR*

ВВЕДЕНИЕ

Центр «Биоинженерия»
Российской академии наук,
Москва

✿ Оптимизированы параметры регенерации *in vitro*, подобраны условия эффективного селективного отбора трансформированной ткани, получены трансгенные растения *Lemna minor* и проведен их молекулярный анализ, подтвердивший интеграцию целевого гена в геном ряски и его экспрессию. Оптимизированная нами методика трансформации может быть использована для создания трансгенных растений ряски — продуцентов рекомбинантных белков медицинского назначения и биоремедиаторов водоемов.

✿ **Ключевые слова:** *Lemna minor*; генетическая инженерия; трансформация растений; *Agrobacterium*.

Lemna minor (ряска малая) — однодольное покрытосеменное растение семейства Lemnaceae. Представители рода *Lemna* распространены повсеместно, как в странах с умеренным, так и с тропическим климатом. Ряска — одно из наиболее редуцированных цветковых растений, у которого отсутствует расчленения на стебель и лист, а сам организм представляет собой фотосинтезирующую пластинку (листец) с корнем и боковыми пластинчатыми побегами. Представители семейства Lemnaceae размножаются в основном вегетативно и легко переносятся с течением рек и птицами на большие расстояния, при этом цветут крайне редко. В последнее время большинство видов Lemnaceae расширяют свои ареалы обитания из-за потепления климата и эвтрофикации многих водоемов.

Необычные свойства этих мелких цветковых растений позволяют использовать их для решения самых разнообразных проблем — от получения кормов для животных до применения в сложных биотехнологических процессах. Кроме того, растения ряски в силу нетребовательности к среде, небольших размеров и простоты строения рассматривают как модельный объект для морфогенетических, физиологических, биохимических исследований, анализа географического и межвидового генетического полиморфизма (Рыжова Н. Н. и др., 2006; Мартиросян Е. В. и др., 2008). В настоящее время определена последовательность хлоропластного генома *Lemna minor* (Mardanov et al., 2008), реализуется проект по полной расшифровке генома другого представителя рясковых, *Spirodela polyrhiza*.

Перспективным является применение растений ряски для биоремедиации сточных вод. Растения семейства Lemnaceae устойчивы к высоким концентрациям вредных веществ, которые поступают в водоемы с отработанными коммунальными, сельскохозяйственными и промышленными водами. Благодаря быстрому росту растения ряски поглощают огромное количество вредных веществ, тем самым очищая воду (Mackenzie et al., 2002; Cascone et al., 2004; Mkandawire et al., 2005). Наряду с этим некоторые токсичные вещества могут вызывать повреждения у растений, что может быть использовано для биомониторинга качества воды (Hubálek et al., 2007; Stesovic et al., 2007).

Большой интерес вызывает получение трансгенных растений ряски. Одним из перспективных направлений биотехнологии в настоящее время является создание растений-биофабрик, которые способны продуцировать рекомбинантные белки. Растительные биофабрики являются безопасной и рентабельной альтернативой традиционным системам экспрессии — культурам клеток микроорганизмов и млекопитающих. Растения не требуют для своего выращивания специальных условий и оборудования; в отличие от бактериальных систем, в растениях возможно осуществление посттрансляционных модификаций, которые в ряде случаев являются необходимым этапом получения функционального белка. Кроме того, получение

Поступила в редакцию 02.06.2008
Принята к публикации 25.09.2008

Таблица 1

Результаты опыта по определению оптимального варианта обеззараживания исходного растительного материала

Вариант опыта (сочетание и экспозиция стерилизующих агентов)	Процент обеззараженных растений	Процент обеззараженных растений, давших потомство
4 %-й гипохлорит (4 минуты), 70 %-й спирт (30 секунд)	67,3 ± 6,1	47,1 ± 3,8
0,002 %-й мирамистин (4 минуты), 70 %-й спирт (30 секунд)	32,0 ± 4,4	15,5 ± 5,8
Фунгицид «Топаз» в концентрации 0,03 г/л (4 минуты), 4 %-й гипохлорит (4 минуты), 70 %-й спирт (30 секунд)	23,4 ± 7,7	0
Нистатин (4 минуты) в концентрации 0,75 г/л, 4 %-й гипохлорит (4 минуты), 70 %-й спирт (30 секунд)	18,8 ± 3,7	9,6 ± 5,1

Таблица 2

Варианты опыта с различными сочетаниями регуляторов роста растений (РРР)

Варианты	Концентрация РРР, мг/л	
	2,4-Д	БАП
1	10	1
2	10	2
3	10	3
4	20	1
5	20	2
6	20	3
7	30	1
8	30	2
9	30	3

рекомбинантных белков в системах на основе растительных клеток является безопасным, поскольку растения и человек не имеют общих патогенов. Важным преимуществом Рясковых по сравнению с другими растениями для биотехнологической индустрии является их способность к быстрому вегетативному размножению. Разработка надежных методов генетической трансформации Рясковых необходима для создания растений — продуцентов рекомбинантных белков, а также модифицированных растений — эффективных биоремедиаторов экологически неблагополучных водоемов.

В данной работе решена задача разработки эффективного протокола генетической трансформации ряски.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал. Материалом для работы служили растения *Lemna minor*, собранные в водоемах Московской области.

Получение асептической культуры ряски. Тестировали 4 варианта обеззараживания растительного материала (табл. 1). После асептизации растения промывали несколько раз в воде и переносили на среду для культивирования. Опыт проводили в 4-кратной повторности, повторность представляла собой чашку Петри с 25 листецами. Эффективность оценивали как отношение числа асептических растений, давших потомство, к общему числу использованных растений.

Состав сред и условия культивирования. С целью подбора оптимальных условий для культивирования растений ряски *in vitro* были протестированы следующие питательные среды: Мурасиге и Скуг (Murashige et al., 1962), Хоагланд (Hoagland et al., 1938), Шенк и Хилдебрандт (Schenk et al., 1972), Гамбург (Gamborg, 1970). Опыт проводили в 4-кратной повторности, повторность представляла собой чашку Петри с 25 листецами. Питательные среды готовили с добавлением витаминов В₅ в концентрации 0,1 г/л (Gamborg, 1970). pH среды доводили до значения 5,7 перед автоклавированием. Стерилизацию сред осуществляли в автоклаве при 1,2 атм., 121 °С в течение 20 минут. Растения культивировали при

температуре 20–25 °С в условиях фотопериода 16 часов день/8 часов ночь.

Индукция каллусообразования. Для индукции каллусообразования использовали следующие типы эксплантов: целое интактное растение (листец), листец с поранением в меристематической области и половинки листецов. Экспланты помещали в чашки Петри, содержащие питательные среды с различными комбинациями регуляторов роста растений № 1–9 (табл. 2), по 25 шт. на чашку и культивировали в течение 12–14 недель. Каждые 20–30 дней переносили экспланты на свежую питательную среду. Эффективность каллусообразования оценивали как отношение числа эксплантов, образовавших каллус, к общему числу эксплантов. Опыт проводили в 4-кратной повторности, повторность представляла собой чашку Петри с 25 листецами.

Индукция регенерации растений из каллуса. Регенерацию растений из морфогенного каллуса проводили на среде без регуляторов роста растений.

Подбор оптимальных концентраций селективных агентов. Листецы помещали по 25 штук на чашку Петри, содержащую среду Хоагланд и витамины, с добавлением различных селективных агентов: фосфинотрицин, глифосат, гиромидин и канамицин в концентрациях от 0,2 мг/л

до 200 мг/л. Опыт проводили в четырехкратной повторности. Пересадку побегов на среду с селективным агентом проводили каждые 14 дней. Оценку действия селективных агентов осуществляли через 2, 4 и 6 недель, при этом учитывали число погибших и выживших растений.

Бактериальный штамм и вектор для генетической трансформации. Для трансформации растений ряски использовали штамм *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (Helens R et al., 2000), содержащий бинарный вектор *pBar UBI*. Этот вектор содержит в пределах Т-ДНК области под контролем промотора *pUbi1* кукурузы ген *bar* (Падегимас Л., 1993), обуславливающий устойчивость к гербицидам на основе фосфинотрицина.

Подготовка агробактериальной культуры к трансформации. Для инокуляции использовали ночную культуру клеток штамма *A. tumefaciens* GV3101, которую культивировали в 5 мл жидкой среды LB с добавлением 50 мг/л рифампицина, 25 мг/л гентамицина и 100 мг/л канамицина в течение суток при 28 °С. Затем ночную культуру разводили в соотношении 1 : 10 средой АВ (Маниатис и др., 1984) с добавлением 200 мМ ацетосиригона. Культивировали при 28 °С до $OD_{600} = 1$. Нарращивание суспензии бактериальных клеток производили в термостатируемом шейкере с круговым вращением (амплитуда 10 см и скорость вращения 220 об/мин).

Со-культивация эксплантов с *Agrobacterium tumefaciens*. Инокуляцию эксплантов с полученной агробактериальной культурой проводили в жидкой питательной среде АВ с добавлением целлита для увеличения количества поранений на единицу площади экспланта при постоянном помешивании 160 об/мин, в течение 10, 20, 30 мин. Затем экспланты высушивали на стерильной фильтровальной бумаге и перекладывали на твердую среду. Со-культивацию проводили на агаризованной среде Хоагланд в течение 3 суток в темноте.

Выделение ДНК из растительного материала. Навеску листочков (100 мг) растирали пестиком в микропробирке. К полученному гомогенату последовательно добавляли 400 мкл ТЕ буфера, 15 мкл SDS (20 %) и 5 мкл протеиназы К (20 мг/мл). Смесь инкубировали при 37 °С в течение часа. Добавляли 100 мкл 5М NaCl и 160 мкл СТАВ/NaCl, тщательно перемешивали. Инкубировали 15 минут при 65 °С. Добавляли равный объем хлороформа и после тщательного встряхивания проводили центрифугирование при 13 000 об/мин в течение 10 минут. Отбирали водную фазу, содержащую экстракт геномной ДНК, и добавляли равный объем хлороформа, тщательно встряхивали смесь и центрифугировали при 13 000 об/мин в течение 10 минут. Отбирали водную фазу и добавляли равный объем изопропанола. Осадок ДНК отбирали центрифугированием при 13 000 об/мин в течение 10 минут. После удаления супернатанта осадок промывали 75%-м этанолом. Осадок ДНК высушивали при 40 °С в течение 30 минут и растворяли в 100 мкл бидистиллированной воды (модифицированная методика Mungay et al., 1980).

ПЦР-анализ первичных трансформантов. Проверку наличия гена *bar* в геноме трансформированных растений проводили с помощью ПЦР. Для детекции *bar* использовали праймеры BarAtf 5'-ggc gga cat gcc gcc ggt ctg cac-3' и BarAtr 5'-cag ccc gat gac agc gac cac gct c-3'. В реакционную смесь добавляли 1 мкл ДНК-матрицы (0,1 мкг/мкл), 1,5 мкл 10-кратного буфера Taq полимеразы, 1,5 мкл праймера BarAtf (10 пм/мкл) и 1,5 мкл праймера BarAtr (10 пм/мкл), 1,5 мкл 2 мМ раствора dNTP, 9 мкл бидистиллированной воды, 0,15 мкл Taq полимеразы (5 U/мкл) (Go Taq Promega).

Схема ПЦР:

1. 95 °С — 2 мин
2. 95 °С — 30 сек
3. 65 °С — 30 сек
4. 72 °С — 40 сек

Шаги 2–4 повторяли 40 раз.

Продукты ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 1 % агарозном геле.

Саузерн-блот анализ трансгенных растений. Для подтверждения факта интеграции Т-ДНК вектора в геном трансформированного растения проводили Саузерн-блот анализ препаратов геномной ДНК.

Одноцепочечный меченый [α -³²P] АТФ зонд получали с помощью ПЦР — амплификации. В качестве матрицы использовали *PstI* фрагмент плазмиды *pBar UBI*, несущий полноразмерный ген *bar*. В реакционную смесь добавляли 2 мкл ДНК-матрицы (0,1 мкг/мкл), 40 мкл 5-кратного буфера Taq полимеразы, 20 мкл MgCl₂ (25 мМ), 20 мкл праймера BarBam (cg gga tcc ta gat ctc ggt gac ggg) (10 пм/мкл), 20 мкл 2 мМ раствора dTTP, dCTP, dGTP; 50 мкл [α -³²P]АТФ (20 МБК), 46 мкл бидистиллированной воды, 2 мкл Taq полимеразы (5 U/мкл) (Go Taq Promega).

Схема ПЦР:

1. 95 °С — 2 мин
2. 95 °С — 30 сек
3. 65 °С — 30 сек
4. 72 °С — 5 мин

Шаги 2–4 повторяли 25 раз.

После проведения ПЦР — амплификации с помощью счетчика импульсов определяли количество включившейся в зонд метки. Очистку зонда от невключившейся метки проводили с помощью набора QIAquick Nucleotide Removal Kit (Qiagen).

При проведении электрофоретического разделения в 1 % агарозном геле на дорожки наносили 15 мкг геномной ДНК, выделенной из контрольного или трансгенного растения и обработанной ферментами рестрикции *PstI* или *BamHI*. Перенос нуклеиновых кислот на нейлоновую мембрану Hybond XL, гибридизацию с радиоактивно-меченым зондом и последующую детекцию проводили в соответствии со стандартными протоколами (Маниатис и др., 1984) (рис. 5А).

Определение экспрессии гена *bar*. Анализ был проведен методом иммуноферментного анализа с помощью Trait LL Lateral Flow Test Kit фирмы Strategic Diagnostics Inc согласно стандартной методике (сайт Strategic Diagnostics Inc: www.sdix.com). Данный набор позволяет детектировать фермент фосфинотрицин-N-ацетилтрансферазу (ФАТ), экспрессируемый геном *bar*, в семенах и растительных тканях. Антитела, специфичные к ферменту ФАТ, связанные с цветным реагентом, располагаются в нижней области тест-полоски. Появление контрольной линии свидетельствовало о правильности проведения опытов. По появлению второй полоски судили об экспрессии белка ФАТ в тестируемых растениях.

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку данных проводили с использованием методики подсчета стандартного отклонения и доверительного интервала (ДИ) с заданным значением достоверности 95 %.

ДИ рассчитывали по формуле:

$$\text{ДИ} = \bar{x} \pm 1,96 \left(\frac{\sigma}{\sqrt{n}} \right),$$

где \bar{x} — среднее значение оцениваемой величины, полученное экспериментально, σ — стандартное отклонение, n — генеральная совокупность, которую рассчитывают по формуле:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\bar{x} - x_i)^2}{(n-1)}}$$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение асептического материала. Наличие асептического растительного материала является необходимым условием для проведения экспериментов *in vitro*. Уже на этапе обеззараживания растительного материала мы столкнулись с трудностями из-за сильной загрязненности растений ряски и высокой степени чувствительности клеток эпидермального слоя к различным видам стерилизующих агентов. Было протестировано 4 варианта сочетаний и экспозиций стерилизующих агентов для получения асептических растений ряски и введения их в культуру *in vitro* (табл. 1). Вариант №1 с использованием 4%-го раствора гипохлорита натрия оказался самым эффективным, так как при обеззараживании данным способом выход асептических растений, способных к размножению, составил в среднем 45–50 %, в то время как при использовании способов № 2–4 (с использованием мирамистина, фунгицида «топаз» и нистатина) данная величина не превышала 10–15 %.

Полученные обеззараженные растения были введены в культуру *in vitro* и использованы в экспериментах по оптимизации параметров регенерации и трансформации.

Подбор состава питательной среды для культивирования. На втором этапе исследования был определен тип питательной среды для культивирования ряски *in vitro*, позволяющий получать наибольший коэффициент размножения растений, который можно будет использовать в трансформационном процессе. По литературным данным, для работы с растениями семейства Рясковые используются следующие типы питательных сред: Мурасиге и Скуг, Гамбург, Шенк и Хилдебрандт, Хоагланд, Ниц и Ниц (Moon et al., 1997; Li et al., 2004; Chang et al., 1978; Stefaniak et al., 2002). Однако большая часть опубликованных работ выполнена на растениях вида *Lemna gibba* (Moon et al., 1997; Li et al., 2004; Chang et al., 1978), распространенного главным образом в районах сухого и мягкого климата Средиземноморья и в тропиках. Для наших исследований наибольший интерес представляет вид *Lemna minor*, имеющий более широкое распространение и произрастающий в умеренной климатической зоне.

Многие исследователи для работы с растениями ряски подбирали тип среды для культивирования в комбинации с регуляторами роста растений, оценивая совместное влияние этих факторов на процессы каллусообразования и регенерации. В таких опытах была использована питательная среда по составу Мурасиге и Скуг как наиболее подходящая для индукции каллусообразования (Stefaniak et al., 2002; Moon et al., 1997; Chang et al., 1978). Сравнение типов сред для культивирования *Lemna minor* в этих работах не проводилось.

Для подбора оптимальной среды для культивирования ряски нами были протестированы наиболее часто используемых в культуре *in vitro* среды — Мурасиге и Скуг, Гамбург, Шенк и Хилдебрандт, Хоагланд. Количественный учет вновь образующихся растений был крайне затруднен из-за высокой скорости их размножения, поэтому критерием для выбора оптимальной среды служила кратность увеличения массы растений после двух недель культивирования.

Через 2 недели культивирования происходило увеличение биомассы растений в среднем в 3 раза на средах Мурасиге и Скуг (МС), Шенк и Хилдебрандт, Гамбург и в 5 раз на среде Хоагланд (табл. 3). Таким образом, наибольший коэффициент размножения растений ряски был отмечен на среде Хоагланд, состав которой отличался самым низким содержанием микро- и макроэлементов из всех тестируемых типов сред. Полученные результаты, вероятно, связаны с тем, что ряске как водному растению, привыкшему к невысокому содержанию питательных веществ в водной среде обитания, наиболее подходит среда с невысокими концентрациями солей.

В дальнейшем все эксперименты проводили с использованием среды Хоагланд (Hoagland et al., 1938).

Оптимизация параметров регенерации *in vitro*. Наличие эффективной и воспроизводимой системы регене-

Таблица 3

Результаты опыта по подбору оптимальной питательной среды для культивирования листецов ряски

Тип среды	Исходный вес растительного материала, мг	Вес растительного материала через 2 недели, мг	Коэффициент размножения*
Мурасиге и Скуг	75	253,5 ± 12,8	3,38 ± 0,17
Гамборг	75	247,5 ± 18,0	3,30 ± 0,24
Шенк и Хилдебрандт	75	211,5 ± 13,5	2,82 ± 0,18
Хоагланд	75	381,0 ± 17,3	5,08 ± 0,23

* — отношение весов растительного материала через 14 дней культивирования к исходному.

рации побегов является необходимым условием получения трансгенных растений. Данные, приведенные в статьях по регенерации растений ряски, довольно противоречивы. Сложность заключается в невозпроизводимости или в крайне низкой степени воспроизводимости опытов одних исследователей другими (Moon et al., 1997; Stefaniak et al., 2002). Кроме того, каждый автор использует индивидуальный подход к способу обработки результатов и трактовке условий проведения экспериментов.

Стефаниак и коллеги пришли к выводу, что повышенная температура (25 °С) и темнота стимулируют процесс каллусообразования (Stefaniak et al., 2002). Фрик с соавторами получал каллус у *L. minor* при непрерывном освещении (Frick et al., 1995). По мнению Мун и Стомп свет — необходимый фактор формирования каллуса у *L. gibba*, несмотря на то что в экспериментах лишь 10 % эксплантов формировали каллус (Moon et al., 1997). Преимущество повышенных температур (25–28 °С) для индукции каллуса у *L. gibba* также продемонстрировали Чанг и Чиу (Chang et al., 1978). В своих экспериментах по индукции каллусообразования мы тестировали интервал температур от 18 °С до 27 °С и различные условия освещения. В наших опытах при отсутствии освещения наблюдалась гибель всех эксплантов. Оптимальными условиями были определены 22–25 °С и фотопериод 16 ч день/8 ч ночь.

Так как ряска — одно из редуцированных покрытосеменных растений, выбор экспланта для получения каллуса довольно ограничен. По мнению Стефаниака, нанесение поранения листецам необходимо для индукции каллуса у *L. minor* и приводит к высокому уровню формирования каллуса — до 89,11 % (Stefaniak et al., 2002). В своих экспериментах мы использовали как целые интактные растения (листецы), так и их половинки и листецы с поранением в меристематической зоне.

В наших экспериментах через четыре недели культивирования в условиях индукции каллусообразования вегетативное размножение прекращалось и наблюдалось формирование каллуса. При этом наблюдали видоизменения листецов, которые проявлялись в увеличении их размера, изменении формы и цвета. Гиалиновая нить, связывающая дочерние растения с материнским, заметно увеличивалась в размерах. Образование каллуса наблюдали через 11–12 недель культивирования.

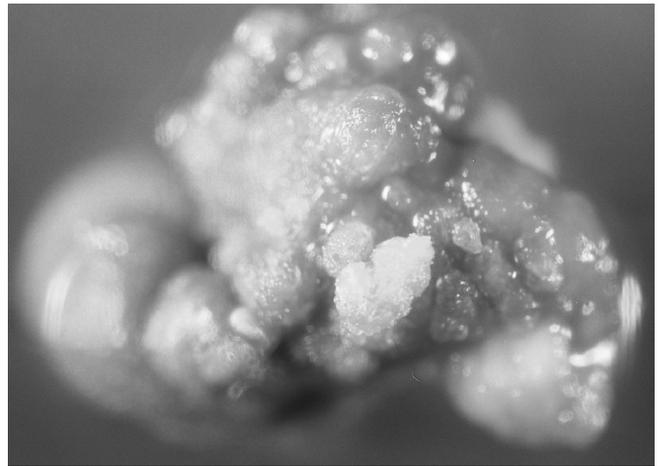


Рис. 1. Морфогенный каллус *Lemna minor* (12 недель с момента индукции) на агаризованной среде Хоагланд

При использовании всех типов эксплантов наблюдали образование каллуса (рис. 1) с частотой от 12 % до 83 % (табл. 4). Каллусообразование с наибольшей частотой (83 %) происходило в варианте № 5, при добавлении в питательную среду 2 мг/л бензиламинопурина (БАП) и 20 мг/л дихлорфеноксисукусной кислоты (2,4-Д) и при использовании в качестве экспланта целого интактного растения.

Для регенерации однодольных растений из каллуса используют различные среды, как с регуляторами роста растений, так и без них. Выбор зависит от генотипа растения и состава среды, используемого для каллусообразования. Мун и Стомп получили регенерацию растений *L. gibba* из каллуса на безгормональной среде. Стефаниак и коллегам не удалось повторить этот опыт, и для регенерации побегов из каллуса ряски исследователи использовали среду с добавлением регуляторов роста растений, в частности цитокининов (Stefaniak et al., 2002). Так как для индукции каллусообразования мы использовали среду с достаточно высоким содержанием регуляторов роста растений, для получения растений-регенерантов решили поместить фрагменты каллуса на среду без регуляторов роста растений. Через неделю после переноса каллуса ряски на безгормональную среду наблюдали начало ре-

Таблица 4

Результаты эксперимента по изучению влияния состава среды и типа экспланта на эффективность каллусообразования

Варианты опыта*	Доля эксплантов (%), образующих каллус		
	Целое интактное растение (листец)	Листец с поранением в меристематической области	Половинки листецов
1	66,0 ± 5,1	54,0 ± 2,3	32,0 ± 2,0
2	74,0 ± 3,9	59,0 ± 3,8	39,0 ± 1,1
3	54,0 ± 2,3	45,0 ± 2,0	21,0 ± 1,3
4	69,0 ± 4,9	60,0 ± 3,2	32,0 ± 2,0
5	81,0 ± 2,0	73,0 ± 3,8	55,1 ± 2,2
6	48,0 ± 3,2	42,0 ± 2,3	25,0 ± 2,5
7	68,0 ± 4,5	55,5 ± 2,0	32,0 ± 2,0
8	76,0 ± 3,2	61,0 ± 3,8	35,9 ± 3,3
9	50,0 ± 2,3	42,0 ± 1,6	14,4 ± 2,4

* — см. табл. 2.

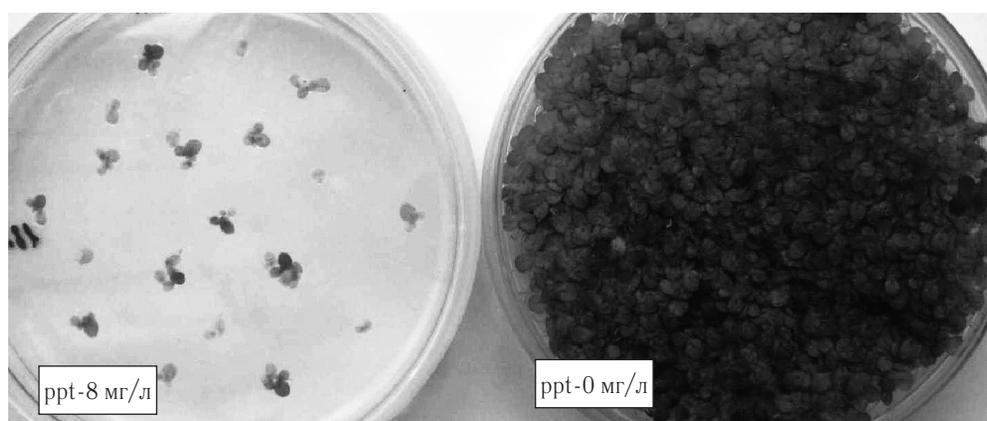


Рис. 2. Листецы ряски малой на средах без селективного агента (справа) и с 8 мг/л фосфинотрицина (слева) через 6 недель культивирования

генерации многочисленных листецов. На каждом фрагменте каллуса образовывалось от 2 до 8 растений. Такой же высокий уровень, 100 % регенерации листецов из каллуса, был получен в работах Стефаниака у растений *L. minor* и Чанга и Чиу у растений *L. gibba* (Chang et al., 1978; Stefaniak et al., 2002). Растения ряски, полученные нами через непрямой органогенез, не отличались по морфологическим характеристикам (таким, как цвет и размер) от контрольных растений.

Селективный отбор. Параллельно с проведением опытов по индукции каллусообразования и регенерации подбирали рабочую концентрацию селективных агентов для последующего отбора трансформированных тканей. Мы использовали различные селективные агенты (глифосат 2,0–16,0 мг/л, гигромицин 0,2–8,0 мг/л, канамицин 50–200 мг/л, фосфинотрицин 0,5–8,0 мг/л), чтобы в дальнейшем расширить спектр использования генетических конструкций. В качестве эксплантов в опытах использовали целые интактные растения (листе-

цы), так как в случае использования для этой цели фрагментов каллуса статистический анализ результатов был бы крайне затруднен. Различия в действии селективных агентов проявлялись в этиолировании листецов, замедлении темпа их пролиферации и уменьшении размеров дочерних листецов (рис. 2). Полученные результаты по определению рабочих концентраций для различных селективных агентов были успешно применены и при работе с фрагментами каллуса.

Учет погибших и выживших растений проводили каждые 2 недели на протяжении 1,5 месяцев, полученные результаты подбора рабочих концентраций в таблице 5.

Получение трансгенных растений. Трансформация двудольных растений с использованием *Agrobacterium tumefaciens* давно стала рутинной процедурой. Проведение экспериментов по генетической трансформации однодольных растений с помощью штаммов *Agrobacterium* затруднено, так как в природе однодольные не являются растениями-хозяевами *Agrobacterium*. Однако на данный

Таблица 5

Результаты опытов по определению рабочей концентрации селективных агентов

Селективный агент	Концентрация (мг/л)	% погибших растений		
		2 недели селекции	4 недели селекции	6 недель селекции
Глифосат (gly)	2,0	20,0 ± 5,5	25,0 ± 3,3	58,0 ± 3,4
	4,0	32,0 ± 5,5	46,0 ± 8,0	69,0 ± 3,3
	8,0	42,0 ± 2,3	67,0 ± 3,3	79,0 ± 4,3
	16,0	47,0 ± 3,8	76,0 ± 2,8	100
Гигромицин (hyg)	0,2	16,8 ± 3,7	32,0 ± 2,0	67,0 ± 3,3
	0,5	27,8 ± 4,6	47,1 ± 2,2	79,0 ± 3,3
	1,0	47,1 ± 2,2	63,2 ± 2,2	86,0 ± 2,0
	2,0	52,9 ± 2,2	76,1 ± 2,2	100
	4,0	64,1 ± 1,9	94,2 ± 2,8	100
	8,0	72,1 ± 2,0	100	100
Канамицин (km)	50	34,0 ± 2,0	53,0 ± 3,8	81,0 ± 3,8
	100	44,0 ± 2,8	70,0 ± 2,3	100
	200	73,3 ± 3,3	100	100
Фосфинотрицин (ppt)	0,5	0	25,0 ± 3,8	51,0 ± 3,8
	1,0	0	33,0 ± 2,0	61,0 ± 3,8
	2,0	0	41,0 ± 3,8	74,0 ± 2,3
	4,0	32,0 ± 3,2	48,0 ± 3,2	87,0 ± 2,0
	8,0	49,0 ± 3,8	73,0 ± 2,0	100

момент известно большое количество работ по успешной агробактериальной трансформации однодольных. Для проведения экспериментов по генетической трансформации растений ряски мы использовали генетическую конструкцию, несущую ген *bar*, обуславливающий устойчивость к гербицидам на основе *L*-фосфинотрицина. Этот ген был клонирован в векторе *pBar UBI* под контролем промотора *pUbi1* кукурузы, активного в клетках однодольных растений (Christensen et al., 1996).

Изначально мы планировали использовать преимущества вегетативного размножения ряски и поэтому трансформировали листочки, которые затем вегетативно размножали на безгормональной среде, содержащей селективный агент. Однако в этих экспериментах трансгенные растения получены не были, что, по всей видимости, связано с низкой частотой переноса Т-ДНК агробактерии в клетки меристемы, из которых в дальнейшем сформировались бы нехимерные растения, несущие вставку.

Далее было решено использовать непрямой органогенез. Экспланты — листочки с поранением в меристематической зоне, после со-культивации помещали на среду для каллусообразования, содержащую 2,4-Д и БАП в концентрациях 20 мг/л и 2 мг/л соответственно. После того, как формировались фрагменты каллуса, их помещали на безгормональную среду, содержащую селективный агент, с целью проведения отбора регенерирующих

листецов. Использование такой схемы также оказалось неэффективным и не привело к получению трансгенных растений, видимо по тем же причинам.

Тогда было решено провести трансформацию непосредственно каллуса. Только при использовании в опытах по трансформации каллусной ткани, поврежденной целлитом, нам удалось получить растения, несущие гетерологичный ген *bar*.

Во время проведения всех экспериментов по трансформации мы отработывали такой важный параметр, как время со-культивации эксплантов с культурой агробактерии. Была определена оптимальная продолжительность по времени инокуляции эксплантов с суспензией клеток бактериальной культуры 20 минут. Так как трансгенные растения удалось получить лишь при использовании каллуса, поэтому эффективное время инокуляции было определено лишь для данного типа экспланта. Увеличение времени инокуляции до 30 минут приводило к сильному агробактериальному заражению, которое было крайне трудно элиминировать. В опытах с продолжительностью инокуляции до 10 минут трансформантов получено не было.

Отбор трансформированных фрагментов каллуса проводили в течение 6 недель на среде, содержащей селективный агент *L*-фосфинотрицин в концентрации 8 мг/л. Затем каллус переносили на безгормональную среду для регенерации, содержащую 8 мг/л фосфинотрицина.

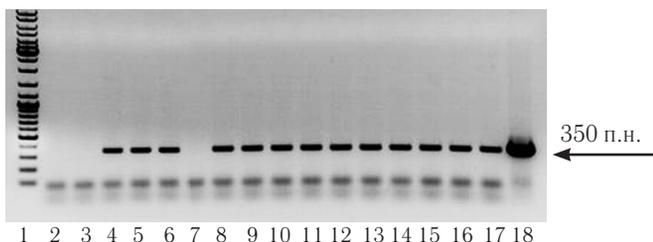


Рис. 3. Электрофоретический анализ результатов ПЦР в 1%-м агарозном геле

1 — маркер молекулярной массы (GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Fermentas); 2 — ПЦР в отсутствие ДНК-матрицы; 3 — в качестве матрицы использовали ДНК, выделенную из нетрансформированного растения; 4–17 — ДНК регенерантов ряски; 18 — ДНК плазмиды *pBar UBI*

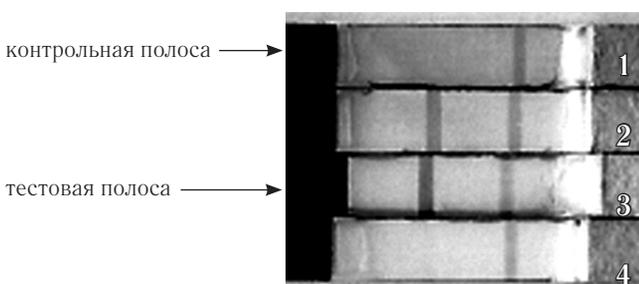


Рис. 4. Анализ экспрессии гена *bar* фермента фосфинотрицин-N-ацетил трансферазы (*pat*) с помощью TRAIT LL Lateral Flow Test kit

1 — контрольное (нетрансформированное) растение; 2–4 — трансформированные растения (наличие 1-й контрольной полосы свидетельствует о корректном прохождении анализа, наличие 2-й тестовой полосы свидетельствует об экспрессии гена *bar*)

Молекулярный анализ полученных трансформантов.

В результате проведения селективного отбора регенерантов было отобрано 27 фосфинотрицин-устойчивых линий. Эти растения анализировали методом ПЦР на присутствие/отсутствие гена *bar* (рис. 3). В результате было показано встраивание данного гена в геном 13 растений ряски.

Экспрессия гетерологичного гена была подтверждена при помощи экспресс-системы Lateral Flow Test в 12 из 13 ПЦР-положительных растений. Мониторинг наличия и экспрессии гена *bar* в поколениях при вегетативном размножении полученных трансгенных растений показал стабильное наследование целевого гена.

Одно из полученных растений (№ 3 на рис. 4) было проанализировано с помощью Саузерн-блоттинга. Полученные результаты (рис. 5Б) подтверждают факт интеграции целевого гена *bar* в геном *L. minor*, в проанализированном растении имеется две копии трансгенной вставки.

ВЫВОДЫ

В результате оптимизации параметров регенерации и трансформации получены трансгенные растения

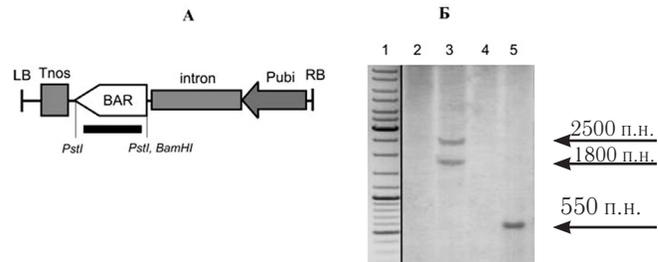


Рис. 5. Схема Т-ДНК вектора и результаты Саузерн-блот анализа

А — Структура Т-ДНК-вектора, использованного для получения трансгенных растений ряски. LB и RB — левая и правая границы Т-ДНК, соответственно; Pubi — промотор Ubi1 гена кукурузы; BAR — ген фосфинотрицинацетилтрансферазы из *Streptomyces hygroscopicus*; Tnos — терминатор гена нопалинсинтазы; Intron — интрон Ubi1 гена кукурузы; *PstI*, *BamHI* — места узнавания эндонуклеаз рестрикции. Положение фрагмента, использованного для синтеза зонда, указано черным прямоугольником.

В — Результаты Саузерн-блот анализа. 1 — маркер молекулярного веса GeneRuler DNA Ladders (Fermentas); 2 — ДНК контрольного растения, обработанная *BamHI*; 3 — ДНК трансгенного растения, обработанная *BamHI*; 4 — ДНК контрольного растения, обработанная *PstI*; 5 — ДНК трансгенного растения, обработанная *PstI*.

Lemna minor. Молекулярный анализ подтвердил интеграцию и экспрессию целевого гена *bar*. Оптимизированная нами методика трансформации может быть использована для создания трансгенных растений ряски — продуцентов рекомбинантных белков и биоремедиаторов водоемов.

Работа поддержана программой фундаментальных исследований Президиума РАН «Биоразнообразие и динамика генофондов».

Литература

1. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж., 1984. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 480 с.
2. Мартиросян Е. В., Рыжова Н. Н., Скрябин К. Г., Кочиева Е. З., 2008. RAPD-анализ геномного полиморфизма у представителей семейства Lemnaceae (Рясковые) // Генетика. Т. 44. № 3. С. 1–5.
3. Падегимас Л., Шульга О., Скрябин К. Г., 1993. Создание трансгенных растений *Nicotiana tabacum* и *Solanum tuberosum*, устойчивых к гербициду фосфинотрицину // Молекулярная биология. Т. 27. С. 947–951.
4. Рыжова Н. Н., Мартиросян Е. В., Колганова Т. В. и др., 2006. Характеристика последовательностей спейсера *trnL-trnF* генов тРНК хлоропластной ДНК представителей рода *Spirodela* семейс-

- тва Рясковых // Молекулярная биология. Т. 40. С. 989–995.
5. Cascone A., Forni C., Migliore L., 2004. Flumequine uptake and the aquatic duckweed, *Lemna minor* L. // Water, Air, and Soil Pollution. Vol. 156. P. 241–249.
 6. Chang W. C., Chiu P. L., 1978. Regeneration of *Lemna gibba* G3 through callus culture // Z. Pflanzphysiol. Vol. 89. P. 91–94.
 7. Christensen A., Quail P., 1996. Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants // Transgenic Research. Vol. 5. P. 213–218.
 8. Frick H., Morley K., 1995. Metabolism of lactose by *Lemna minor* L. (duckweed) callus // Process Biochem. Vol. 30. P. 57–62.
 9. Gamborg O. L., 1970. The effects of amino acids and ammonium on the growth of plant cells in suspension culture // Plant Physiol. Vol. 45. P. 372–375.
 10. Helens R., Mullineaux P., Klee H., 2000. A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors // Trends in Plant Science. Vol. 5a: P. 446–451.
 11. Hoagland D. R., Arnon D. I., 1938. The water-culture method for growing plants without soil // Univ. Calif. Coll. Agric. Exp. Sta. Circ. Berkeley, CA. P. 347–353.
 12. Hubálek T., Vosáhlová S., Matějů V. et al., 2007. Ecotoxicity Monitoring of Hydrocarbon-Contaminated Soil During Bioremediation: A Case Study // Arch. Environ. Contam. Toxicol. Vol. 52. P. 1–7.
 13. Li J., Vunsh R., Vishnevetsky J. et al., 2004. Callus induction and regeneration in *Spirodela* and *Lemna* // Plant Cell Rep. Vol. 22. P. 457–464.
 14. Mackenzie S.M., Waite S., Metcalfe D.J., Joyce C.B., 2003. Landfill leachate ecotoxicity experiments using *Lemna minor* // Water, Air and Soil Pollution. Focus 3. P. 171–179.
 15. Mardanov A. V., Ravin N. V., Kuznetsov B. B. et al., 2008. Complete Sequence of the Duckweed (*Lemna minor*) Chloroplast Genome: Structural Organization and Phylogenetic Relationships to Other Angiosperms // Journal of Molecular Evolution. Vol. 66. P. 555–564.
 16. Mkandawire M., Taubert B., Dudel G., 2005. Resource manipulation in uranium and arsenic attenuation by *Lemna gibba* L. (duckweed) in tailing water or a former uranium mine // Water, Air, and Soil Pollution. Vol. 166. P. 83–101.
 17. Moon H. K., Stomp A. M., 1997. Effects of medium and light on callus induction, growth, and frond regeneration in *Lemna gibba* (duckweed) // In Vitro Cell. Dev. Biol. — Plant. Vol. 33. P. 20–25.
 18. Murashige T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol Plant. Vol. 15. P. 473–476.
 19. Murray M. G., Thompson W. F., 1980. Rapid isolation of high molecular weight DNA // Nucleic Acids Res. Vol. 8(19). P. 4321–4325.
 20. Schenk R. U., Hildebrandt A. C., 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures // Can. J. Bot. Vol. 50. P. 199–204.
 21. Stefaniak B., Woźny A. and Budna I., 2002. Callus induction and plant regeneration in *Lemna minor* L. // Biologia plantarum. Vol. 45(3). P. 469–472.
 22. Stesevic D., Feiler U., Sundic D. et al., 2007. Application of a new sediment contact test with *Myriophyllum aquaticum* and of the aquatic *Lemna* test to assess the sediment quality of Lake Skadar // J. Soils Sediments. Vol. 7(5). P. 342–349.

DEVELOPMENT OF THE DUCKWEED (*LEMNA MINOR*) GENETIC TRANSFORMATION SYSTEM

S. E. Gaydukova, A. L. Rakitin, N. V. Ravin,
K. G. Skryabin, A. M. Kamionskaya

✿ **SUMMARY:** Regeneration parameters were optimized and effective selection conditions were sorted out. Transgenic plants of *Lemna minor* were obtained and their status was confirmed by molecular analysis. Optimized methodology can be used for obtaining transgenic duckweed plants producing recombinant proteins and water body bioremediators.

✿ **KEY WORDS:** *Lemna minor*, genetic engineering, plant transformation, *Agrobacterium*

Информация об авторах:

Гайдукова Софья Евгеньевна, м. н. с., лаборатория генетической инженерии. E-mail: plasmid@yandex.ru.

Ракитин Андрей Львович, с. н. с., лаборатория систем молекулярного клонирования. E-mail: rakitin@biengi.ac.ru.

Равин Николай Викторович, заведующий, лаборатория систем молекулярного клонирования. E-mail: nravin@biengi.ac.ru.

Скрябин Константин Георгиевич, директор. E-mail: akatio@biengi.ac.ru.

Камионская Анастасия Михайловна, ведущий н. с., заместитель директора по науке. E-mail: akatio@biengi.ac.ru.

Общая информация: Центр «Биоинженерия» РАН, 117312, Москва, ул. 60-летия Октября, д. 7, корп. 1.

Centre «Bioengineering» Russian Academy of Sciences, Moscow