

Н.А. МАТВЕЕВА, М.Ю. ВАСИЛЕНКО,  
А.М. ШАХОВСКИЙ, М.А. БАННИКОВА,  
О.Ю. КВАСКО, Н.В. КУЧУК

Институт клеточной биологии и генетической инженерии  
НАН Украины, Киев  
E-mail: joyna56@gmail.com

**ЭФФЕКТИВНАЯ  
АГРОБАКТЕРИАЛЬНАЯ  
ТРАНСФОРМАЦИЯ РАСТЕНИЙ  
ЦИКОРИЯ (*CICHORIUM INTYBUS* L.)  
ВЕКТОРОМ С ГЕНОМ  
ТУБЕРКУЛЕЗНОГО АНТИГЕНА ESAT6**



*Определены условия трансформации цикория *Cichorium intybus* L. геном антигена ESAT6 из *Mycobacterium tuberculosis*, которые обеспечивают наибольшую частоту регенерации зеленых растений с трансформированной ДНК. При культивировании семян в течение 3 сут без цефотаксима и затем 1 сут без канамицина частота трансформации составляла 86 %. По результатам ПЦР-анализа все растения имели как селективный ген *prtII*, так и ген *esxA* туберкулезного антигена ESAT6. В то же время анализ обратных транскриптов показал, что хотя ген *prtII* транскрибировался у всех восьми анализированных растений, обратные транскрипты целевого гена *esxA* обнаружены только у пяти.*

© Н.А. МАТВЕЕВА, М.Ю. ВАСИЛЕНКО, А.М. ШАХОВСКИЙ,  
М.А. БАННИКОВА, О.Ю. КВАСКО, Н.В. КУЧУК, 2011

**Введение.** Туберкулез занимает среди инфекционных болезней одно из первых мест в мире по показателям заболеваемости и смертности. Разработаны химиотерапевтические методы лечения туберкулеза, однако регистрируются случаи резистентности микобактерий к используемым лекарственным средствам [1]. Поэтому проблема профилактики заболевания стоит достаточно остро. Эффективным средством профилактики туберкулеза служит вакцинация. В 1919 г. Альберт Кальметт и Камиль Герен впервые создали вакцину против туберкулеза (*Bacillus Calmette-Guerin*, BCG), используя *Mycobacterium bovis*, однако эта вакцина не всегда эффективна [2]. Поэтому значительный интерес представляет создание новых антитуберкулезных вакцин, разработка которых активно проводится в последние 15 лет [3–6]. К ним относятся, в частности, вакцины, созданные на основе мутантных штаммов, аттенуированные, рекомбинантные, ДНК-вакцины [1, 7]. Создаваемые вакцины содержат белки *M. tuberculosis* (30-kD-секреторный белок, ESAT6, Ag85A, Ag85B, CFP10), отсутствующие в вакцине БЦЖ [8–10], которые обеспечивают возникновение стойкого иммунитета [1, 11]. Эффективность вакцин, содержащих указанные белки, подтверждена рядом исследований. Показано, что иммунизация мышей антигенами Ag85A и Ag85B из культуры *M. tuberculosis* приводила к увеличению концентрации интерлейкина IL-2 и  $\gamma$ -интерферона, а также к существенной защите легких от микобактерий [12]. Лечение инфицированных *M. tuberculosis* мышей ДНК-вакциной с белками Ag85B и MPT64 приводило к повышению содержания  $\gamma$ -интерферона и TNF- $\alpha$ , причем поражение тканей легких у иммунизированных мышей было незначительным [13].

Бактериальные и вирусные антигены могут синтезироваться в растениях, что было показано еще в конце 90-х годов XX ст., в частности, на трансгенных растениях табака, экспрессирующих поверхностный антиген вируса гепатита В [14], а также другими исследованиями [15–18]. Антигены растительного происхождения идентичны бактериальным и обладают высокой иммуногенной активностью [19–21]. В желудочно-кишечном тракте они не подвергаются действию протеолитических ферментов, так как защищены клеточными стенками.

Показано, например, что белок LTB-ESAT6, синтезированный в растениях, индуцировал антиген-специфический ответ [22].

Создание так называемых съедобных вакцин на основе трансгенных растений представляет одно из направлений биотехнологии. Преимуществами этих вакцин являются относительно низкая стоимость производства, возможность длительного хранения (например, в семенах трансформированных растений), отсутствие дорогостоящих этапов выделения и очистки [23]. Съедобные вакцины могут найти применение как в медицине, так и ветеринарии [21, 24–28]. В ряде работ приведены исследования возможности синтеза туберкулезных антигенов в растительных системах, например, в растениях табака [29] и арабидопсиса [30], причем количество синтезируемого белка может быть достаточно высоким. Например, концентрация туберкулезного антигена Ag85B в *Nicotiana benthamiana* составляла 800 мг на 1 кг массы листьев [31].

Растительным объектом, который может быть использован для создания съедобных вакцин, является цикорий. Листовой цикорией *Cichorium intybus* L. var. *foliosum* является не только пищевой культурой, содержащей витамины, микроэлементы, но и лекарственным растением, антигепатотоксические, притивоязвенные, противовоспалительные, кардиотонические свойства которого обусловлены наличием инулина, кумаринов, флавоноидов [32–34].

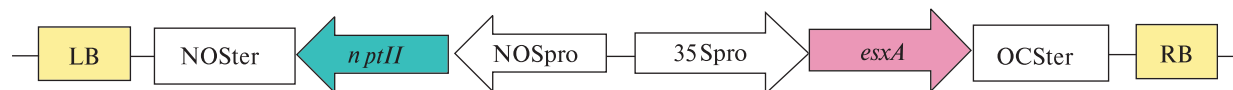
В культуре *in vitro* показана высокая регенерационная способность цикория [35–37], что дает возможность с высокой эффективностью осуществлять процесс генетической трансформации [38, 39].

Нами цикорией сорта Пала росса был использован в качестве объекта для получения трансгенных растений с геном туберкулезного антигена ESAT6.

**Материалы и методы.** Исходным материалом для исследований являлись семена цикория сорта Пала росса (агрофирма «Елітсортна-сіння», Украина). Семена стерилизовали в течение 1 мин в 70%-ном этаноле и 10 мин в 25%-ном растворе коммерческого препарата «Білизна» (НПФ «Біолайт», Украина), промывали дистиллированной водой (60 мин). Стерильные семена проращивали на агаризованной среде MS [40] при 16-часовом световом фотопериоде и температуре 24 °С.

Для создания бинарного вектора с геном секреторного белка ESAT6 (рис. 1) использовали вектор pCambia1300 с клонированной последовательностью *esxA*, который был любезно предоставлен д-ром биол. наук Ю.Л. Дороховым (Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, РФ). ДНК исходных плазмид гидролизвали эндонуклеазами *NcoI* и *XbaI*. После электрофоретического разделения продуктов гидролиза в агарозном геле осуществляли экстрагирование и очистку фрагментов 7886 и 306 п.н., которые соответствуют *NcoI-XbaI* фрагментам линейного вектора pICBV16 и последовательности ESAT6. Далее проводили реакцию лигирования T4-ДНК лигазой очищенных фрагментов векторов pICBV16 и ESAT6 и получали бинарный вектор pCB063. Частью лигазной смеси трансформировали компетентные клетки *E. coli* штамма XL1-Blue, из полученных колоний выделяли плазмидную ДНК и проводили ее анализ. Вектором, проверенным рестриктным картированием, трансформировали бактерии *Agrobacterium tumefaciens* штамма GV3101, которые в дальнейшем использовали для трансформации растений (рис. 1).

Трансформацию проводили путем инкубирования семядолей цикория (по 30 в каждом варианте) в суспензии *Agrobacterium tumefaciens* штамма GV3101. Бактерии предваритель-



**Рис. 1.** Схема Т-ДНК плазмидного вектора pCB063: LB, RB – левая и правая границы Т-ДНК; *nptII* – ген неомизинфосфотрансферазы II; *esxA* – ген *esxA* туберкулезного антигена ESAT6; NOSpro – промотор гена нопалинсинтазы; NOSter – терминатор гена нопалинсинтазы; 35Spro – промотор гена 35S-белка из генома вируса мозаики цветной капусты; OCter – терминатор гена октопинсинтазы

Таблица 1

Время роста эксплантов на среде без антибиотиков в вариантах эксперимента

Время роста, сут		Номер варианта эксперимента								
без цефотаксима	без канамицина	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	1	■								
1	7		■							
1	14			■						
2	1				■					
2	7					■				
2	14						■			
3	1							■		
3	7								■	
3	14									■

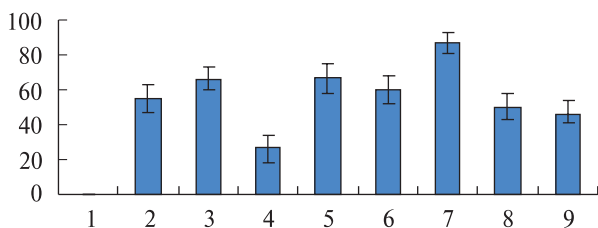
но выращивали на среде LB [41] с антибиотиками (100 мг/л карбенициллина, 50 мг/л рифампицина) на ротационном шейкере (200 об./мин) при температуре 28 °С. Клетки осаждали центрифугированием (300 g, 10 мин), ресуспендировали в 10 мМ растворе MgSO<sub>4</sub>. Семядоли инкубировали в суспензии 30 мин, промокали фильтровальной бумагой и культивировали в чашках Петри на агаризованной среде MS в течение 2 сут. Затем экспланты переносили на агаризованную среду MS с 2,5 мг/л кинетина (DUCHEFA Biochemie B.V., Нидерланды) и 0,5 мг/л α-нафтилуксусной кислоты (НУК) (DUCHEFA Biochemie B.V., Нидерланды) (среда S-1) с 25 мг/л канамицина («Киевмедпрепарат», Украина) и 500 мг/л цефотаксима («Дарница», Украина), а через 1 мес – на среду MS с 0,5 мг/л кинетина, 0,05 мг/л НУК (среда S-2), 25 мг/л канамицина (Km) и 500 мг/л цефотаксима (Cf). Регенерированные растения укореняли на среде MS с антибиотиками в тех же концентрациях. Частоту трансформации условно определяли как процентное отношение количества эксплантов с регенерированными на селективной среде зелеными растениями к общему количеству эксплантов.

Геномную ДНК выделяли по стандартной методике из листьев асептических растений [42]. Для ПЦР-анализа присутствия гена *nptII* (размер амплифицированного фрагмента 622 п.н.) использовали праймеры 5'-cctgaat-gaactccaggacgaggca-3' и 5'-gctctagatccagagctcccctca-

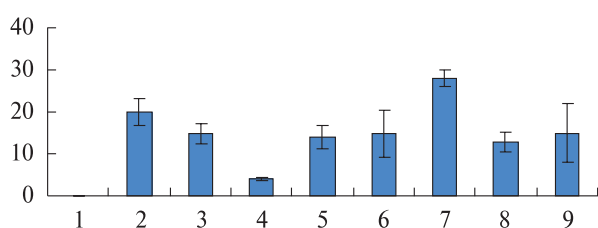
gaag-3', гена *exxA* (299 п.н.) – 5'-ctgaccatggcagagcagcagtggaatttcgc-3', 5'-gagaattctgcgaacatcccagtgctcg-3'. Амплификацию осуществляли на амплификаторе Mastercycler personal 5332 (Eppendorf). Реакционная смесь общим объемом 20 мкл содержала однократный ПЦР-буфер с сульфатом аммония, 10–50 нг растительной ДНК, по 0,2 мкМ праймеров, по 200 мкМ нуклеозидтрифосфатов, 0,5 ед. Taq-полимеразы. Амплификацию проводили в таких условиях: первичная денатурация – 94 °С, 3 мин, 30 циклов (94 °С, 30 с; 60 °С, 30 с; 72 °С, 30 с), окончательная полимеризация – 72 °С, 5 мин [43].

Предварительно обработанные ДНКазой I, свободной от РНКазы, препараты суммарной РНК использовали в качестве матрицы для синтеза первой цепи кДНК (обратных транскриптов). Синтез осуществляли с помощью набора реактивов «Fermentas» (Литва) по инструкции фирмы-изготовителя, при этом для каждой пробы РНК проводили две параллельные реакции – в присутствии обратной транскриптазы и в ее отсутствие.

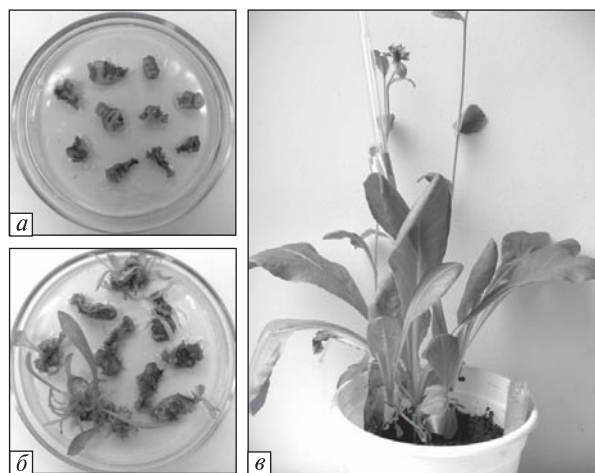
**Результаты исследований и их обсуждение.** Для трансформации, которую осуществляли путем кокультивирования эксплантов с *A. tumefaciens*, использовали семядоли 10–12-дневных проростков, на которых предварительно делали поперечные надрезы. Векторная конструкция pCB063 имела селективный ген *nptII* (неомицинфосфотрансферазы II), определяющий устойчивость к канамицину [44]. Селекцию



**Рис. 2.** Зависимость частоты регенерации зеленых растений от условий трансформации: по вертикали – частота регенерации зеленых растений, %; по горизонтали – варианты эксперимента



**Рис. 3.** Зависимость количества зеленых растений, которые регенерировали после трансформации вектором рСВ063, от условий трансформации: по вертикали – количество зеленых растений, шт.; по горизонтали – варианты эксперимента



**Рис. 4.** Регенерация трансгенных растений, устойчивых к канамицину, в вариантах эксперимента № 1 (а) и № 7 (б, в)

трансгенных растений проводили на среде, содержащей 25 мг/л канамицина, так как ранее нами было показано, что такая концентрация антибиотика является селективной [39].

Процесс трансформации с помощью *A. tumefaciens* состоит из нескольких этапов: прикреп-

ление бактерии к стенке растительной клетки, проникновение Т-ДНК внутрь клетки растения, интеграция Т-ДНК в геном и экспрессия Т-ДНК. Факторами, определяющими частоту и эффективность трансформации, являются время культивирования с агробактерией в отсутствие антибиотика, подавляющего ее рост (в данном случае цефотаксима), время, в течение которого отсутствует селективное давление (культивирование без канамицина), а также регенерационная способность трансформируемого растения.

Известно, что чем больше частота регенерации, тем больше вероятность получения растений с трансформированной ДНК. В частности, ранее нами было показано, что частота трансформации салата конструкциями рСВ063 и рСВ064 зависит от регенерационной способности растений [43]. В связи с этим в экспериментах нами был использован сорт листового цикория Пала росса, частота регенерации растений у которого составляла 100 % [39].

Для определения условий, дающих возможность с максимальной эффективностью проводить трансформацию вектором рСВ063, после культивирования в бактериальной суспензии экспланты переносили на среду без цефотаксима на 1, 2, 3 сут и далее на среду без канамицина – на 1, 7, 14 сут (варианты № 1–9, табл. 1).

Показано, что наименьшая частота регенерации зеленых растений наблюдается при минимальном времени культивирования без антибиотиков в вариантах № 1 и 4 (рис. 2).

При увеличении времени роста эксплантов без селективного давления с 1 до 7 или 14 сут количество эксплантов с регенерировавшими зелеными растениями увеличивалось, причем эта величина практически не зависела от времени культивирования на среде без цефотаксима – 1 или 2 сут (рис. 2, варианты 2, 3, 5, 6).

Увеличение времени роста в отсутствие цефотаксима, подавляющего рост агробактерий, с 1 до 3 сут (вариант № 7) приводило к значительному повышению частоты регенерации зеленых растений (с 0 до 86 %). Очевидно, причина такого явления в том, что при этом существенно увеличивается вероятность проникновения агробактерий в клетку, последующего переноса трансформирующей ДНК и ее встраивания в растительный геном. В то же время при увеличении продолжительности периода, в котором



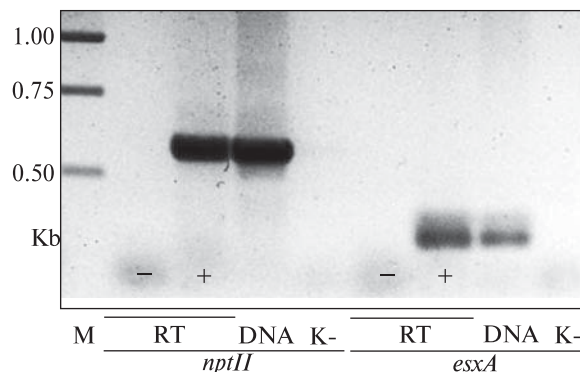
отсутствует селективное давление, частота регенерации зеленых растений уменьшалась, причем наблюдался также рост белых (чувствительных к канамицину) растений.

Аналогичную тенденцию наблюдали в изменении количества зеленых растений. Так, минимальное количество (0–11 растений) сформировалось в вариантах № 1 и 4, а максимальное (85) – в варианте № 7 (рис. 3 и 4).

Для каждого из вариантов эксперимента анализировали по 2–3 зеленых растения. Показано, что все растения были трансгенными, имели как целевой, так и селективный гены (рис. 4, табл. 2).

На присутствие обратных транскриптов выборочно анализировали 8 растений, имевших селективный и целевой гены. Ген *nptII* транскрибировался во всех растениях, в то время как в трех из восьми растений транскрипция целевого гена не детектировалась (рис. 5).

Так называемое «молчание генов» встречается при трансформации ядерной ДНК и может возникнуть в случае присутствия в растительном геноме последовательности ДНК, гомологичной переносимому гену, при встраивании большого числа копий гена на геном, метилировании перенесенной последовательности ДНК, образовании ДНК-дуплекса повторяющихся генов [45, 46]. Вместе с тем транскрипция как целевого, так и селективного генов более чем у 50 % анализированных растений позволя-



**Рис. 5.** ПЦР-анализ обратных транскриптов и геномной ДНК растений цикория, трансформированных вектором pCB063: М – маркер; DNA – ДНК трансгенного растения; К – ДНК контрольного растения; RT– и RT+ – от-ПЦР в отсутствие ревертазы и при ее наличии; *nptII* – ген неомицинофосфотрансферазы II; *esxA* – ген туберкулезного антигена ESAT6

ет считать возможным использование метода агробактериальной трансформации для получения растений цикория с геном туберкулезного антигена ESAT6.

Таким образом, определены условия трансформации цикория конструкцией pCB063, обеспечивающие наибольшую частоту регенерации зеленых растений и наибольшее количество растений с трансформированной ДНК. Эффективная трансформация достигалась при культивировании семядольных эксплантов в течение 3 сут без цефотаксима и затем 1 сут без канамицина. При этом частота трансформации составляла 86 %, а количество трансгенных растений – 4–5 на эксплант. Проведенный ПЦР-анализ показал, что как селективный, так и целевой гены присутствовали во всех анализированных растениях. В то же время в результате анализа обратных транскриптов оказалось, что хотя ген *nptII* транскрибировался у всех восьми анализированных растений, обратные транскрипты целевого гена *esxA* обнаружены только у пяти растений.

*N.A. Matvieieva, M.Y. Vasylenko, A.M. Shahovsky,  
M.O. Bannykova, O.Y. Kvasko, N.V. Kuchuk*

EFFECTIVE AGROBACTERIUM-MEDIATED TRANSFORMATION OF CHICORY (*CICHORIUM INTYBUS* L.) WITH MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS ANTIGENE ESAT6

The conditions of high efficient chicory transformation with *Mycobacterium tuberculosis* antigene ESAT6 have been

Таблица 2

Результаты ПЦР-анализа растений цикория, которые получены после трансформирования плазмидой pCB063

Вариант эксперимента	Количество зеленых растений					
	Получено	Всего	ПЦР+		ПЦР–	
			<i>nptII</i>	<i>esxA</i>	<i>nptII</i>	<i>esxA</i>
1	0	–	–	–	–	–
2	20 ± 3,3	2	2	2	0	0
3	15 ± 2,4	2	2	2	0	0
4	3,67 ± 0,5	–	–	–	–	–
5	14 ± 2,8	2	2	2	0	0
6	15 ± 5,6	2	2	2	0	0
7	28,3 ± 2,1	3	3	3	0	0
8	13 ± 2,4	3	3	3	0	0
9	15,3 ± 7,7	3	3	3	0	0

determined. Transformation frequency was up to 86 % when the cotyledons were cultivated within 3 days without cefotaxime and then 1 day without kanamycine. DNA PCR-analysis has shown the presence both of selective *nptII* and target *esxA* genes in all analysed plants. At the same time RT-PCR has shown the presence of *nptII* transcripts for eight analysed lines and *esxA* transcripts for only five analysed lines.

Н.А. Матвеева, М.Ю. Василенко,  
А.М. Шаховский, М.О. Банникова,  
О.Ю. Кваско, М.В. Кучук

ЕФЕКТИВНА АГРОБАКТЕРІАЛЬНА  
ТРАНСФОРМАЦІЯ РОСЛИН ЦИКОРІЮ  
(*CICHORIUM INTYBUS* L.) ВЕКТОРОМ З ГЕНОМ  
ТУБЕРКУЛЬОЗНОГО АНТИГЕНА ESAT6

Визначено умови трансформації цикорію *Cichorium intybus* L. геном антигена ESAT6 *Mycobacterium tuberculosis*, що забезпечують найбільшу частоту регенерації зелених рослин із трансформованою ДНК. При культивуванні сім'ядоль протягом 3 діб без цефотаксиму та потім одну добу без канаміцину частота трансформації становила 86 %. За результатами ПЛР-аналізу рослини мали як селективний ген *nptII*, так і ген *esxA* туберкульозного антигена ESAT6. У той же час аналіз зворотних транскриптів показав, що хоча ген *nptII* транскрибувався у всіх восьми аналізованих рослин, зворотні транскрипти цільового гена *esxA* виявлені тільки у п'яти рослин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Orme I.M. Tuberculosis vaccines : Current progress // *Drugs*. — 2005. — **65**, № 17. — P. 2437–2444.
2. Colditz G.A., Brewer T.F., Berkey C.S. et al. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis // *J. Amer. Med. Ass.* — 1994. — **271**, № 9. — P. 698–702.
3. McMurray D.N. Recent progress in the development and testing of vaccines against human tuberculosis // *Int. J. Parasitol.* — 2003. — **33**, № 5/6. — P. 547–554.
4. Doherty T.M., Andersen P. Vaccines for tuberculosis: Novel concepts and recent progress // *Clin. Microbiol. Rev.* — 2005. — **18**, № 4. — P. 687–702.
5. Orme I.M. Current progress in tuberculosis vaccine development // *Vaccine*. — 2005. — **23**, № 17/18. — P. 2105–2108.
6. Orme I.M., McMurray D.N., Belisle J.T. Tuberculosis vaccine development: recent progress // *Trends in Microbiol.* — 2001. — **9**, № 3. — P. 115–118.
7. Palendira U., Spratt J.M., Britton W.J., Triccas J.A. Expanding the antigenic repertoire of BCG improves protective efficacy against aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection // *Vaccine*. — 2005. — **23**, № 14. — P. 1680–1685.
8. Horwitz M.A., Lee B.W., Dillon B.J., Harth G. Protective

immunity against tuberculosis induced by vaccination with major extracellular proteins of *Mycobacterium tuberculosis* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 1995. — **92**, № 5. — P. 1530–1534.

9. Sørensen A.L., Nagai S., Houen G. et al. Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis* // *Infect. Immun.* — 1995. — **63**, № 5. — P. 1710–1717.
10. Wang Bao-Lin, Ying Xu, Chao-Qun Wu et al. Cloning, expression, and refolding of a secretory protein ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis* // *Protein Express. and Purif.* — 2005. — **39**, № 2. — P. 184–188.
11. Young D., Dye C. The development and impact of tuberculosis vaccines // *Cell*. — 2006. — **124**, № 4. — P. 683–687.
12. Lozes E., Huygen K.I., Content J. et al. Immunogenicity and efficacy of a tuberculosis DNA vaccine encoding the components of the secreted antigen 85 complex // *Vaccine*. — 1997. — **15**, № 8. — P. 830–833.
13. Daoyin Zhu, Shan Jiang, Xudong Luo. Therapeutic effects of Ag85B and MPT64 DNA vaccines in a murine model of *Mycobacterium tuberculosis* infection // *Vaccine*. — 2005. — **23**, № 37. — P. 4619–4624.
14. Mason H.S., Lam D.M., Arntzen C.J. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 1992. — **89**, № 24. — P. 11745–11749.
15. Arakawa T., Chong D.K., Merritt J.L., Langridge W.H. Expression of cholera toxin B subunit oligomers in transgenic potato plants // *Transgenic Res.* — 1997. — **6**, № 6. — P. 403–413.
16. Daniell H., Lee S.B., Panchal T. et al. Expression of the native cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts // *J. Mol. Biol.* — 2001. — **311**, № 5. — P. 1001–1009.
17. Franconi R., Di Bonito P., Dibello F. et al. Plant-derived human papillomavirus 16 E7 oncoprotein induces immune response and specific tumor protection // *Cancer Res.* — 2002. — **62**, № 13. — P. 3654–3658.
18. Arntzen C., Plotkin S., Dodet B. Plant-derived vaccines and antibodies: potential and limitations // *Vaccine*. — 2005. — **23**, № 15. — P. 1753–1756.
19. Kong Q., Richter L., Yang Y.F. et al. Oral immunization with hepatitis B surface antigen expressed in transgenic plants // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 2001. — **98**, № 20. — P. 11539–11544.
20. Thanavala Y., Yang Y.F., Lyons P. et al. Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 1995. — **92**, № 8. — P. 3358–3361.
21. Thanavala Y., Mahoney M., Pal S. et al. Immunogenicity in humans of an edible vaccine for hepatitis B // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 2005. — **102**, № 9. — P. 3378–3382.

22. Rigano M.M., Dreitz S., Kipnis A.P. et al. Oral immunogenicity of a plant-made, subunit, tuberculosis vaccine // *Vaccine*. – 2006. – **24**, № 5. – P. 691–695.
23. Walmsley A.M., Arntzen C.J. Plant cell factories and mucosal vaccines // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2003. – **14**, № 2. – P. 145–150.
24. Streatfield S.J. Mucosal immunization using recombinant plant-based oral vaccines // *Methods*. – 2006. – **38**, № 2. – P. 150–157.
25. Rigano M.M., Walmsley A.M. Expression systems and developments in plant-made vaccines // *Immunol. Cell Biol.* – 2005. – **83**, № 3. – P. 271–277.
26. Floss D.M., Falkenburg D., Conrad U. Production of vaccines and therapeutic antibodies for veterinary applications in transgenic plants: an overview // *Transgen. Res.* – 2007. – **16**, № 3. – P. 315–332.
27. Joensuu J.J., Niklander-Teeri V., Brandle J.E. Transgenic plants for animal health: plant-made vaccine antigens for animal infectious disease control // *Phytochem. Rev.* – 2008. – **7**, № 3. – P. 553–577.
28. Aziz M.A., Singh S., Anand Kumar P., Bhatnagar R. Expression of protective antigen in transgenic plants: a step towards edible vaccine against anthrax // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2002. – **299**, № 3. – P. 345–351.
29. Zelada A., Calamante G., de la Paz Santangelo M. et al. Expression of tuberculosis antigen ESAT-6 in *Nicotiana tabacum* using a potato virus X-based vector // *Tuberculosis*. – 2006. – **86**, № 3. – P. 263–267.
30. Rigano M.M., Alvarez M. L., Pinkhasov J. et al. Production of a fusion protein consisting of the enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-labile toxin B subunit and a tuberculosis antigen in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Cell Rep.* – 2004. – **22**, № 7. – P. 502–508.
31. Dorokhov Y.L., Sheveleva A.A., Frolova O.Y. et al. Superexpression of tuberculosis antigens in plant leaves // *Tuberculosis (Edinb.)*. – 2007. – **87**, № 3. – P. 218–224.
32. Gadgoli C., Mishra S.H. Antihepatotoxic activity of *Cichorium intybus* // *Ethanopharmacology*. – 1997. – **58**, № 2. – P. 131–134.
33. Hughes R., Rowland I.R. Stimulation of apoptosis by two prebiotic Chicory fructans in the rat colon // *Carcinogenesis*. – 2001. – **22**, № 1. – P. 43–47.
34. Ahmad K.D., Gilani S.N., Akhtar A.H., Khan L. Antiulcerogenic evaluation of aqueous extracts of *Cichorium intybus* and *Phyllanthus emblica* in normal and aspirin-treated rats // *Pakistan J. Sci. and Industrial Res.* – 1998. – **41**, № 2. – P. 92–96.
35. Rehman R.U., Israr M., Srivastava P.S. et al. In vitro regeneration of witloof chicory (*Cichorium intybus* L.) from leaf explants and accumulation of esculin // *In Vitro Cell. and Develop. Biol.* – 2003. – **39**, № 2. – P. 142–146.
36. Profumo P., Gastaldo P., Caffaro L. et al. Callus induction and plantlet regeneration in *Cichorium intybus* L. 2. Effect of different hormonal treatments // *Protoplasma*. – 1985. – **126**, № 3. – P. 215–220.
37. Buhara Yucesan, Arzu Ucar Turker, Ekrem Gurel. TDZ-induced high frequency plant regeneration through multiple shoot formation in witloof chicory (*Cichorium intybus* L.) // *Plant Cell, Tissue. and Organ Culture*. – 2007. – **91**, № 3. – P. 243–250.
38. Cheng LinMei, Cao QiuFen, Huang Jing et al. Establishment of a highly efficient genetic transformation system in *Cichorium intybus* // *Acta Pratacult. Sin.* – 2004. – **13**, № 6. – P. 112–116.
39. Матвеева Н.А., Шаховский А.М., Герасименко И.М. та ін. Перенесення гена біосинтезу інтерферону- $\alpha 2b$  в рослини цикорію (*Cichorium intybus* L.) методом агробактеріальної трансформації // *Біополімери і клітина*. – 2009. – **25**, № 2. – С. 120–125.
40. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* – 1962. – **15**, № 3. – P. 473–497.
41. Маниатис Т., Фрич Е.Ф., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. – М.: Мир, 1984. – 480 с.
42. Дрейнер Дж., Скотт Р. Выделение нуклеиновых кислот из клеток растений // *Генная инженерия растений* : Пер. с англ. / Под ред. Дж. Дрейнера, Р. Скотта, Ф. Армитиджа, Р. Уолдена. – М.: Мир, 1991. – С. 241–245.
43. Матвеева Н.А., Василенко М.Ю., Шаховский А.М., Кучук Н.В. Агробактериальная трансформация салата *Lactuca sativa* L. конструкциями, несущими гены бактериальных антигенов из *Mycobacterium tuberculosis* // *Цитология и генетика*. – 2009. – **43**, № 2. – С. 27–32.
44. Block De M., Herrera-Estrella L., Van Montagu M. et al. Expression of foreign genes in regenerated plants and in their progeny // *EMBO J.* – 1984. – **3**, № 8. – P. 1681–1689.
45. Assaad F., Tucker K.L., Signer E.R. Epigenetic repeat-induced gene silencing (RIGS) in *Arabidopsis* // *Plant. Mol. Biol.* – 1993. – **22**, № 6. – P. 1067–1085.
46. Matzke M.A., Matzke A.J.M. How and why do plants inactivate homologous (trans) genes? // *Plant Physiol.* – 1995. – **107**, № 3. – P. 679–685.

Поступила 31.03.10