

РУДАС В.А.¹✉, МАРКОВСЬКИЙ О.В.¹, ШИНКАРЧУК М.В.^{1,2}, КЛЕБАНОВИЧ А.А.^{1,3},
 МОРГУН Б.В.¹, ОВЧАРЕНКО О.О.¹, ІВАННІКОВ Р.В.⁴, КУЧУК М.В.¹

¹ Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,
 Україна 03143 м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 148, e-mail: rudasv@gmail.com

² Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут»,
 Україна, 03056, м. Київ, пр-т Перемоги, 37, e-mail: malvina.schinkar4uk@yandex.ua

³ Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
 Україна, 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64/13, e-mail: nastia.klebanovych@yandex.ua

⁴ Національний ботанічний сад ім. Гришка НАН України,
 Україна, 01014, м. Київ, вул. Тімірязєвська, 1, e-mail: ivannikov_roman@rambler.ru

✉ rudasv@gmail.com, (095) 716-73-74

ОТРИМАННЯ ТРАНСГЕННИХ РОСЛИН ОРХІДЕЇ *DENDROBIUM LINGUELLA* RCHB. F., ЩО МІСТЯТЬ ГЕНИ *BAR* ТА *СУР11А1* ЦИТОХРОМУ P450scс

Dendrobium linguella Rchb. f. – вид родини Orchidaceae, який використовується для вирощування в кімнатній та оранжерейній культурі. В роботі використали конструкцію, що містить гени *bar* та *сур11А1*. Ген *bar* є селективним і кодує стійкість до багатьох комерційних контактних гербіцидів суцільної дії (Basta, Bialaphos, Glufosinate). Ген *сур11А1* кодує мітохондріальний цитохром P450scс, який у стероїдогенних тканинах тварин каталізує перетворення холестерину в прегненолон (спільний метаболічний попередник усіх стероїдних гормонів). Внаслідок зміни гормонального статусу трансгенні рослини тютюну випереджали рослини дикого типу за швидкістю росту і розвитку надземної і підземної частин [1, 2]. Для більш повного з'ясування дії тваринного гена *сур11А1* в рослинах потрібно отримати трансгенні рослини інших видів та класів. У нашій попередній роботі були отримані трансгенні рослини картоплі, які містили ген *сур11А1* [3]. Орхідеї, на відміну від тютюну та картоплі, належать до класу однодольних.

Метою нашої роботи було отримання методами генетичної інженерії транс-генних рослин *D. linguella* з підвищеною біологічною продуктивністю та стійкістю до гербіцидів.

Матеріали і методи

Для генетичної трансформації орхідеї використовували штам *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, що несе генетичну конструкцію pCB093 розміром 10960 п.н. На Т-ДНК розміщувалися експресивні касети Pnos-*bar*-Tocs, P35S-*сур11А1*-T35S та P35S-*sgfp*-Tnos (рис. 1).

Як вихідний матеріал для генетичної трансформації використовували асептичні вторинні протокорми *D. linguella* лінії 534(13) із колекції Національного ботанічного саду ім. Гришка НАН України. Генетичну трансформацію *D. linguella* проводили згідно зрозумілою нами методикою [4]. Для селекції трансгенних ліній у середовище додавали 5–8 мг/л діючої речовини гербіциду Баста (Байер).

Виділення загальної ДНК з рослин проводили відповідно до методики [5]. Для ПЛР аналізу отриманих трансгенних ліній на наявність гена *bar* застосовувалися ген-специфічні праймери *barpr5* (gcggtctgcaccatcgtcaac) та REV581 (cagatctcggtgacgggcaggac). Очікувана довжина фрагмента 494 п.н. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) проводилася у реакційній суміші об'ємом 20 мкл, яка містила по 0,35 мкМ кожного з праймерів, 1×DreamTaq™ Green буфер, 200мкМ дНТФ, 0,5 одиниці DreamTaq™ полімерази



Рис. 1. Схематичне зображення ділянки Т-ДНК конструкції pCB093

(Fisher, Thermo Scientific) та 30 нг загальної ДНК зразка. Умови проведення реакцій: денатурація матриці ДНК – 94°C, 30 с; посадка праймерів – 59°C, 30 с; елонгація ланцюга – 72°C, 30 с, завершальна елонгація – 72°C, 10 хв. Для аналізу гена *sup11A1* застосовувалися ген-специфічні праймери GVS427 (gccacatcgagaactccagaag) та GVS428 (ctggtgtggaacatctttagacg). Очікувана довжина фрагмента 502 п.н. ПЛР проводилася у реакційній суміші об'ємом 20 мкл, яка містила по 0,35 мкМ кожного з праймерів, 1×DreamTaq™ Green буфер, 200 мкМ дНТФ, 0,5 одиниці DreamTaq™ полімерази (Fisher, Thermo Scientific) та 30 нг загальної ДНК зразка. Умови проведення реакцій: денатурація матриці ДНК – 94°C, 30 с; посадка праймерів – 56°C, 30 с; елонгація ланцюга – 72°C, 30 с, завершальна елонгація – 72°C, 10 хв.

Для виділення загальної РНК рослинний матеріал (100–200 мг) гомогенізували у буфері (1М Tris, 0,5М EDTA, 5М NaCl, 10 % SDS) та меркаптоетанолом. Для очищення гомогенату від білків та фрагментів клітин використовували суміш кислого фенолу та хлороформу (1:1) і центрифугували. Відбирали водну фазу, додавали ізопропанол та 3М натрій ацетат. РНК преципітували при –70°C та осаджували. Осад промивали 70 % етанолом для видалення SDS, EDTA та інших небажаних компонентів, розчиняли в DEPC-MilliQ. Зберігали при –70°C. Гідроліз залишкової ДНК проводили ензимом ДНКаза I (Fisher, Thermo Scientific) з RiboLock RNase inhibitor протягом 30 хв при 37°C відповідно до рекомендацій компанії виробника. Реакцію зупиняли додаванням 50 мМ EDTA та прогріванням при 65°C.

Для зворотної транскрипції матричної РНК у реакційну суміш для синтезу першого ланцюга кДНК додавали праймери Oligo(dT)_{18} , dNTP Mix, RiboLock RNase inhibitor та зворотну транскриптазу RevertAid відповідно до рекомендацій Fisher Thermo Scientific. Реакцію проводили 1 год при 42°C та зупиняли денатурацією ревертази при 70°C. Для наступної ампліфікації застосовували ті ж самі специфічні до кодуєчої частини гена *sup11A1* цитохрому P450scs праймери, які давали фрагмент розміром 502 п.н.

Результати та обговорення

Із 500 оброблених суспензією агробактерії експлантів через 9–10 місяців селекції було отримано 35 трансгенних ліній. Проведений ПЛР-аналіз на ген *bar* та на ген *sup11A1* підтвердив інтеграцію цих генів у геном усіх 17 взятих для аналізу трансформованих рослин (рис. 2, 3).

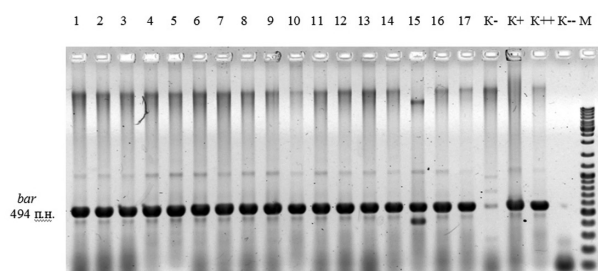


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ампліфікації геномної ДНК *D. linguella* з праймерами на ген *bar*: доріжки 1- 17– трансгенні клони *D. linguella*, K- – негативний контроль, нетрансформована рослина *D. linguella*; K+ – позитивний контроль, колонія *Agrobacterium tumefaciens* з вектором pCB093, K++ – позитивний контроль на ген *bar*, K-- – негативний контроль, реакційна суміш без матриці ДНК, М – маркер молекулярної маси

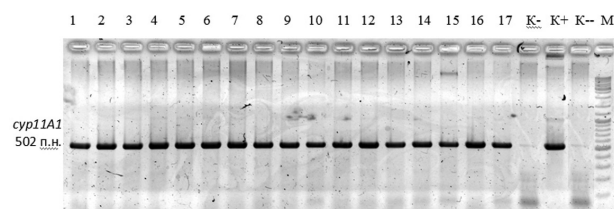


Рис. 3. Електрофореграма продуктів ампліфікації геномної ДНК *D. linguella* з праймерами на ген *sup11A1*: доріжки 1-17– трансгенні клони *D. linguella*, K- – негативний контроль, нетрансформована рослина *D. linguella*; K+ – позитивний контроль, плазмідна ДНК pICH5290-450, K-- – негативний контроль, реакційна суміш без матриці ДНК, М – маркер молекулярної маси

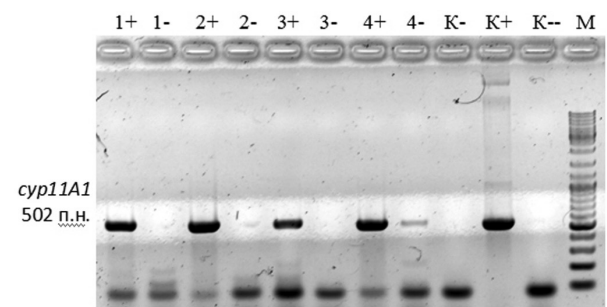


Рис. 4. Електрофореграма продуктів ампліфікації кДНК *D. linguella* з праймерами на ген *sup11A1*: доріжки 1+, 2+, 3+, 4+ – трансгенні клони *D. linguella*, 1-, 2-, 3-, 4- – відповідні негативні контролю, реакційна ПЛР суміш без ревертази, K- – негативний контроль, реакційна ПЛР суміш без матриці кДНК; K+ – позитивний контроль, плазмідна ДНК pICH5290-450, K-- – негативний контроль, реакційна ПЛР суміш без матриці, М – маркер молекулярної маси

Для аналізу експресії *cyp11A1* гена на рівні РНК були взяті 4 трансгенні лінії. Аналіз показав наявність мРНК гена *cyp11A1* в усіх рослинах (рис. 4), що свідчить про активну транскрипцію. В подальшому планується провести дослідження на виявлення білкового продукту гена. Також проводяться експерименти щодо отримання трансгенних рослин *D. linguella* конструкцією, що містить гени *bar* та *sgfp*, але не містить гена *cyp11A1*, які будуть слугувати контролем.

Висновки

Проведено генетичну трансформацію орхідеї *D. linguella* конструкцією з генами *bar* і *cyp11A1* цитохрому P450scc кори надниркових залоз бика. Отримано 35 незалежних трансгенних ліній. ПЛР аналіз 17 трансгенних ліній підтвердив інтеграцію генів *bar* і *cyp11A1* в геном усіх 17 проаналізованих рослин. Молекулярний аналіз 4 рослин підтвердив транскрипцію гена цитохрому P450scc.

ЛІТЕРАТУРА

1. Спивак С.Г. Бердичевець І.Н., Картель Н.А. Трансгенні рослини тютюну, експресуючі ген *cyp11A1* цитохрому P450scc тваринного походження // Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук праць / Під ред. В.А. Кунаха [та ін.]. – К.: Логос, 2006. – С. 639–644.
2. Спивак С.Г., Морозова Е.В., Бердичевець І.Н., Картель Н.А. Влияние экспрессии гена *cyp11A1* цитохрому P450scc животного происхождения на гормональный статус и фенотип растений тютюну *Nicotiana tabacum* L. // Гуминовые кислоты и фитогормоны в растениеводстве. – К., 2007. – С. 72.
3. Рудас В.А., Шаховський А.М., Моргун Б.В., Матвеева Н.А., Кучук М.В. Отримання трансгенних рослин картоплі, стійких до гербіциду Баста, що містить ген *cyp11A1* цитохрому P450scc // Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук праць / Під ред. В.А. Кунаха [та ін.]. – К.: Логос, 2009. – 7. – С. 245–249.
4. Кирпа Т.Н., Рудас В.А., Овчаренко О.А., Клебанович А.А., Герасименко І.М., Іванников Р.В., Остапчук А.Н., Голденкова-Павлова І.В., Шелудько Ю.В. Гетерологическая экспрессия D9-ацил-липидной десатуразы цианобактерии в орхидее *Dendrobium linguella* RCHB.F. // Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук праць / Під ред. В.А. Кунаха [та ін.]. – К.: Логос, 2013. – С. 244–249.
5. Murray M.J., Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight DNA // Nucl. Acids Res. – 1980. – 8, No 19. – P. 4321–4325.

RUDAS V.A.^{1*}, MARKOVSKI O.V.¹, SCHINKARCHUK M.V.^{1,2}, KLEBANOYCH A.A.^{1,3}, MORGUN B.V.¹, OVCHARENKO O.O.¹, IVANNIKOV R.V.⁴, KUCHUK M. V.¹

¹ Institute of Cell Biology and Genetic Engineering Natl. Acad. of Sci. of Ukraine, Ukraine, 03143, Kyiv, Akademika Zabolotnogo str., 148, e-mail: rudasv@gmail.com

² National Technical University of Ukraine "Kyiv Polytechnic Institute", Ukraine, 03056, Kyiv, Peremohy ave., 37, e-mail: malvina.schinkar4uk@yandex.ua

³ Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine, 01601, Kyiv Volodymyrska str., 64/13, e-mail: nastia.klebanovych@yandex.ua

⁴ Hryshko National Botanical Garden Natl. Acad. of Sci. of Ukraine, Ukraine, 01014, Kyiv, Timiryazevska str., 1, e-mail: ivannikov_roman@rambler.ru

PRODUCTION OF TRANSGENIC ORCHID *DENDROBIUM LINGUELLA* RCHB. F. PLANTS, CARRYING *BAR* GENE AND *CYP11A1* GENE OF CYTOCHROME P450scc

Aim. *Dendrobium linguella* Rchb. f. is one of the most popular orchids sold as potted plants. This orchid has beautiful white-pink flowers. The aim of our work was to produce transgenic plants of *D. linguella* having better productivity and resistant to herbicide. **Methods.** *Agrobacterium tumefaciens* strain CV3101 carrying gene construct pCB093 was used for genetic transformation. Obtained calli were analyzed by PCR and RT-PCR. **Results.** 35 BASTA-resistant *D. linguella* lines were produced after *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation with a gene construct carrying *bar*, *sgfp* gene and *cyp11A1* gene of cytochrome P450scc from bovine adrenal cortex. Integration of foreign genes in genome of all 17 plants analyzed was confirmed by PCR analysis. Transcription of *cyp11A1* gene was shown by RT-PCR analysis. **Conclusions.** Transgenic plants of *D. linguella* resistant to commercial herbicides Basta, Bialaphos, Glufosinate were produced. In the future the expression of *cyp11A1* gene and its influence on plant morphology will be studied.

Keywords: *Dendrobium linguella* Rchb. f., *cyp11A1* gene, *bar* gene, PCR, herbicide.