

ОТРИМАННЯ КУЛЬТУРИ «БОРОДАТИХ» КОРЕНІВ ПОЛИНУ ЗВИЧАЙНОГО З ГЕНОМ *ifn-α2b* ЛЮДИНИ

До роду *Artemisia* (родина Айстрових) належать трав'янисті одно- та багаторічні рослини. Серед них є види, які поширені на території України, деякі є ендемічними. Полін здавна використовується у народній та традиційній медицині. Зокрема, це обумовлено наявністю у хімічному складі рослин ефірних олій, аскорбінової кислоти, флавоноїдів та сесквітерпенових сполук (у тому числі артемізиніну). Серед видів роду *Artemisia* на увагу заслуговують *Artemisia absinthium* L. та *Artemisia cina* L., яким присвячена найбільша кількість робіт з уведення в культуру *in vitro*, мікроклонального розмноження, генетичної трансформації тощо. Проте є й інші представники цього роду, які, незважаючи на розповсюдженість по усій північній півкулі, досі залишаються невивченими у культурі *in vitro*. До таких рослин слід віднести і полін звичайний – *Artemisia vulgaris* L. – багаторічну рослину, яка росте по усій території України, на луках, узліссях, біля доріг, у садах та серед чагарників. Препарати полину звичайного заспокійливо діють на нервову систему, виявляють легку снодійну та потогінну дію, збуджують апетит та регулюють діяльність травного тракту [1]. Наразі є лише декілька публікацій зі введення рослин *A. vulgaris* в асептичну культуру. У 2013 році опубліковано дослідження Sujatha et al. [2] з *Agrobacterium rhizogenes*-опосередкованої генетичної трансформації *A. vulgaris*. Автори використовували бактерії, що мали вектор з репортерним GUS-геном та отримали культуру «бородатих» коренів.

Культура «бородатих» коренів – це культура органів, отримана шляхом *Agrobacterium rhizogenes* опосередкованої трансформації [3]. Це корені з характерним фенотипом: негативним геотропізмом, високим ступенем галузнення, здатні до росту на живильному середовищі без додавання регуляторів росту [4, 5]. Бородаті корені, так само як і вихідні рослини, можуть синтезувати біологічно активні сполуки (БАС) [6]. Крім того, такі корені можуть накопичувати такі сполуки у кількості, що перевищує кількість у вихідних рослинах [7]. «Бородаті» корені становлять інтерес не тільки як джерело БАС, їх отримання

є способом оцінки можливості застосування генетичної трансформації для перенесення тих чи інших генів до рослин різних видів та ступеня вірулентності штамів агробактерій.

Оскільки досі не було отримано трансгенні корені *A. vulgaris* з використанням генів синтезу сполук, які мають фармакологічні властивості, наразі актуальною є генетична трансформація полину звичайного векторами, які несуть не тільки селективні та репортерні гени, але й ген інтерферону людини *ifn-α2b*.

У даній роботі досліджували можливість отримання «бородатих» коренів *A. vulgaris* з використанням дикого штаму *Agrobacterium rhizogenes* A4 та *Agrobacterium rhizogenes* з вектором pCB161, що несе гени *nptII* та *ifn-α2b*.

Матеріали і методи

Вихідним матеріалом слугувало насіння рослин *Artemisia vulgaris* («Benary», Німеччина). Насіння стерилізували розчином комерційного препарату «Білізна» (у співвідношенні з водою 3:1) протягом 10 хвилин, після чого промивали тричі по 5 хвилин стерильною дистильованою водою та переносили насіння на поверхню агаризованого середовища Мурасіге та Скуга [8] зі зменшеним вдвічі вмістом макроелементів (1/2MS). Культивування проводили при температурі 24 °C та 16-годинному фотоперіоді.

Експлантами для генетичної трансформації слугували 21-денні проростки полину, від яких відокремлювали листки та корені. Для трансформації використовували дикий штам *A. rhizogenes* A4. Також генетичну трансформацію проводили з використанням бактерій *A. rhizogenes*, що несли плазмиду pCB161 з геном інтерферону людини *ifn-α2b* під контролем коренеспецифічного MII промотору цукрового буряку [9]. Трансформацію проводили за описаною нами раніше методикою [10]. Після кокультивування з агробактеріями експланти вирощували в чашках Петрі на агаризованому середовищі 1/2MS протягом двох діб, потім переносили на середовище 1/2 MS з 600 мг/л цефотаксиму. Оскільки використаний вектор pCB161 мав ген неоміцинфос-

фототрансферази II, селекцію трансгенних коренів проводили в присутності 25 мг/л канаміцину, який додавали до живильного середовища через 9 діб після трансформації. Вирощування коренів, отриманих після трансформації диким штамом *A. rhizogenes* A4, проводили на середовищі 1/2 MS з 600 мг/л цефотаксиму.

Виділення тотальної ДНК проводили ЦТАБ методом [11]. Наявність перенесених генів визначали, використовуючи метод ПЛР. Використовували набір реактивів «Fermentas» та праймери, специфічні до генів *ifn-α2b* (5'-ttgatgctcctggcacag-3', 5'-ttctgctctgacaacctc-3', 396 п.н.) *nptII* (5'-cctgaatgaactccaggacgaggca-3' и 5'-gctctagatccagagtcctccgctcag aag-3', 622 п.н.), та *rolB* (відповідно 5'-5'atggatccc aaattgctattcctccacga-3' и 5'-ttaggctcttcttcagggttactc agc-3', 780 п.н.).

Ампліфікацію проводили за таких умов: первинна денатурація – 94 °С, 3 хв, 30 циклів ампліфікації (94 °С, 30 с – 62 °С, 30 с – 72 °С, 30 с. Для генів *nptII* та *ifn-α2b* і 94 °С, 30 с – 56 °С, 30 с – 72 °С, 45 с для *rolB*), заключний синтез – 72 °С, 3 хв. Продукти реакції розділяли за допомогою електрофорезу у 1,5 %-вому агарозному гелі. Було використано маркер нуклеотидних послідовностей O'GeneRuler 1kb № 1163 («Fermentas», Литва).

Результати та обговорення

Ріст коренів після генетичної трансформації починався на листових експлантах через 7 діб після кокультивування з агробактеріями як дикого штаму, так і з агробактеріями з векторною конструкцією pCB161. Корені відрізнялись високою швидкістю росту на середовищі без додавання регуляторів росту рослин (для коренів, отриманих за допомогою агробактерії з pCB161, ріст продовжувався на середовищі з селективним антибіотиком – канаміцином), значно галузились та не вросли у середовище.

Проведені молекулярно-біологічні аналізи підтвердили наявність гена *rolB* у корнях, отриманих за допомогою агробактерій дикого штаму A4, та генів *ifn-α2b* і *nptII* у корнях, отриманих за використанням агробактерій, що несли вектор pCB161.

Частота трансформації листових експлантів полину звичайного сягала 100 %, в той час як при використанні коренів у якості експлантів трансгенні «бородаті» корені отримати не вдалось. Отже, при генетичній трансформації доцільно використовувати саме листки в якості експлантів для отримання трансгенних коренів з високою частотою.

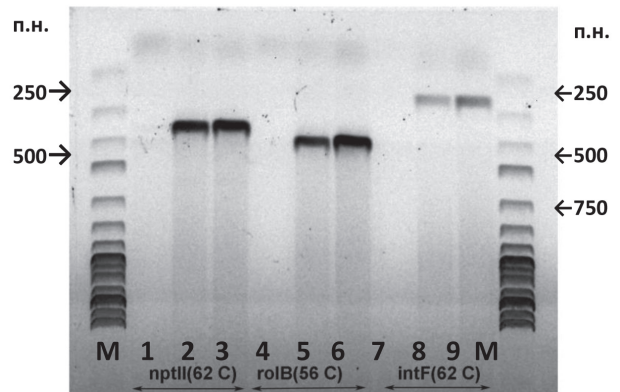


Рис. 1. Електрофореграма результатів ПЛР аналізу присутності генів *nptII* (1-3), *rolB* (4-6) та *ifn-α2b* (7-9) у трансгенних корнях полину, отриманих з використанням *A. rhizogenes* з вектором pCB161: треки 1, 4 та 7 – ДНК контрольних нетрансформованих рослин; треки 2, 3, 5, 6, 8, 9 – ДНК трансгенних коренів; М – маркери

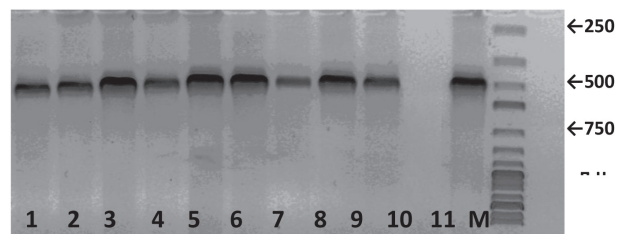


Рис. 2. Електрофореграма результатів ПЛР аналізу присутності генів *rolB* (4-6) у трансгенних корнях полину, трансформованих диким штамом *A. rhizogenes* A4; треки 1-9 – ДНК бородатих коренів, 10 – ДНК контрольних нетрансформованих рослин; 11 – плазмідна ДНК; М – маркер

Висновки

Вперше було отримано культуру «бородатих» коренів для *Artemisia vulgaris* L. з використанням агробактерій, що несли плазмиду з геном *ifn-α2b*. До цього часу роботи з агробактеріальної генетичної трансформації полину звичайного були проведені лише за допомогою диких штамів *A. rhizogenes*, або з перенесенням репортерних генів, таких як GUS. Визначено оптимальні умови трансформації та показано, що листки є оптимальним типом експланту, за використання якого частота отримання трансгенних коренів становила 100 %.

ЛІТЕРАТУРА

1. Erichsen-Brown C. Medicinal and Other Uses of North American Plants: A Historical Survey with Special Reference to the Eastern Indian Tribes. – New York: Dover Publications Inc., 1979. – 513 p.
2. Sujatha G., Zdravkovic-Korac S., Calic D., Flamini G., Ranjitha Kumari B.D. High-efficiency *Agrobacterium rhizogenes*-mediated genetic transformation in *Artemisia vulgaris*: Hairy root production and Essential oil analysis // *Industrial Crops and Prod.* – 2013. – 44, N 1. – P. 643–652.
3. Christey M.C. Use of Ri-mediated transformation for production of transgenic plants // *In Vitro Cell Dev-Pl.* – 2001. – 37, N 6. – P. 687–700.
4. Christey M.C., Braun R.H. Production of hairy root cultures and transgenic plants by *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation // *Methods Mol Biol.* – 2005. – 286, N 1. – P. 47–60.
5. Guillon S., Kumar Pati P., Rideau M., Gantet P. Harnessing the potential of hairy roots: dawn of a new era // *Trends Biotechnol.* – 2006. – 24, N 9. – P. 403–409.
6. Georgiev M.I., Pavlov A.I., Bley T. Hairy root type plant in vitro systems as sources of bioactive substances // *Appl. Microbiol Biotechnol.* – 2007. – 74, N 7. – P. 1175–1185.
7. Canto-Canche B., Loyola-Vargas V.M. Chemicals from roots, hairy roots, and their application // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 1999. – 464, N 1. – P. 464–475.
8. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture // *Phys. Plant.* – 1962. – 15, N 3. – P. 473–497.
9. Luchakivskaya Yu., Kishchenko O., Gerasymenko I., Olevinskaya Z., Simonenko Yu., Spivak M., Kuchuk M. High-level expression of human interferon alpha-2b in transgenic carrot (*Daucus carota* L.) plants // *Plant Cell Rep.* – 2011. – 30, N 3. – P. 407–415.
10. Matvieieva N., Kishchenko O., Potrochov A., Shakhovsky A., Kuchuk M. Regeneration of transgenic plants from hairy roots of *Cichorium intybus* L. var. *Foliosum Hegi* // *Cytol and Genetics.* – 2011. – 45, N 5. – P. 277–281
11. Дрейпер Дж., Скотт Р., Армитадж Ф. Генная инженерия растений. – М.: Мир, 1991. – 408 с.

DROBOT K.O., SHAKHOVSKY A.M., MATVIEIEVA N.A.

*Institute of Cell Biology and Genetic Engineering NAS of Ukraine,
Ukraine, 03680, Kyiv 143, Zabolotnogo str., 148, e mail: joyna56@gmail.com*

CONSTRUCTION OF *ARTEMISIA VULGARIS* L. HAIR ROOT CULTURE WITH HUMAN INTERFERON ALPHA 2B GENE

Aims. The obtaining of mugwort *Artemisia vulgaris* L. “hairy” root culture with human interferon 2b gene (*ifn- α 2b*) was the aim of this work. **Methods.** We used *Agrobacterium rhizogenes* wild strain A4 as well as *A. rhizogenes* carried pCB161 vector with *ifn- α 2b* gene under constitutive Mill rootspecific sugar beet promoter for mugwort genetic transformation. The genes were transferred into leaf and root explants. The presence of transgenes were determined by PCR analysis. **Results.** Transformation frequency was up to 100 % in case of leaf explants. Transgenic roots from other type of explants were not obtained. PCR analysis proved the presence of *nptII*, *ifn- α 2b* and *rolB* genes in mugwort “hairy” roots obtained via *A. rhizogenes*-mediated transformation. **Conclusions.** Thus, we obtained the transgenic *Artemisia vulgaris* L. “hairy” roots using *A. rhizogenes*-mediated transformation and transferred *ifn- α 2b*. Transformational frequency was the highest in case of leaves using as an explants – up to 100 %.

Keywords: genetic transformation, *Agrobacterium rhizogenes*, hairy roots, *Artemisia vulgaris* L., *ifn- α 2b* gene.