

УДК 575.222.7:581.1

ОТРИМАННЯ ТА КУЛЬТИВУВАННЯ БОРОДАТИХ КОРЕНІВ РОСЛИН *BIDENS PILOSA* L.

Н.А. МАТВЕЄВА, А.М. ШАХОВСЬКИЙ

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України
Україна, Київ, вул. Акад. Заболотного, 148
e-mail: joyna56@gmail.com

Мета. Метою роботи було отримання «бородатих» коренів рослин *Bidens pilosa* L. з використанням *Agrobacterium rhizogenes*-опосередкованої трансформації. **Методи.** Використовували *A. rhizogenes* з векторами pCB161 та pCB124, які мали гени *nptII* (nos промотор та термінатор) та *ifn-α2b* (відповідно M11 або 35S промотор, оcs термінатор). Експланти кокультивували з агробактеріальною суспензією протягом 30 хв, переносили на агаризоване середовище 1/2МС. Трансгенну природу коренів підтверджували методом ПЛР із праймерами, специфічними до генів *rolB*, *nptII*, *ifn-α2b*. **Результати.** Ріст коренів розпочинався через 7–10 днів, причому на листових експлантах кількість утворених коренів була значно меншою, ніж на стеблових (2–8 та 12–22 відповідно). Частота коренеутворення становила 56,7±6,5 % та 84,4±5,8 % відповідно для листових та стеблових експлантів. Корені мали характерний фенотип – значне галузження, від’ємний геотропізм та росли на середовищі без регуляторів росту. Методом ПЛР було підтверджено наявність *rolB*, *ifn-α2b*, *nptII* генів. **Висновки.** Розроблено систему генетичної трансформації рослин *B. pilosa* з використанням *A. rhizogenes* та отримано культуру «бородатих» коренів. Методом ПЛР підтверджено наявність перенесених генів *rolB*, *ifn-α2b*, *nptII*. Отримані лінії коренів відрізнялися фенотипово та за швидкістю росту.

Ключові слова. *Bidens pilosa* L., *Agrobacterium rhizogenes*, трансформація, «бородаті» корені.

Вступ. *Bidens pilosa* L. (череда волосиста) – рослина, яка належить до родини Asteraceae та розповсюджена у тропічному та субтропічному регіонах. У ряді країн Африки, Південної Америки, Азії ці рослини використовуються у народній медицині для лікування низки захворювань. Так, екстракти з рослин виявляють протимікробну [1,2], противірусну [3], антигельмінтну [4], протидіабетичну [5–8], протипухлинну [9–11], протизапальну [12], антиоксидантну [13] активність, попереджують підвищення кров’яного тиску [14], є активними проти маларійного плазмодія [15, 16], стимулюють синтез інтерферонів [17].

Лікувальний ефект екстрактів з череди волосистої зумовлений синтезування у цих рослинах біологічно активних сполук, наприклад, поліацетиленів та флавоноїдів [15, 17, 18].

Широкий спектр лікувальних властивостей рослин *B. pilosa* робить їх надзвичайно привабливим об’єктом для біотехнологічних досліджень, зокрема, для отримання культури трансгенних коренів, оскільки «бородаті» корені можуть бути використані для синтезування у їхніх клітинах біологічно активних сполук. Однак досі є лише одна публікація, що стосується генетичної трансформації рослин *B. pilosa* [19], причому трансформування здійснювали бактеріями *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. Автори використовували вектор pCHS з геном *Petunia* халконсинтази *chs* та геном неоміцинфосфотрансферазили *nptII*. Частота трансформації виявилася низькою, оскільки з 1373 експлантів було отримано лише 21 лінію рослин і з них тільки 13 мали обидва трансгени. Разом з тим, цей перший успішний експеримент свідчить про можливість генетичної трансформації рослин даного виду.

Метою наших досліджень було розроблення системи трансформування рослин череди волосистої з використанням *Agrobacterium rhizogenes*-опосередкованої трансформації та отримання культури трансгенних коренів *Bidens pilosa*.

© Н.А. МАТВЕЄВА, А.М. ШАХОВСЬКИЙ, 2015

Матеріали і методи

Вихідним матеріалом слугувало насіння рослин *Bidens pilosa*, зібране нами на території природного ареалу рослин цього виду на науковій базі «Ла Фаворита» Північного технічного університету Еквадору (Республіка Еквадор). Для введення в культуру *in vitro* поверхню насіння стерилізували, використовуючи комерційний розчин «Білизна» у співвідношенні з дистильованою водою 1:4 (10 хв). Після поверхневої стерилізації насіння промивали стерильною дистильованою водою тричі по 10 хв та розміщували на поверхні агаризованого живильного середовища МС [20] зі зменшеним удвічі вмістом макросолей (1/2МС) і культивували у термостатованому приміщенні при температурі +24 °С. Отримані проростки вирощували на такому самому середовищі при температурі +24 °С та 16-годинному освітленні. Асептичні рослини розмножували живцюванням в умовах *in vitro*.

Для генетичної трансформації використовували бактерії *Agrobacterium rhizogenes* з векторними конструкціями рСВ161 та рСВ124, які мала гени *ifn-α2b* (M11 або 35S промотор, оcs термінатор) та *nptII* (nos промотор, nos термінатор). Бактеріальну суспензію отримували, вирощуючи бактерії *A. rhizogenes* А4 на живильному середовищі LB протягом 16–18 год. на ротаційному шейкері при температурі +28 °С. Листки та стеблові частини культивованих *in vitro* рослин надрізали та кокультивували з бактеріальною суспензією протягом 30 хв, далі експланти переносили на поверхню агаризованого живильного середовища 1/2МС, а через три доби – на середовище 1/2МС із додаванням 600 мг/л цефотаксиму для елімінації агробактерій та вирощували при температурі +24°С і 16-годинному освітленні.

Частоту коренеутворення визначали як відсоток експлантів, на яких формувалися корені після кокультивування з агробактеріями. Як контроль використовували експланти, які не культивували у бактеріальній суспензії.

Загальну ДНК виділяли ЦТАБ методом [21]. Наявність перенесених генів визначали за допомогою методу ПЛР з використанням праймерів (розроблені з використанням програми Fast PCR), специфічних до генів *ifn-α2b*, *nptII* та *rolB* (табл.). Умови ампліфікації: початкова денатурація – 94°С, 3 хв; 30 циклів (94°С, 30 с – 56–67°С, 30–40 с – 72°С, 30 с); кінцева полімеризація – 72°С, 10 хв.

Результати та обговорення

У результаті поверхневої стерилізації насіння було отримано асептичні проростки, які відокремлювали від коренів та розмножували живцюванням, укорінюючи їх на живильному середовищі 1/2МС (рис. 1, а). Корені починали формуватися протягом 3–5 днів, для їхнього ініціювання додавання регуляторів росту до живильного середовища не було потрібно. Листки та міжвузля отриманих таким чином асептичних рослин використовували як експланти для генетичної трансформації з використанням *A. rhizogenes*.

Після кокультивування з агробактеріальною суспензією листових та стеблових експлантів ріст коренів розпочинався через 7–10 діб, причому на листових експлантах кількість утворених коренів була значно меншою, ніж на стеблових (2-8 та 12–22 відповідно, рис. 1, б). Відокремлені від експлантів корені культивували на середовищі 1/2МС із цефотаксिमом для елімінації агробактерій та субкультивували щотижня. Частота коренеутворення була вищою при використанні стеблових експлантів та становила 56,7±6,5 %

Таблиця. Праймери, використані для підтвердження наявності перенесених генів у «бородатих» коренях *Bidens pilosa*

Ген	Праймери	Розмір ампліфікованого фрагмента, п.н.	Температура відпау
<i>nptII</i>	5'- cctgaatgaactccaggacgagca-3' 5'- gctctagatccagagtcccgtcagaag-3'	622	65°С
<i>ifn-a2b</i>	5'-ttgatgctctggcacag- 3' 5'-ttctgctctgacaacctc-3'	396	60°С
<i>rolB</i>	5'-atggatcccaattgctattccttcacga-3' 5'-ttaggctcttcttcaggtttactgcagc-3'	780	56°С
<i>vir D1</i>	5'-atgtcgcaaggcagtaagccca -3' 5'-ggagtcttcatgagcaaa-3'	432	60°С

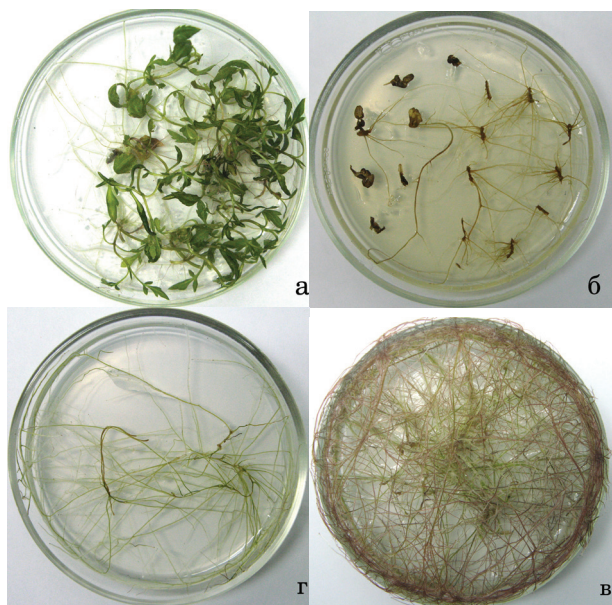


Рис. 1. Ріст рослин *B. pilosa* *in vitro* (а), утворення «бородатих» коренів після трансформування з використанням *Agrobacterium rhizogenes* (б) та відмінності у швидкості росту ліній трансгенних коренів (в, г)

та 84,4±5,8 % відповідно для листових та стеблових експлантів. Через 3–4 тижні вирощування на живильному середовищі 1/2МС з 600 мг/л цефотаксиму та 30 мг/л канаміцину (селективний антибіотик) корені мали характерний фенотип – значне галузження, від’ємний геотропізм та росли на середовищі без регуляторів росту.

Швидкість росту трансгенних коренів є важливим технологічним показником з точки зору можливого використання для продукування певних сполук. Тому наявність ліній, які мають швидкий приріст біомаси, дає можливість відбору найпродуктивнішого матеріалу. Отримані нами лінії коренів відрізнялися фенотипічно за кількістю/довжиною кореневих волосків та за швидкістю росту. Так, максимальну швидкість росту коренів спостерігали для лінії №1, мінімальну – для лінії № 2. Приріст маси при стартовій масі 100 мг для ліній №1, №2 та №3 за 30 діб становив відповідно 4,8±0,68 г, 1,5±0,34 та 2,8±0,3 г (рис.1, в, г; рис.2). Відокремлені корені контрольних рослин на безгормональному середовищі практично не росли, хоча і спостерігалось їхнє короткотермінове видовження (на 0,5–1,0 см за 30 діб), вірогідно, за рахунок наявності у клітинах залишкових регуляторів росту.

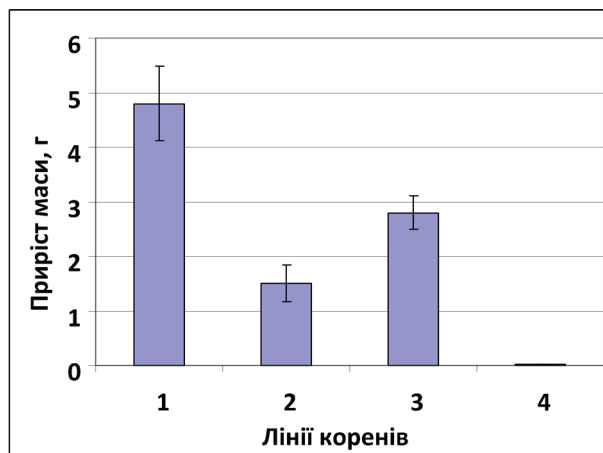


Рис. 2. Приріст маси коренів *Bidens pilosa* за 30 діб при культивуванні на безгормональному середовищі: 1–3 – лінії «бородатих» коренів; 4 – ізольовані корені контрольних рослин

Таким чином, отримані після трансформування корені мали характерний для «бородатих» коренів фенотип та росли на середовищі без додавання регуляторів росту. Методом ПЛР із використанням праймерів, специфічних до гена *rolB* *A. rhizogenes*, та праймерів до генів *ifn-α2b* і *nptII* було підтверджено трансгенну природу отриманих культур (рис. 3). ПЛР аналіз із праймерами, специфічними до агробактеріального гена *virD1* виявився негативним, що свідчило про відсутність контамінації *A. rhizogenes*. Отже, використана методика трансформування з використанням *A. rhizogenes* виявилася достатньо ефективною та дала можливість отримати трансгенні корені рослин *B. pilosa*. Частота трансформації виявилася значно вищою, ніж у єдиних опублікованих у 2012 р. дослідженнях з трансформування *B. pilosa* Wang зі співавторами [19], у яких за використання *A. tumefaciens* з 1373 експлантів було отримано лише 13 трансгенних рос-

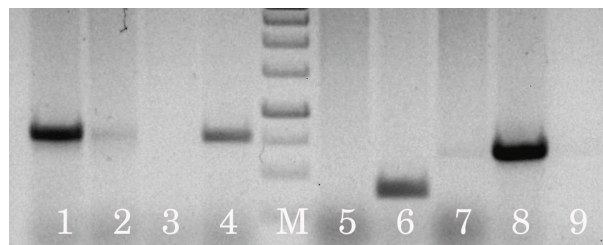


Рис. 3. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК з коренів причепи волосистої: *rolB* (1, 2, 3, 4, 780 п.н.); *ifn-α2b* (5, 6, 396 п.н.) та *nptII* (7, 8, 622 п.н.); 9 – без ДНК; 3, 5, 7 – ДНК коренів контрольних рослин, М – маркер

лин, тобто, частота трансформації становила близько 1 %. Запропонована нами методика може бути використана для ефективного отримання культури трансгенних коренів *B. pilosa* як із застосуванням агробактерій дикого типу, так і для перенесення до цих рослин цільових генів, які відповідають за синтез біологічно активних сполук.

Висновки

Вперше розроблено ефективну систему генетичної трансформації рослин *B. pilosa* з використанням *A. rhizogenes* та з частотою до 84,4±5,8 % отримано культуру «бородатих» коренів із типовим для трансгенних коренів фенотипом. Методом ПЛР підтверджено наявність перенесених генів *rolB*, *ifn-α2b* та *nptII*. Лінії коренів відрізнялися за швидкістю росту, причому приріст маси коренів за 30 днів коливався від 1,5±0,34 до 4,8±0,68 г залежно від лінії.

Перелік літератури

1. Tobinaga S., Sharma M.K., Aalbersberg W.G. et al. Isolation and identification of a potent antimalarial and antibacterial polyacetylene from *Bidens pilosa* // *Planta Med.* – 2009. – Vol. 75, № 6. – P.624–628.
2. Silva Junior J., Cerdeira C.D., Chavasco J.M. et al. In vitro screening antibacterial activity of *Bidens pilosa* Linné and *Annona crassiflora* Mart. against oxacillin resistant *Staphylococcus aureus* (ORSA) from the aerial environment at the dental clinic // *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* – 2014. – Vol. 56, № 4. – P. 333–340.
3. Nakama S., Tamaki K., Ishikawa C. et al. Efficacy of *Bidens pilosa* extract against Herpes Simplex Virus infection *in vitro* and *in vivo* // *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* – 2012. – Article ID413453, <http://dx.doi.org/10.1155/2012/413453>.
4. Mbogning T. G., Poné J. W., Komtangi M. C. et al. In vitro anthelmintic activity of *Bidens pilosa* Linn. (Asteraceae) leaf extracts against *Haemonchus contortus* eggs and larvae // *Europ. J. of Med. Plants.* – 2014. – Vol. 4, № 11. – P. 1282–1292.
5. Hsu Y.J., Lee T.H., Chang C.L. et al. Anti-hyperglycemic effects and mechanism of *Bidens pilosa* water extract // *J. Ethnopharmacol.* – 2009. – Vol. 122, № 2. – P. 379–383.
6. Yang W.C. Botanical, pharmacological, phytochemical, and toxicological aspects of the antidiabetic plant *Bidens pilosa* L. // *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* – 2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/698617>.
7. Chang S.L., Chang C.L., Chiang Y.M. et al. Polyacetylenic compounds and butanol fraction from *Bidens pilosa* can modulate

- the differentiation of helper T cells and prevent autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice // *Planta Med.* – 2004. – Vol. 70. – P. 1045–1051.
8. Chien S.C., Young P.H., Hsu Y.J. et al. Anti-diabetic properties of three common *Bidens pilosa* variants in Taiwan // *Phytochem.* – 2009. – Vol. 70, № 10. – P. 1246–1254.
 9. Sundararajan P., Dey A., Smith A. et al. Studies of anticancer and antipyretic activity of *Bidens pilosa* whole plant // *African Health Sci.* – 2005. – Vol. 6, № 1. – P. 27–30
 10. Kwiecinski M.R., Benelli P., Felipe K.B. et al. SFE from *Bidens pilosa* Linné to obtain extracts rich in cytotoxic polyacetylenes with antitumor activity // *J. of Supercritical Fluids.* – 2011. – Vol. 56, № 3. – P. 243–248.
 11. Chang J.S., Chiang L.C., Chen C.C. et al. Antileukemic activity of *Bidens pilosa* L. var. *minor* (Blume) Sherff and *Houttuynia cordata* Thunb // *Amer. J. of Chinese Med.* – 2001. – Vol. 29. – P. 303–312.
 12. Fotso A.F., Longo F., Djomeni P.D., et al. Analgesic and antiinflammatory activities of the ethyl acetate fraction of *Bidens pilosa* (Asteraceae) // *Inflammopharmacol.* – 2014. – Vol. 22, № 2. – P. 105–114.
 13. Yang H. L., Chen S. C., Chang N.W. et al. Protection from oxidative damage using *Bidens pilosa* Extracts in normal human erythrocytes // *Food and Chem Toxicol.* – 2006. – Vol. 44. – P. 1513–1521.
 14. Dimo T., Rakotonirina S.V., Tan P.V. et al. Leaf methanol extract of *Bidens pilosa* prevents and attenuates the hypertension induced by high-fructose diet in Wistar rats // *J. Ethnopharmacol.* – 2002. – Vol. 83. – P. 183–191.
 15. Oliveira F.Q., Andrade-Neto V., Krettli A.U. et al. New evidences of antimalarial activity of *Bidens pilosa* roots extract correlated with polyacetylene and flavonoids // *J. Ethnopharmacol.* – 2004. – Vol. 93, №1. – P. 39–42.
 16. Andrade-Neto V.F., Brandão M.G., Oliveira F.Q. et al. Antimalarial activity of *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) ethanol extracts from wild plants collected in various localities or plants cultivated in humus soil // *Phytother. Res.* – 2004. – Vol. 18, № 8. – P. 634–639.
 17. Chang S.L., Chiang Y.M., Chang Cicero L.T. et al. Flavonoids, centaurein and centaureidin, from *Bidens pilosa*, stimulate IFN-expression // *J. Ethnopharmacol.* – 2007. – Vol. 112. – P. 232–236.
 18. Silva F.L., Fischer D.C., Tavares J.F. et al. Compilation of secondary metabolites from *Bidens pilosa* L. // *Molecules.* – 2011. – Vol. 16, № 2. – P. 1070–1102.
 19. Wang C.K., Hsu S.Y., Chen P.Y., To K.Y. Transformation and characterization of transgenic *Bidens pilosa* L. // *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* – 2012. – Vol. 109, № 3. – P. 457–464.
 20. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol. Plantarum.* – 1962. – Vol. 15. – P. 473–497.
 21. Draper J., Scott R. The isolation of plant nucleic acids. plant genetic transformation and gene expression: a laboratory manual. – Oxford, Great Britain: Blackwell Sci. Publ., 1988. – 355 p.

Представлено О.М. Тищенко
Надійшла 02.02.2015

**ПОЛУЧЕНИЕ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ
«БОРОДАТЫХ» КОРНЕЙ РАСТЕНИЙ *BIDENS PILOSA* L.**

Н.А. Матвеева, А.М. Шаховський

Институт клеточной биологии и генетической инженерии
НАН Украины
Украина, Киев, ул. Акад. Заболотного 148
e-mail joyna56@gmail.com

Цель. Целью работы было получение «бородатых» корней растений *Bidens pilosa* L. с использованием *Agrobacterium rhizogenes*-опосредованной трансформации. **Методы.** Использовали *A. rhizogenes* A4 с векторами pCB161 и pCB124, которые имели гены *nptII* (nos промотор и терминатор) и *ifn-α2b* (соответственно M11 или 35S промотор, ocs терминатор). Экспланты кокультивировали с агробактериальной суспензией в течение 30 мин., переносили на агаризованную среду 1/2МС. Трансгенную природу полученных корней подтверждали методом ПЦР с праймерами, специфичными к генам *rolB*, *nptII*, *ifn-α2b*. **Результаты.** Рост корней начинался через 7–10 суток, причем на листовых эксплантах количество корней было значительно меньше, чем на стеблевых (2–8 и 12–22 соответственно). Частота корнеобразования составляла 56,7±6,5 % и 84,4±5,8 % для листовых и стеблевых эксплантов. Корни имели характерный фенотип – ветвление, отрицательный геотропизм и росли на среде без регуляторов роста. Методом ПЦР подтверждено наличие *rolB*, *ifn-α2b*, *nptII* генов. **Выводы.** Впервые разработана система генетической трансформации растений *B. pilosa* с использованием *A. rhizogenes*, получена культура «бородатых» корней. Методом ПЦР подтверждено наличие перенесенных генов *rolB*, *ifn-α2b*, *nptII*. Полученные линии корней отличались по скорости роста.

Ключевые слова. *Bidens pilosa* L., *Agrobacterium rhizogenes*, трансформация, «бородатые» корни.

ESTABLISHMENT OF *BIDENS PILOSA* L. 'HAIRY' ROOT CULTURE

N.A. Matvieieva, A.M. Shakhovsky

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, NAS of
Ukraine
Ukraine, 03143, Kyiv, Akad. Zabolotnogo str, 148
e-mail: joyna56@gmail.com

Aim. The aim of the work was the establishment of *Bidens pilosa* L. «hairy» root culture using *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation. **Methods.** *A. rhizogenes* strain A4 carried pCB161 and pCB124 vectors with the selective *nptII* (nos promoter and terminator) and *ifn-α2b* (M11 or 35S promoter respectively, and ocs terminator) genes were used for genetic transformation. Explants were cocultivated with bacterial suspension for 30 min and transferred to 1/2MS solidified medium. PCR analysis with primers specific for *rolB*, *nptII*, and *ifn-α2b* genes was used to confirm the transgenic nature of obtained roots. **Results.** The growth of roots started in 7-10 days after the transformation. The number of roots generated on the leaf explants was significantly lower than of those formed on the stem explants (2-8 and 12-22, respectively). The frequency of root formation for leaf and stem explants was 56.7±6.5 % and 84.4±5.8 %, respectively. The roots demonstrated the typical phenotype with significant branching, negative geotropism and were able to grow without growth regulators in the nutrient medium. The presence of *rolB*, *ifn-α2b*, and *nptII* genes was confirmed by PCR analysis. **Conclusions.** An effective system for genetic transformation of *B. pilosa* plants using *A. rhizogenes*-mediated transformation method was developed and «hairy» root culture was established. The presence of transferred genes was confirmed by PCR analysis. The obtained «hairy» root lines differed in growth rate.

Keywords. *Bidens pilosa* L., *Agrobacterium rhizogenes*, transformation, «hairy» root culture.