

4. Майданюк Д.Н., Андреев И.О., Спиридонова Е.В., Чеченева Т.Н., Кунах В.А. Геномная изменчивость линии кукурузы Black Mexican Sweet Corn C456 в культуре тканей *in vitro*: результаты RAPD-анализа // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2006. – Т.4, №1. – С. 58-67.
5. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. – М.: Мир, 1984. – 480 с.
6. Борейко В. С. Индуцированные мутации у инбредных линий кукурузы при помощи химических мутагенов // Дис. на соискание уч. ст. канд. биол. наук. – К.: Ин-т молекулярной биологии и генетики АН УССР, 1978. – 190 с.

Резюме

RAPD-анализ геномов индивидуальных растений кукурузы линий Black Mexican Sweet, ВІР-27 и ЧК-218 и полученных от них каллусов показал низкий уровень изменчивости *in vitro*. В культивируемых тканях двух линий кукурузы обнаружен варибельный ампликон размером около 390 п.н., однако выяснить его функциональную роль путем анализа нуклеотидной последовательности не удалось.

RAPD-аналіз геномів окремих рослин кукурудзи ліній Black Mexican Sweet, ВІР-27 і ЧК-218 та отриманих від них калусних культур показав низький рівень мінливості *in vitro*. В культивованих тканинах двох ліній (BMS та ВІР-27) знайдено варіабельний амплікон розміром близько 390 п.н., проте з'ясувати його функціональну роль шляхом аналізу нуклеотидної послідовності не вдалося.

RAPD-analysis of maize plants from Black Mexican Sweet, VIR-27 and ChK-218 inbred lines as well as derived from them cultured tissues revealed low genetic variability *in vitro*. A variable amplicon of approximately 390 bp was found in cultured tissues of two inbred lines. An analysis of amplicon sequence did not allow to recognize it's function.

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

*Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України
Україна, 03143, Київ, вул. Заболотного 148. e-mail joyna@i.com.ua*

***CICHORIUM INTYBUS* L. ЯК ПЕРСПЕКТИВНИЙ ОБ'ЄКТ ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ**

Дослідження в галузі біотехнології рослин відрізняє їх практична спрямованість, зокрема, науковий і практичний інтерес становить використання досягнень генетичної інженерії в медицині та ветеринарії [1, 2]. Відомо, що гени, які кодують антигени бактеріальних чи вірусних патогенів, можуть експресуватися в клітинах рослин. При цьому вони зберігають свої імуномодулюючі властивості та можуть слугувати лікувальними і профілактичними засобами. Отже, генетично модифіковані рослини можуть бути використані для продукування фармакологічно активних білків, включаючи антитіла, вакцини, гормони. Нині розроблено методи, що дозволяють ініціювати в рослинах синтез бактеріальних антигенів. Це може бути здійснено шляхом генетичної трансформації [3], наприклад, методом агробактеріальної трансформації. Харчові культури, що не потребують термообробки, можуть стати природним, готовим до вживання продуктом для профілактики та лікування низки захворювань, тобто, так званими їстівними вакцинами [1]. Фармацевтичні препарати

рослинного походження мають ряд переваг. Їх виробництво та зберігання має відносно невелику вартість, вони придатні для масового виробництва [3].

В процесі отримання рекомбінантних білків важливим є вибір рослини – об’єкту трансформації. В залежності від мети ними можуть бути харчові або нехарчові культури. Харчові культури в профілактичних цілях можуть вживатися безпосередньо в їжу. Механізм імунізації такими “їстівними вакцинами” базується на розпізнаванні М-клітинами епітелію тонкого кишковика чужорідного білку, що має антигенні властивості. Нехарчові культури є потенційними виробниками – біофабриками цільових білків, які можуть бути виділені та очищені [4].

Цикорій (*Cichorium intybus* L.) – дворічна рослин родини Asteraceae - має спектр лікарських властивостей, що обумовлено наявністю інуліну, кумаринів, флавоноїдів, вітамінів [5]. Зокрема, цикорій використовують в медицині як гепатопротекторний, притивиразковий, протизапальний, кардіотонічний, диуретичний засіб [5, 6]. Цикорій є цінною харчовою культурою, адже кореневища рослин є сировиною для виготовлення заміни кави, а ряд виведених салатних сортів використовують в їжу у сирому вигляді. Отже, цикорій, зокрема, салатні сорти, може стати основою для створення біовакцин.

Оскільки цикорій не є розповсюдженим об’єктом, нами було вивчено деякі особливості культивування цієї рослини *in vitro*, зокрема, оптимізовані умови регенерації, мікророзмноження та укорінення. Результати цих досліджень було використано для отримання генетично модифікованих рослин з генами, що кодують синтез туберкульозних антигенів та інтерферону.

Матеріали та методи

Вихідним матеріалом було насіння цикорію *C. intybus* сорту Пала росса. Насіння стерилізували послідовно в 70% етанолі (1 хв.) і 25% розчині комерційного препарату «Білизна» (10 хв.), та промивали в дистильованій воді (60 хв.). Пророщували насіння на агаризованому середовищі MS [7] при 16 -годинному світловому фотоперіоді та температурі 24°C.

Для регенерації пагонів і трансформації використовували сім’ядольні та справжні листки 10-12-денних проростків. На них робили поперечні надрізи та культивували при 16-годинному світловому фотоперіоді та температурі 24°C.

Для визначення частоти регенерації рослин з сім’ядольних та листових експлантів, мікророзмноження та укорінення використовували середовища, що відрізнялися як вмістом солей (MS або B₅ [8], так і фітогормонів кінетина, α-нафтилоцтової кислоти (НОК), бензиламінопурина (БАП), індолілоцтової кислоти (ІОК), індолілмасляної кислоти (ІМК).

Для трансформації використовували *Agrobacterium tumefaciens* (штам GV3101) з векторними конструкціями pCB063 та pCB124 (рис. 1). При створенні векторної конструкції pCB063 був використаний бінарний вектор, що містить ген *nptII* з регуляторними послідовностями NOS промотору і термінатору. У ділянку Т-ДНК під контролем 35S промотору і OCS термінатору клонувана структурна послідовність гена, що кодує синтез туберкульозного антигена ESAT6. Т-ДНК вектору pCB124 містила селективний ген *nptII*, цільовий ген *ifn-α2b*, злитий з лідерною послідовністю, що забезпечує транспорт цільового білку в апопласт.

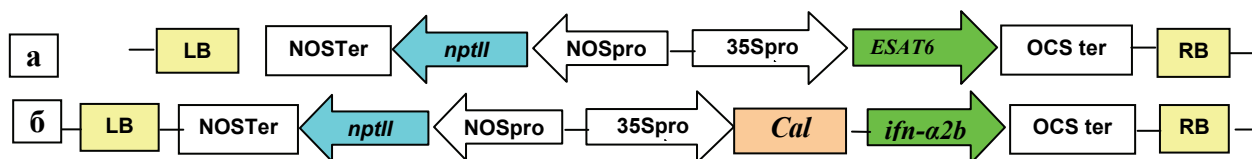


Рисунок 1- Схема Т-ДНК векторів pCB063 і pCB124 для агробактеріальної трансформації *Cichorium intybus*: LB, RB – ліва і права границі Т-ДНК; *nptII* – ген

неоміцинфосфотрансферази II; *ifn- α 2b* – ген інтерферону- α 2b; ESAT6 - ген, що кодує синтез туберкульозного антигена; NOSpro - промотор гена нопалінсинтази; NOSter – термінатор гена нопалінсинтази; 35Spro – промотор гена 35S-білку з геному вірусу мозаїки цвітної капусти; OCster – термінатор гена октопінсинтази; *cal* – кальретикулін.

Бактерії вирощували на середовищі LB [9] з антибіотиками (100 мг/л карбеніциліну, 50 мг/л рифампіцину, 25 мг/л гентаміцину) 48 годин при температурі 27⁰С. Бактеріальні клітини осаджували центрифугуванням (3000 об/хв, 10 хв.), осад ресуспендували в розчині 10мМ MgSO₄. Листки з попередньо зробленими насічками інкубували в бактеріальній суспензії 30 хв., промокали фільтрувальним папером і культивували на агаризованому середовищі MS без антибіотиків протягом двох діб. Після цього експланти переносили послідовно на середовища MS з 2,5 кінетину, 0,5 НОК (1 тиждень) та MS з 0,5 кінетину, 0,05 НОК з додаванням антибіотиків канамицину (25 мг/л) і цефотаксиму (600 мг/л). Пагони, що утворилися, укорінювали на середовищі MS без гормонів з антибіотиками в таких самих концентраціях.

Геномну ДНК виділяли із зелених листків стерильних рослин СТАВ методом [10].

Таблиця 2 - Праймери, використані для підтвердження присутності генів

Ген	Праймери	Розмір ампліфікованого фрагменту, п.н.
<i>nptII</i>	5'- cctgaatgaactccaggacgaggca-3' 5'- gctctagatccagagtcgctcagaag-3'	622
<i>Int-α2b</i>	5'-ctcctgctgaaggacag-3' 5'-ggagtcctcctcatcag-3'	264
<i>ESAT6</i>	5'-ctgaccatggcagagcagcagtggaatttcgc-3' 5'-gagaattctgcgaacatcccagtgctcg-3'	299

ПЛР-ампліфікацію геномної ДНК проводили на ампліфікаторі Mastercycler personal 5332 (Eppendorf) з термостатованою кришкою в пробірках з ультратонкими стінками. Реакційна суміш складалася з однократного ПЛР-буфера із сульфатом амонію, 0,2 мкМ відповідних праймерів (таблиця 2), 200 мкМ кожного з дезоксинуклеотидтрифосфатів, 0,5 ед. Таq-полімерази, 10-50 нг ДНК-проби. Загальний об'єм реакційної суміші становив 20 мкл.

Умови ампліфікації: первинна денатурація - 94⁰С, 3 хв., 30 циклів ампліфікації (94⁰С, 30 сек.- 60⁰С, 30 сек.- 72⁰С, 30 сек.), остаточно полімеризація - 72⁰С, 5 хв.

Результати та обговорення

Кількість публікацій щодо генетичної трансформації цикорію є обмеженою. Експерименти було спрямовано в напрямку створення рослин зі зміненим фенотипом, зокрема, з прискореним цвітінням [11], стійких до гербіцидів [12], таких, що синтезують фруктан [13]. Враховуючи той факт, що запорукою успіху застосування різних методів генетичної трансформації є оптимізовані та ефективні методики культивування рослин в культурі, нами проведено серію експериментів та визначено оптимальний склад поживних середовищ як для регенерації рослин з листових експлантів, так і для їх укорінення *in vitro*. Так, було показано, що при наявності у складі середовища макроелементів середовища MS та 0,5 мг/л кінетину частота регенерації становить 100%. При використанні у якості фітогормону 0,5 мг/л БАП (макроелементи MS) цей показник виявився нижчим та становив 70%. При зміні мінерального складу середовища на В5 спостерігали суттєве зменшення частоти регенерації, яка становила 0 – 50% в залежності від наявності та концентрації кінетину та БАП.

Визначено оптимальний склад середовища для укорінення отриманих регенерантів – ½ макроелементів MS та 0,1 - 2,5 ІМК. За таких умов культивування

коренева система мала максимальну вагу (до 276 мг на рослину), що перевищувало її розміри на середовищах MS та ½ MS у 30 та 10 разів відповідно.

Після агробактеріальної трансформації сім'ядольних експлантів отримано рослини, що зберігали зелене забарвлення при культивуванні в присутності селективної концентрації канаміцину (25 мг/л). Частоту трансформації експлантів вираховували за відношенням кількості експлантів із зеленими на селективному середовищі пагонами до загальної кількості експлантів у відсотках. Цей показник становив в залежності від використаної конструкції - рСВ063 або рСВ124 – 7,7 та 26,9% відповідно. Ми вважаємо, що успіху було досягнуто насамперед завдяки використанню об'єкту, що відзначається високим регенераційним потенціалом, адже частота регенерації рослин сорту Пала росса становила 100%.

Для підтвердження наявності цільових генів застосовували метод ПЛР-аналізу. Вибірковий аналіз тотальної ДНК рослин, регенерованих на селективному середовищі після трансформації конструкцією рСВ124 з та рослин після трансформації конструкцією рСВ063 показав присутність як селективного гена *nptII*, так і цільових генів *ifn-α2b* та *ESAT6*.

Таким чином, було показано, що до складу оптимального середовища для регенерації рослин з сім'ядольних експлантів цикорію сорту Пала росса мають входити мікроелементи за MS та 0,5 – 2,5 мг/л кінетину. Швидке укорінення спостерігається на середовищі, що містить ½ мікроелементів за MS та 0,1 – 0,5 мг/л ІМК. Показано, що методом агробактеріальної трансформації можуть бути отримані генетично модифіковані рослини цикорію як з геном *ifn-α2b*, так і з геном *ESAT6*. Частота трансформації експлантів виявилася досить високою та становила 7,7 – 26,9%, що, вірогідно, є результатом високої регенераційної здатності сорту Пала росса. Раніше нами було показано, що є можливим створення трансгенних рослин салату з геном *ESAT6* з високою ефективністю [14]. Проведені дослідження показують, що цикорій, так само як і салат, є можливим перспективним об'єктом генетичної трансформації, зокрема, може стати основою створення так званих біовакцин.

Література

1. Mason H.S., H. Warzecha, T. Mor et al. Edible plant vaccines: applications for prophylactic and therapeutic molecular medicine // Trends Mol. Med. – 2002. – Vol. 8, № 7. – P. 324 - 329.
2. Rice J., W. M. Ainley, P. Shewen . Plant-made vaccines: biotechnology and immunology in animal health // Anim. Health. Res. Rev. – 2005. – Vol. 6, № 2, P. 199 - 209.
3. Daniell H., S. J. Streatfield, K. Wycoff. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants // Trends Plant Sci. - 2001. – Vol. 6, № 5. – P. 219 - 226.
4. Horn M.E., K.M. Pappu, M.R. Bailey et al. Advantageous features of plant-based systems for the development of HIV vaccines // J. Drug Target. – 2003. – Vol. 11, № 8-10. - P. 539 - 545.
5. Gadgoli C., Mishra S.H. Antihepatotoxic activity of *Cichorium intybus* // Ethanopharmacology. - 1997. – Vol. 58, № 2. – P. 131-134.
6. Ahmad K.D., S.N. Gilani, A.H. Akhta, L. Khan. Antiulcerogenic evaluation of aqueous extracts of *Cichorium intybus* and *Phyllanthus emblica* in normal and aspirin-treated rats // Pakistan. J. of Scie. and Industrial Res. - 1998. – Vol. 41, № 2. – P. 92 - 96.
7. 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.
8. Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells // Exp. Cell Res. – 1968 – Vol. 50, № 1. – P. 148–151.
9. Маниатис Т., Фрич Е.Ф., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. – М.: Мир, 1984. - 480 с.

10. Дрейнер Дж., Скотт Р. Выделение нуклеиновых кислот из клеток растений // Генная инженерия растений. - М., 1991. - С. 241 - 245.
11. Harsh Pal Bais, R. T. Venkatesh, Arun Chandrashekar, G. A. Ravishankar Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation of Witloof chicory –In vitro shoot regeneration and induction of flowering // Current Sci. – 2001. - Vol. 80, № 1. - P. 83-87.
12. Vermeulen A., Vaucheret H., Pautot V., Chupeau Y. 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.
13. Vijn I., van Dijken A., Sprenger N., van Dun K., Weisbeek P., Wiemken A., Smeekens S. Fructan of the inulin neoseris is synthesized in transgenic chicory plants (*Cichorium intybus* L.) harbouring onion (*Allium cepa* L.) fructan:fructan 6G-fructosyltransferase // The Plant J. – 1997. – Vol. 11, № 3. - P. 387 – 398.
14. 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. – Т.44, № 2. – С. 27-32.

Резюме

Методом агробактеріальної трансформації отримані генетично модифіковані рослини цикорію сорту Пала росса з геном синтезу інтерферону *ifn-α2b* та з геном, що кодує синтез туберкульозного антигену ESAT6 з частотою трансформації експлантів 7,7 – 26,9%. Проведені дослідження показують, що цикорій є перспективним об'єктом генетичної трансформації, зокрема, може стати основою створення так званих біовакцин.

Методом агробактериальной трансформации получены трансгенные растения цикория сорта Пала росса с геном синтеза интерферона *ifn-α2b* и геном, кодирующим синтез туберкулезного антигена ESAT6. Цикорий может быть перспективным объектом генетической трансформации, в частности, может стать основой создания так называемых биовакцин.

Transgenic chicory plants cv. Pala rossa with gene coding synthesis of tubercular antigene ESAT6 and *ifn-α2b* genes have been resieved via Agrobacterium-mediated transformation with frequencies 7,7 – 26,9%. Chicory can be perspective object of genetic transformation, in particular, can become a basis of creation of so-called biovaccines.

МИХАЛЬСЬКА С.І., СЕРГЄЄВА Л.Є., ТИЩЕНКО О.М.

Інститут фізіології рослин та генетики НАН України, Україна, 03022, Київ, вул. Васильківська 31/1, e-mail: oltyko@gmail.com

МІНЛИВІСТЬ ГЕНОМУ КЛІТИННОЇ ЛІНІЇ СОЇ, СТІЙКОЇ ДО ОКСІАНІОНІВ ВОЛЬФРАМУ

Ускладнення генетико-селекційних програм потребує пошуку нетрадиційних підходів та методів, які дозволяють виявити та використати всі потенційні можливості рослинного організму для підвищення їх стійкості до несприятливих факторів довкілля. Практичне використання культури тканин рослин стимулюється високим рівнем генетичних змін, які з одного боку, можуть бути обумовлені гетерогенністю вихідного експланту, з іншого – умовами культивування *in vitro*. Генетична гетерогенність калюсних ліній може служити основою для технології створення генотипів з новими ознаками і подальшого отримання рослин – регенерантів або клітинних штамів з бажаними якостями [1-6].

Для гарантованого відбору цінних мутацій, що виникають на рівні інтактноі рослини *in vivo* або при культивуванні *in vitro* рослинних тканин, запропоновано напрямок клітинної селекції, який полягає у створенні селективних систем з використанням летальних концентрацій іонів важких металів [7]. Теоретично висунуто