

ДРОБОТ К.О.✉, МАТВЄЄВА Н.А., ШАХОВСЬКИЙ А.М.

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,

Україна, 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 148, e-mail: katyadrobot@gmail.com

✉ katyadrobot@gmail.com, (063) 880-25-78

ОСОБЛИВОСТІ ГЕНЕТИЧНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ ЛІКАРСЬКИХ РОСЛИН *ARTEMISIA VULGARIS* L., *ARTEMISIA ANNUA* L. ТА *RUTA GRAVEOLENS* L. З ВИКОРИСТАННЯМ *AGROBACTERIUM RHIZOGENES*

Генетична інженерія рослин – галузь біотехнологічних досліджень, що динамічно розвивається. Поставлені завдання є різноплановими та охоплюють дослідження, метою яких є суто фундаментальні роботи стосовно, наприклад, функціонування перенесених генів, а також прикладні дослідження, спрямовані на розроблення біотехнологій, результати яких можуть становити практичний та комерційний інтерес. До останніх слід віднести розроблення стратегій одержання біологічно активних сполук (БАС) із рослинної сировини з використанням біотехнологічних підходів. До цільових сполук належать як такі, що природно синтезуються в рослинах *in vivo*, так і невластиві для рослин (наприклад, тваринного або мікробного походження). Використання методів генетичної інженерії дає змогу значно підвищити рівень накопичення природних рослинних БАС.

Agrobacterium-опосередкована трансформація рослин є першим розробленим методом перенесення чужорідних генів. Вона базується на природній здатності ґрунтових бактерій *Agrobacterium tumefaciens* та *A. rhizogenes* родини Rhizobiaceae переносити частину свого генома до клітин рослин. Трансформація з використанням *A. rhizogenes* є шляхом одержання культури «бородатих» коренів, у яких також відбувається накопичення БАС, причому досить часто у більшій кількості, ніж у вихідних рослин, що є наслідком перенесення до генома специфічних генів рослин або агробактерій, неспецифічного впливу перенесених генів тощо. Трансформовані корені є потенційними продуцентами різних сполук, включаючи антиоксиданти, вторинні метаболіти та ін. Відбір найбільш продуктивних ліній «бородатих» коренів, які характеризуються швидким ростом та підвищеним рівнем накопичення БАС, культивування їх у біореакторах є шляхом до створення біотехнологій отримання сполук із лікувальними властивостями. Вихідним матеріалом для трансформації можуть бути

різні частини рослин, зокрема, стебло [1], сім'ядолі [2], листки [3] тощо.

Рослини роду *Artemisia* та *Ruta graveolens* синтезують ряд біологічно активних сполук. Зокрема, *A. annua*, *A. vulgaris*, *A. vestita*, *A. dubia* відомі як джерело вторинних метаболітів та ефірних олій. Рослини використовують для лікування малярії [4], вони мають протидіабетичні [5], антипротозойні [6], протипухлинні [7] властивості. Тому їх можна визначити як такі, що становлять інтерес у біотехнологічних дослідженнях із метою отримання цінних сполук.

Рута запашна – багаторічна трав'яниста рослина, поширена у південно-західній частині України, у Середземномор'ї, Китаї, Японії, Америці. Особливістю її хімічного складу є одночасна наявність алкалоїдів (0,2–1,4 %) і ефірної олії (у сушеній траві – до 0,7 %), флавоноїдного глікозиду рутину, фурукумарину бергаптену, алкалоїду рутақридону, органічних кислот, вітамінів. Екстракт із рути може бути використано як антисептичний, інсектицидний засіб [8]. Активні інгредієнти з рути зумовлюють протигрибкові властивості, які можуть бути корисними для сільського господарства (як альтернативний природний фунгіцид) і медицини (для лікування мікозів) [9]. Рутин, що синтезується у рослинах, має високу антиоксидантну активність, знижує рівень триацилгліцеридів [10]. Доведено проти-запальну дію рути [11], протипухлинну активність [12]. Незважаючи на широке використання рути у традиційній та народній медицині, рослина досі залишається недостатньо вивченою у культурі *in vitro*. Так, є лише декілька публікацій щодо генетичної трансформації рути [13].

Метою нашої роботи було визначення оптимального типу експланту та параметрів кокульттивування з агробактеріями для оптимізації умов трансформації, які можна було б використовувати у подальшому для отримання трансгенних коренів полину та рути з цільовими генами, які кодують синтез білків медичного призначення.

Матеріали і методи

Асептичні рослини *Artemisia vulgaris* L., *Artemisia annua* L. та *Ruta graveolens* L. (рис. а, в, д) отримували шляхом поверхневої стерилізації насіння. Для цього насіння послідовно витримували в 70 % етанолі (30 с), 25 % розчині комерційного препарату «Білизна» (10 хв) та промивали тричі по 10 хв у стерильній дистильованій воді. Оброблене таким чином насіння пророщували в чашках Петрі на агаризованому безгормональному середовищі Мурасіге і Скуга [14] зі зменшеним удвічі вмістом макросолей (1/2 МС) у темряві при 24 °С.

Трансформацію проводили за допомогою агропінового штаму *A. rhizogenes* А4. Бактерії вирощували на ротаційному шейкері (200 об/хв) на середовищі LB [15] з карбеніциліном (100 мг/л) та рифампіцином (50 мг/л) протягом 24 годин при температурі 28 °С. Бактеріальні клітини осаджували центрифугуванням (3000g, 10 хв), осад ресуспендували в розчині 10 мМ MgSO₄. Суспензію бактерій використовували для генетичної трансформації досліджуваних рослин.

Для трансформації використовували різні типи експлантів – листки, міжвузля, корені. Експланти з попередньо зробленими насічками інкубували у бактеріальній суспензії протягом 30 хв, далі культивували в чашках Петрі на агаризованому середовищі 1/2 МС протягом 1–9 діб. Після цього їх переносили на середовище 1/2 МС, до якого додавали 600 мг/л цефотаксиму. Ефективність застосованого протоколу оцінювали за частотою утворення коренів із характерними для «бородатих» коренів ознаками (негативний геотропізм, значне галуження, ріст на середовищі без регуляторів росту). Частоту коренеутворення визначали як відношення кількості експлантів із коренями характерного фенотипу до загальної кількості використаних експлантів, виражене у відсотках.

Після формування коренів їх відділяли від експлантів та вирощували на агаризованому живильному середовищі 1/2 МС при температурі +24 °С. На перших етапах культивування протягом 6 місяців після трансформації використовували середовище, яке містило антибіотик цефотаксим у концентрації 600 мг/л для повної елімінації агробактерій.

Загальну рослинну ДНК для проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) виділяли відповідно до протоколу [15] ЦТАБ методом. Аналіз «бородатих» коренів здійснювали за допомогою полімеразної ланцюгової реакції з

праймерами, специфічними до гена *rolB* (5'-atgga tcccaaatgctattccttccacga-3' та 5'-ttaggctcttctcagg tttactgcagc-3'). Реакцію проводили на ампліфікаторі Mastercycler personal 5332 (Eppendorf) з термостатованою кришкою в пробірках з ультратонкими стінками за методикою, описаною раніше [16]. Продукти ПЛР аналізували за допомогою електрофорезу в 1,5 % агарозному гелі у Tris-боратній буферній системі.

Для тестування протимікробної активності рослинних екстрактів проти *A. rhizogenes* застосовували диск-дифузний метод (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1993).

Результати та обговорення

У ході вирощування експлантів після культивування з агробактеріальною суспензією на живильному середовищі без цефотаксиму протягом короткого періоду часу (до 3 діб) отримати «бородаті» корені як полину, так і рути не вдалося. Експланти, хоча і не гинули одразу після трансформації, коренів не формували. Водночас із збільшенням до 4–9 діб (залежно від виду рослин) тривалості періоду вирощування на середовищі без цефотаксиму, який пригнічує ріст агробактерій, було отримано трансгенні корені. Визначено, що найкращим типом експлантів є листки. Так, частота трансформації з міжвузль та листків становила у *A. vulgaris* 15 % та 100 %; у *A. annua* 10 % та 10 %; у *R. graveolens* 2 % та 3 % відповідно. За використання коренів у якості експлантів трансгенні лінії отримано не було. Методом ПЛР було підтверджено наявність у отриманих лініях коренів агробактеріального гена *rolB* (рис. 3).

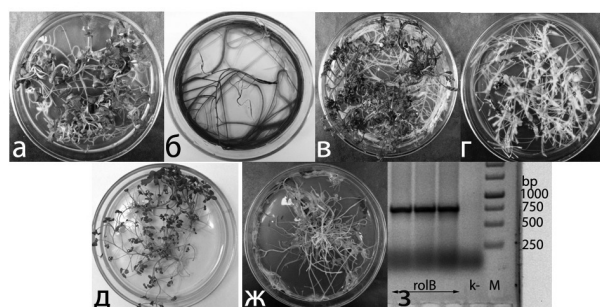


Рис. Нетрансформовані рослини (а, в, д) та трансгенні корені (б, г, ж) *A. vulgaris*, *A. annua* та *R. graveolens* відповідно; електрофореграма продуктів ПЛР аналізу (з) присутності генів *rolB* у трансгенних коренях (М – маркер, к – ДНК контрольної рослини)

Оскільки частота трансформації рути виявилася досить низькою, було проведено тестування екстрактів на наявність активності, що пригнічує ріст агробактерій. Визначено, що екстракти з рослин *R. graveolens* дійсно інгібували ріст *A. rhizogenes* A4. Діаметр зони відсутності росту бактерій навколо диска з нанесеним екстрактом для водних, ДМСО, етанольних та ацетонових екстрактів становив відповідно 12 ± 2 , 20 ± 2 , 22 ± 1 та 19 мм. Отже, виявлені проблеми отримання «бородатих» коренів після кокультивування експлантів *R. graveolens* з суспензією *A. rhizogenes*, ймовірно, можна пояснити саме синтезуванням у використаних рослинах сполук із протимікробною дією. Подовження терміну культивування експлантів на живильному середовищі 1/2 МС без додавання цефотаксиму, який інгібує ріст бактерій, до 6–8 діб дало можливість отримати «бородаті» корені (рис. ж). Імовірно, за таких умов агробактерії частково виживали, розмножувалися та виконували властиву їм функцію перенесення генів до клітин рослин.

Досі є лише невелика кількість публікацій з *A. rhizogenes*-опосередкованої трансформації *A. vulgaris*. У проведених експериментах [17] частота трансформації варіювала від 38 % (за використання апексів у якості експланта) до 92,6 % (за використання листя). Визначено відмінності у вірулентності різних штамів агробактерій під час трансформації *A. vulgaris*. Найвірулентнішою виявилася бактерія А4, що несла вектор, у той час як за трансформації агробактерією штаму ATCC15834 отримати трансгенні корені вдалося лише на апексах із частотою до 12,3 %. *A. rhizogenes*-опосередкована трансформація *A. annua* здійснювалася для дослідження впливу перенесених генів на накопичення артемізиніну. Використовували як дикі штами агробактерій А4, 15834, К599, LBA9402, 9365 та 9340 (при додаванні ацетосерингону) [18], так і агробактерії, що несли гени, які регулюють синтез артемізиніну, наприклад, ген синтезу фарнезил дифосфат синтази FDS [19]. За умови використання диких штамів частота трансформації варіювала від 75 % (А4) до 100 % (LBA 9402) на листових та стеблових експлантах, а за використання агробактерій, що містили вектор із геном FDS, частота трансформації листових експлантів становила 40–60 %.

У наших дослідженнях за оптимізації умов трансформації та використання оптимального типу експланту (листки) було отримано «бородаті» корені полину з частотою до 100 %, причому ми не використовували ацетосерингон. Отже, шляхом подовження часу вирощування експлантів на середовищі без цефотаксиму можна отримати «бородаті» корені полину з високою частотою і без застосування сигнальних сполук.

A. rhizogenes LBA 9402 та А4 раніше [13] використовували для отримання трансгенних коренів рути (експланти – гіпокотилі, пагони та калус). Лише 5 % гіпокотилів формували корені після кокультивування з агробактерією штаму LBA 9402. Отримати «бородаті» корені за використання штаму А4 не вдалося через високу чутливість цих бактерій до сполук, які синтезуються у рослинах рути. Отримання трансгенних коренів тільки за використання гіпокотилів автори пояснюють тим, що у клітинах цих зразків токсичні для бактерій кумарини та фуранокумарини накопичуються у меншій кількості, ніж у калусних клітинах або у зрілих частинах рослин. Водночас нами було отримано «бородаті» корені і за використання зрілих листків вирощуваних *in vitro* рослин рути. Важливим моментом отримання трансгенних коренів визначено збільшення періоду, через який експланти переносили на середовище з цефотаксимом. Отже, збільшення часу культивування на середовищі без антибіотика, який пригнічує ріст агробактерій, дозволяє здійснити трансформацію та отримати трансформовані корені *R. graveolens*.

Висновки

Визначено, що *A. rhizogenes* може бути використана для отримання трансгенних коренів рослин *A. vulgaris*, *A. annua* та *R. graveolens*. Частота трансформації залежала від типу використаного експланту та часу культивування на живильному середовищі без цефотаксиму, який призначений для елімінації агробактерій. Найбільша частота трансформації (до 100 %), отримана за використання листків культивованих *in vitro* рослин *A. vulgaris*. Частота трансформації *R. graveolens* була найнижчою (3 %), що пов'язано з наявністю сполук, які пригнічують ріст агробактерій. Визначено, що для отримання трансгенних коренів рути необхідно значно подовжити термін культивування експлантів на живильному середовищі без цефотаксиму.

ЛІТЕРАТУРА

- Du L., Li Y., Yao Y. An efficient protocol for plantlet regeneration via direct organogenesis by using nodal segments from embryo-cultured seedlings of *Cinnamomum camphora* L. [Електронний ресурс] // PLoS One. – 2015. – Режим доступу: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4427331>.
- Nakajima I., Sato Y., Saito T., Moriguchi T., Yamamoto T. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation using cotyledons in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*) // Breed. Sci. – 2013. – 63, № 3. – P. 275–283.
- Wu S.L., Yang X.B., Liu L.Q., Jiang T., Wu H., Su C., Qian Y.H., Jiao F. *Agrobacterium*-mediated transient MaFT expression in mulberry (*Morus alba* L.) leaves // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2015. – 29, № 1 – P. 1–6.
- Mojarrab M., Naderi R., Heshmati Afshar F. Screening of different extracts from artemisia species for their potential antimalarial activity // Iran J. Pharm. Res. – 2015. – 14, № 2. – P. 603–608.
- Boudjelal A., Siracusa L., Henchiri C., Sarri M., Abderrahim B., Baali F., Ruberto G. Antidiabetic effects of aqueous infusions of *Artemisia herba-alba* and *Ajuga iva* in alloxan-induced diabetic rats // Planta Med. – 2015. – 81, № 9. – P. 696–704.
- Tasdemir D., Tierney M., Sen R. Antiprotozoal effect of *Artemisia indica* extracts and essential oil // Planta Med. – 2015. – 81, № 12–13. – P. 1029–1037.
- Tang C., Zhao Y., Huang S., Jin Y., Liu J., Luo J., Zheng J., Shi D. Influence of *Artemisia annua* extract derivatives on proliferation, apoptosis and metastasis of osteosarcoma cells // Pak. J. Pharm. Sci. – 2015. – 28, № 2. – P. 773–779.
- Haddouchi F., Chaouche T.M., Zaouali Y., Ksouri R., Attou A., Benmansour A. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from four *Ruta* species growing in Algeria // Food Chem. – 2013. – 141, № 1. – P. 253–258.
- Trovato A., Monforte M.T., Forestieri A.M., Pizzimenti F. *In vitro* anti-mycotic activity of some medicinal plants containing flavonoids // Boll. Chim. Farm. – 2000. – 139, № 5. – P. 225–227.
- Ratheesh M., Shyni G.L., Sindhu G., Helen A. Inhibitory effect of *Ruta graveolens* L. on oxidative damage, inflammation and aortic pathology in hypercholesteremic rats // Exp. Toxicol. Pathol. – 2011. – 63, № 1. – P. 285–290.
- Ratheesh M., Helen A. Anti-inflammatory activity of *Ruta graveolens* Linn on carrageenan induced paw edema in wistar male rats // Afr. J. Biotechnol. – 2007. – 6, № 10. – P. 1209–1211.
- Fadlalla K., Watson A., Yehualaeshet T., Turner T., Samuel T. *Ruta graveolens* extract induces DNA damage pathways and blocks Akt activation to inhibit cancer cell proliferation and survival // Anticancer Res. – 2011. – 31, № 1. – P. 233–241.
- Sidwa-Gorycka M., Krolicka A., Orlita A., Malinski E., Golebiowski M., Kumirska J., Chromik A., Biskup E., Stepnowski P., Lojkowska E. Genetic transformation of *Ruta graveolens* L. by *Agrobacterium rhizogenes*: hairy root cultures a promising approach for production of coumarins and furanocoumarins // Plant Cell Tiss Org. – 2009. – 97, № 1. – P. 59–69.
- 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.
- Маниатис Т., Фрич Е.Ф., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. – М.: Мир, 1984. – 480 с.
- Матвеева Н.А., Кіщенко О.М., Шаховський А.М., Кучук М.В. Синтез інуліну в «бородатих» коренях цикорію, трансформованого за допомогою *Agrobacterium rhizogenes* // Біотехнологія. – 2011. – 4, № 3. – С. 56–63.
- 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, № 1. – P. 643–652.
- Giri A., Ravindra S.T., Dhi V., Narasu M.L. Influence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy roots and artemisinin production in *Artemisia annua* // Curr. Sci. – 2001. – 81, № 4. – P. 378–382.
- Chen D-H., Liu C-J., Ye H-C., Li G-F., Liu B-Y., Meng Y-L., Chen X-Y. Ri-mediated transformation of *Artemisia annua* with a recombinant farnesyl diphosphate synthase gene for artemisinin production // Plant Cell Tiss Org. – 1999. – 57, № 1. – P. 157–162.

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

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

FEATURES OF *AGROBACTERIUM RHIZOGENES*-MEDIATED GENETIC TRANSFORMATION OF *ARTEMISIA VULGARIS* L., *ARTEMISIA ANNUA* L. AND *RUTA GRAVEOLENS* L. MEDICINAL PLANTS

Aim. *Artemisia vulgaris*, *Artemisia annua*, *Ruta graveolens* «hairy» roots obtaining was the aim of the work. **Methods.** We used A4 *A. rhizogenes* wild strain for genetic transformation. Leaf, internode and root explants were cocultivated with bacterial suspension and transferred onto MS medium. Cefotaxime were added to the medium in 3–9 days after transformation. The presence of *rolB* gene were determined by PCR analysis. **Results.** Transformation frequency (TF) was found to be 15% and 100% (*A. vulgaris*); 10% and 10% (*A. annua*); 2 % and 3% (*R. graveolens*) in case of internodes and leaves using respectively. This parameter depended in type of explants and time of it cultivation on the medium without cefotaxime. Prolongation of this period has led to TF increasing. PCR analysis proved the presence of *rolB* genes in obtained «hairy» roots. **Conclusions.** *A. vulgaris*, *A. annua* and *R. graveolens* «hairy» root cultures can be obtained using A4 *A. rhizogenes*-mediated transformation. Leaves were found to be the optimal explants for the effective «hairy» roots establishment.

Keywords: «hairy» roots, *Artemisia vulgaris*, *Artemisia annua*, *Ruta graveolens*.