

УДК 581.1

ОТРИМАННЯ ТРАНСГЕННИХ РОСЛИН ЕНДІВІЮ *CICHORIUM ENDIVIA* L. ТА ЦИКОРІЮ *C. INTYBUS* L.

О. Ю. КВАСКО, Н. А. МАТВЄЄВА, А. М. ШАХОВСЬКИЙ, М. В. КУЧУК

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України

Україна, Київ, 03680, вул. Заболотного, 148

e-mail: kvasko.olena@gmail.com

Мета. Мета роботи – отримання трансгенних рослин цикорію та ендівію. **Методи.** Трансформацію рослин здійснювали шляхом кокультивування сім'ядоль з *Agrobacterium tumefaciens* з вектором рСВ125 (ген *bar*). Наявність гена *bar* аналізували за допомогою ПЛР. Частоту регенерації трансгенних рослин визначали як співвідношення кількості експлантів, на яких відбувалась регенерація зелених рослин на селективному середовищі, до загальної кількості експлантів у відсотках, ефективність – як середню кількість зелених рослин на експлант. **Результати.** Отримано трансгенні рослини *Cichorium intybus* L. та *C. endivia* L. з геном *bar*. Частота регенерації рослин цикорію та ендівію після трансформації становила відповідно 15 та 20 %, ефективність – 8 та 5 рослин на експлант. **Висновки.** Оптимізовано умови *Agrobacterium tumefaciens*-опосередкованої трансформації рослин цикорію та ендівію вектором із геном *bar*. Частота регенерації трансгенних рослин була вищою у ендівію, проте ефективність регенерації у рослин цього виду виявилась нижчою, ніж у цикорію.

Ключові слова: *Cichorium intybus*, *Cichorium endivia*, трансформація.

Вступ. Рослини *Cichorium endivia* L. та *C. intybus* L. є лікарськими, синтезують ряд біологічно активних речовин – сесквітерпенові лактони та глікозиди [1, 2], фенольні сполуки [3], інулін [4], кумарини [5], а також використовуються у харчуванні. Становить інтерес покращення та урізноманітнення властивостей цих рослин. Отримання рослин з новими ознаками можливо за допомогою методів біотехнології, зокрема методами генетичної інженерії.

Для отримання трансгенних рослин необхідною умовою є наявність ефективних методик регенерації. На цей процес у культурі *in vitro* впливає наявність компонентів живильного середовища, а саме мінеральних елементів та регуляторів росту. Velayutham et al. [6] для успішної регенерації рослин цикорію *in vitro* додавали в середовище бензиламінопурин (БАП) та індоліоцтову кислоту (ІОК). Caffaro et al. [7] та Profumo et al. [8] встановили, що для регенерації пагонів з калюсної тканини доцільно використовувати середовище з 2,4-дихлорфеноксиоцтовою кислотою (2,4 Д).

Методами генетичної інженерії створено трансгенні рослини *C. intybus* зі змінним фенотипом [9], з геном ацетолактатсинтази *csr1-1*, що забезпечує стійкість до гербіциду хлорсульфурону [10], генами β-глюкоронідази (*uidA*) та неоміцинофосфотрансферази II (*npt II*) [11], геном лейкоцитарного інтерферону людини *ifn-α2b* [12]. Стосовно генетичної трансформації рослин ендівію відомості у доступній літературі відсутні.

Метою даної роботи було створення трансгенних рослин *C. endivia* та *C. intybus* з геном *bar* та порівняння регенерації трансгенних рослин цих видів.

© О. Ю. КВАСКО, Н. А. МАТВЄЄВА, А. М. ШАХОВСЬКИЙ, М. В. КУЧУК, 2012

Матеріали і методи

Вихідним матеріалом слугувало насіння *C. endivia* L. var *latifolium* Lam (фірма «НК-Еліт») та *C. intybus* L. var *foliosum* Hegi, сорт Пала росса («Елітсортнасіння»). Асептичні рослини було отримано шляхом поверхневої стерилізації насіння [12]. Проростки культивували на агаризованому безгормональному середовищі МС при температурі 26 °С та 16-тигодинному фотоперіоді.

Для визначення складу середовища, оптимального для регенерації рослин *C. intybus* та *C. endivia*, сім'ядольні експланти з попередньо зробленими насічками поміщали у чашки Петрі на поверхню агаризованих середовищ, склад яких наведено в таблиці. Для визначення чутливості до гербіциду Баста рослин ендівію та цикорію використовували відповідно середовища № 1 та № 2 з додаванням 1, 2, 4, 6, 8 або 10 мг/л гербіциду.

Для трансформації рослин використовували *A. tumefaciens* штам GV3101 з векторною конструкцією pCB125, T-ДНК якої містила ген *bar* та ген інтерферону людини *inf-α2b* [15]. Сім'ядольні експланти із попередньо зробленими насічками кокультивували із суспензією агробактерії протягом 30 хв., після чого експланти переносили на середовище № 1 (для ендівію) та № 2

(для цикорію) без антибіотиків. Після культивування на цьому середовищі протягом 2 діб експланти переносили на відповідні середовища із 600 мг/л цефотаксиму для елімінації агробактерії. Через 14 діб експланти переносили на ті самі середовища з Баста у концентрації 1 мг/л (для цикорію) або 2 мг/л (для ендівію). Частоту регенерації трансформованих рослин визначали як відношення кількості експлантів, на яких утворювались зелені пагони, до загальної кількості експлантів. Ефективність регенерації підраховували як середню кількість зелених рослин на експлант.

Геномну ДНК виділяли із зелених листків стерильних рослин ЦТАБ методом [16]. ПЛР-ампліфікацію геномної ДНК проводили на ампліфікаторі Mastercycler personal 5332 (Eppendorf) з термостатованою кришкою в пробірках з ультратонкими стінками. Реакційна суміш (20 мкл) містила однократний ПЛР-буфер із сульфатом амонію, 0,2 мкМ праймерів до *bar* гену [4], 200 мкМ кожного з дезоксинуклеозидтрифосфатів, 0,5 од. Таq-полімерази, 10-50 нг ДНК-проби. Умови ампліфікації: первинна денатурація – 94 °С, 3 хв., 30 циклів ампліфікації (94 °С, 30 сек. – 60 °С, 30 сек. – 72 °С), остаточна полімеризація – 72 °С, 5 хв.

Таблиця. Склад живильних середовищ для регенерації рослин цикорію та ендівію з сім'ядольних експлантів

Складові середовища	Вміст (мг/л) в середовищах №№							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Макроелементи	MS *	MS	MS	MS	B ₅ **	B ₅	B ₅	B ₅
Мікроелементи	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS
Вітаміни	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS
Кінетин	2,5	0,5	-	-	2,5	0,5	-	-
Бензиламінопурин (БАП)	-	-	2,5	0,5	-	-	2,5	0,5
α-нафтилоцтова кислота (НОК)	0,5	0,05	0,5	0,05	0,5	0,05	0,5	0,05
Морфоліноетансульфонова кислота	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Гідролізат казеїну	300	300	300	300	300	300	300	300
Цукроза	30000	30000	30000	30000	30000	30000	30000	30000
Агар	6000	6000	6000	6000	6000	6000	6000	6000

* – макро- та мікроелементи, вітаміни за MS [13]; ** макроелементи за B₅ [14]

Результати та обговорення

Першим етапом роботи було визначення оптимальних умов регенерації рослин цикорію та ендівію. Для цього використовували 8 варіантів середовищ з різним вмістом мінеральних елементів (МС або В5) та регуляторів росту (кінетину або БАП). Регенерація рослин *C. intybus* та рослин *C. endivia* дикого типу ефективніше відбувалась на середовищі МС, ніж на середовищі В5 (рис. 1). Так, при використанні середовища МС (№№ 1–4) частота регенерації рослин цикорію та ендівію становила 60–100 % та 50–100 % відповідно, тоді як при використанні середовища В5 (№№ 5–8) – 20–60 % та 5–7 % відповідно. Середовище МС відрізнялося від В5 вищим вмістом азоту у формі катіонів NH_4^{4+} та NO_3^- . Ймовірно, підвищення концентрації азоту стимулювало регенерацію рослин цикорію та ендівію.

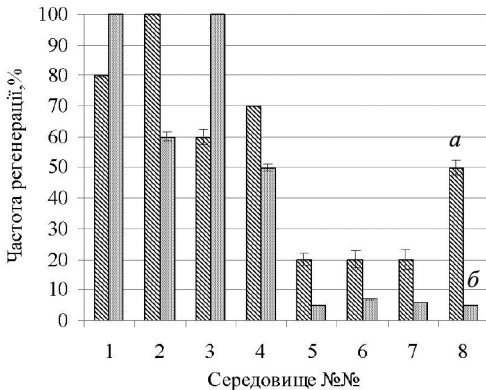


Рис. 1. Частота регенерації рослин цикорію та ендівію з сім'ядольних експлантів (склад середовищ №№ 1–8 наведено в таблиці): а – *C. intybus*; б – *C. endivia*

Частота регенерації рослин цикорію була вищою при вирощуванні на середовищі, що містило кінетин. Так, при культивуванні на середовищі № 2 (0,5 мг/л кінетину та 0,05 мг/л НОК) частота регенерації становила 100 %, тоді як на середовищі № 4 (0,5 мг/л БАП та 0,05 мг/л НОК) – 70 %. При дослідженні умов регенерації рослин ендівію визначено, що принципове значення має не стільки тип цитокініну, що додається до се-

редовища, скільки його концентрація. Так, при додаванні 2,5 мг/л кінетину або БАП частота регенерації складала 100 %, тоді як при зниженні концентрації цих цитокінінів у 5 разів відбувалось зниження частоти регенерації до 50–60 % відповідно. Отже, оптимальним для регенерації рослин цикорію є середовище МС з 0,5 мг/л кінетину та 0,05 мг/л НОК, а для рослин ендівію – МС з 2,5 мг/л кінетину або БАП та 0,05 мг/л НОК.

Було визначено селективну концентрацію гербіциду Баста для відбору трансформованих рослин. При додаванні гербіциду в концентрації 4, 6, 8, або 10 мг/л відбувалась 100 %-на загибель експлантів цикорію та ендівію. Оптимальними умовами, за яких можна було здійснювати відбір стійких рослин, визначено такі: культивування протягом 14 дб у присутності 1 або 2 мг/л гербіциду (цикорій та ендівій відповідно); далі перенесення на середовище без Баста до початку регенерації; після появи перших регенерантів перенесення на середовища, що містили 1 або 2 мг/л Баста (цикорій та ендівій відповідно) для відбору стійких рослин.

Отримання трансгенних рослин цикорію та ендівію здійснювали шляхом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації. Регенерація рослин цикорію починалася через 12 дб після трансформації. Через 2 доби після початку регенерації експланти були перенесені на середовище з 1 мг/г гербіциду. Стійкі до Баста рослини залишались зеленими, а решта гинули.

Експланти ендівію спочатку також культивували на середовищі без гербіциду. Через 5 дб після трансформації почали формуватись ділянки калюсної тканини. Експланти було перенесено на середовище з 2 мг/л гербіциду та культивовано протягом 14 дб. Далі зелені ділянки калюсної тканини переносили на середовище МС з 2,5 мг/л кінетину, 0,5 мг/л НОК та 600 мг/л цефотаксиму, але без додавання Баста. За таких умов через 56 дб після трансформації відбувалась регенерація зелених пагонів, які

далі культивували на селективному середовищі.

Частота регенерації зелених рослин цикорію та ендівію на середовищі з Баста складала 15 % та 20 % відповідно. Ефективність регенерації на селективному середовищі рослин ендівію була меншою, ніж рослин цикорію – 5 та 8 рослин на експлант відповідно.

Отримані зелені рослини вибірково проаналізовано за допомогою ПЛР на присутність гена *bar*. Показано наявність даного гена в усіх аналізованих рослин цикорію та ендівію (рис. 2).

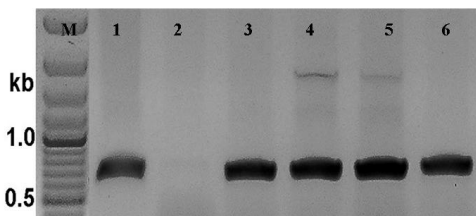


Рис. 2. Результати ПЛР-аналізу трансгенних рослин цикорію та ендівію: М – маркер; 1 – плазмідна ДНК; 2 – ДНК нетрансформованої рослини; 3–4 – лінії трансгенних рослин цикорію, 5–6 – лінії трансгенних рослин ендівію

Отримані результати ПЛР-аналізу свідчать про те, що визначені умови регенерації та трансформації, а також використана концентрація гербіциду дозволяє з достатньо високою ефективністю відібрати рослини, трансформовані вектором із геном *bar*.

Висновки

Показано, що *A. tumefaciens* може бути використана для трансформування рослин роду *Cichorium*. Оптимальними умовами для регенерації рослин цикорію визначено культивування сім'ядольних експлантів на середовищі МС з 0,5 мг/л кінетину, 0,05 мг/л НОК, а рослин ендівію – на середовищах МС з 2,5 мг/л БАП або кінетину та 0,5 мг/л НОК. Частота регенерації рослин цикорію виявилась меншою (15 %) в порівнянні з частотою регенерації ендівію (20 %). Для рослин цикорію ефективність

регенерації – 8 рослин на екплант – була більшою, ніж у рослин ендівію – 5 рослин на екплант.

Список літератури

1. Seto M., Miyase T., Umehara K., Ueno A., Hirano Y., Otani N. Sesquiterpene lactones from *Cichorium endivia* L. and *C. intybus* L. and cytotoxic activity // Chem Pharm Bull. – 1988. – Vol. 36, № 7. – P. 2423–2429.
2. Warashina T., Miyase T. Sesquiterpenes from the roots of *Cichorium endivia* // Chem Pharm Bull. – 2008. – Vol. 56, № 10. – P. 1445–1451.
3. Kisiel W., Michalska K. Sesquiterpenoids and phenolics from roots of *Cichorium endivia* var. *crispum* // Fitoterapia. – 2006. – Vol. 77, № 5. – P. 354–357.
4. Ranjitha Kumari B. D., Velayutham P., Anitha S. A comparative study on inulin and esculin content of *in vitro* and *in vivo* plant of Chicory (*Cichorium intybus* L. Cv. Lucknow Local) // Advantage in Biological Research. – 2007. – Vol. 1, № 1-2. – P. 22–25.
5. Kisiel W., Michalska K. A new coumarin glucoside ester from *Cichorium intybus* // Fitoterapia. – 2002. – Vol. 73, № 6. – P. 544–546.
6. Velayutham P., Ranjithakumari B.D., Baskaran P. An efficient *in vitro* plant regeneration system for *Cichorium intybus* L.–an important medicinal plant // Journal of Agricultural Technology. – 2006. – Vol. 2, № 2. – P. 287–298.
7. Caffaro L., Gastaldo P., Dameri R. M., Bennici A. Callus induction and plantlet regeneration in *C. intybus*: effect of different growth regulators // Protoplasma. – 1982. – Vol. 126, № 6. – P. 215–220.
8. Profumo P., Gastaldo P., Caffaro L. Callus induction and plantlet regeneration in *Cichorium intybus* L.: II. Effect of different hormonal treatments // Protoplasma. – 1985. – Vol. 126, № 3. – P. 215–220.
9. Sun L.-Y., Touraud G., Charbonnier C., Tepfer D. Modification of phenotype in Belgian endive (*Cichorium intybus*) through genetic transformation by *Agrobacterium rhizogenes*: conversion from biennial to annual flowering // Transgenic research. – 1991. – Vol. 1, № 3. – P. 14–22.
10. Vermeulen A., Vaucheret, Pautot V., Chupeau N. *Agrobacterium* – mediated transfer of a mutant *Arabidopsis* acetolactate synthase gene confers resistance to chlorsulfuron in chicory (*Cichorium intybus* L.) // Plant Cell Rep. – 1992. – Vol. 11, № 5-6. – P. 243–247.
11. Abid M., Palms B., Derycke., Tissier J. P., Rambour S. Transformation of chicory and expression of the bacterial *uidA* and *nptII* genes in the transgenic regenerants // Journal of Experimental Botany. – 1995. – Vol. 46, № 284. – P. 337–346.

12. Матвеева Н. А., Шаховський А. М., Герасименко І. М., Кваско О. Ю., Кучук М. В. Перенесення гена біосинтезу інтерферону- $\alpha 2b$ в рослини цикорію (*Cichorium intybus* L.) методом агробактеріальної трансформації // Біополімери та клітина. – 2009. – Т. 25, № 2. – С. 120–125.
13. Murashige T. Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* – 1962. – Vol. 15, № 3. – P. 473–497.
14. Gamborg O.L., Miller R.A., Ojim K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells // *Exp. Cell Res.* – 1968. – Vol. 50, № 1. – P. 148–151.
15. Gerasymenko I. M., Lypova N. M., Sakhno L. A., Shcherbak N. L., Sindarovska Y. R., Bannikova M. A., Sheludko Y. V., Kuchuk N. V. Obtaining and analysis of tobacco, lettuce and rape plants transformed with human interferon alfa 2b gene // Фактори експериментальної еволюції організмів. – Збірник наукових праць, за ред. Кунаха В.А. – Київ: Логос. – 2009. – Т. 7. – С. 274–279.
16. Дрейпер Дж., Скотт Р. Выделение нуклеиновых кислот из клеток растений. В кн. Генная инженерия растений. – М.: Мир, 1991. – С.241–245.

Представлено В.А. Кунахом
Надійшла 18.04.2012

ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ЭНДИВИЯ *CICHORIUM ENDIVIA* L. И ЦИКОРИЯ *C. INTYBUS* L.

Е. Ю. Кваско, Н. А. Матвеева, А. М. Шаховський,
М. В. Кучук

Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины
Украина, 03680, Киев, ул. Зabolotного, 148
e-mail: kvasko.olena@gmail.com

Цель. Цель работы – создание трансгенных растений эндивия и цикория. **Методы.** Трансформацию растений проводили путем кокультивирования семядоль с *Agrobacterium tumefaciens* с вектором pCB125 (ген *bar*). Присутствие гена *bar* анализировали с помощью ПЦР. Частоту регенерации трансгенных растений определяли как отношение количества эксплантов, на которых наблюдалась регенерация зеленых растений на селективной среде, к общему количеству эксплантов в процентах, эффективность – как среднее количество зеленых растений на эксплант. **Результаты.** Получены трансгенные растения *Cichorium endivia* и *C. intybus* с геном *bar*. Частота регенерации растений цикория и эндивия после транс-

формации составила соответственно 15 и 20 %, эффективность – 8 и 5 растений на эксплант. **Выводы.** Оптимизированы условия *Agrobacterium tumefaciens*-опосредованной трансформации растений эндивия и цикория вектором с геном *bar*. Частота регенерации зеленых растений после трансформации была выше у эндивия, чем у цикория, но эффективность регенерации у эндивия оказалась ниже.

Ключевые слова: *Cichorium intybus*, *Cichorium endivia*, трансформация.

OBTAINING OF TRANSGENIC ENDIVE *CICHORIUM ENDIVIA* L. AND CHICORY *C. INTYBUS* L. PLANTS

O. Y. Kvasko, N. A. Matvieieva, A. M. Sha-hovskiy, N. V. Kuchuk

Institute of cell biology and genetic engineering
NAS of Ukraine
Ukraine, 03680, Kiev, Zabolotnogo str., 148
e-mail: kvasko.olena@gmail.com

Aim. Obtaining of transgenic endive and chicory plants was the purpose of our work. **Methods.** Plant transformation was carried out by co-cultivation of cotyledons with *Agrobacterium tumefaciens* (vector pCB125). The *bar* gene presence was analyzed by PCR. The frequency of transgenic plant regeneration was counted as a proportion of the explants number with regenerated plants under selective conditions to the total number of explants. The efficiency of transgenic plant regeneration was estimated as a number of green plants per explants. **Results.** The transgenic endive and chicory plants with *bar* gene were obtained using *Agrobacterium*-mediated transformation. The frequency of chicory and endive plant regeneration after transformation constituted 15 and 20 %, and efficiency – 8 and 5 plants per explants, respectively. **Conclusions.** The conditions of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of endive and chicory plants by vector with *bar* gene were optimized. The frequency of green endive plants regeneration after transformation was higher than chicory plants regeneration but efficiency of endive plant regeneration was lower.

Key words: *Cichorium intybus*, *Cichorium endivia*, transformation.