

Література

1. Regelman J., Schüle T., Josupeit F.S., Horak J., Rose M., Entian K.D., Thumm M., Wolf D.H. Catabolite degradation of fructose-1,6-bisphosphatase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a genome-wide screen identifies eight novel GID genes and indicates the existence of two degradation pathways // *Mol Biol Cell*. – 2003. – 14 (4). – P. 1652–1663.
2. Shieh H.L., Chen Y., Brown C.R., Chiang H.L. Biochemical analysis of fructose-1,6-bisphosphatase import into vacuole import and degradation vesicles reveals a role for UBC1 in vesicle biogenesis // *J Biol Chem*. – 2001. – 276 (13). – P. 10398–10406.
3. Hung G.C., Brown C.R., Wolfe A.B., Liu J., Chiang H.L. Degradation of the gluconeogenic enzymes fructose-1,6-bisphosphatase and malate dehydrogenase is mediated by distinct proteolytic pathways and signaling events // *J. Biol Chem*. – 2004. – 279 (47). – P. 49138–49150.
4. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual* [2nd ed.]. – Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. – 510 p.
5. Nazarko V.Y., Futej K.O., Thevelein J.M., Sibirny A.A. Differences in glucose sensing and signaling for pexophagy between the baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* // *Autophagy*. – 2008. – 4 (3). – P. 381–384.
6. Gancedo C. Inactivation of 1,6-diphosphatase by glucose in yeast // *Journal of Bacteriology*. – 1971. – 107 (2). – P. 401–405.

DMYTRUK O.V.¹, **SIBIRNY A.A.**^{1,2}

¹ *Institute of Cell Biology, National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 79005, Lviv, Drahomanov str., 14/16, e-mail: verbaolena@gmail.com*

² *Department of Biotechnology and Microbiology, Rzeszow University, Poland, 35-601, Rzeszow, Zelwerowicza str., 4, e-mail: sibirny@cellbiol.lviv.ua*

CATABOLITE DEGRADATION OF FRUCTOSE-1,6-BISPHOSPHATASE IN METHYLOTROPHIC YEASTS *PICHA PASTORIS* AND *HANSENULA POLYMORPHA*

Aim. Fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) which is synthesized when cells are grown on non-fermentable carbon sources. When yeast cells are subsequently shifted to a glucose-containing medium, FBPase is rapidly inactivated and degraded. This process is called catabolite degradation. **Methods.** Standard molecular biological and biochemical methods were used. **Results.** The wild type strains of *P. pastoris* and *H. polymorpha* were analyzed by Western blot, using the antibodies for FBP protein of *S. cerevisiae*. It was shown that FBPase is mostly degraded after 5 hours of incubation of cells in glucose-containing medium. After shifting the cells from methanol or ethanol-containing media on glucose medium, FBPase activity of *P. pastoris* and *H. polymorpha* wild-type strains decreased 4.5–5 and 2–2.5 times, respectively. **Conclusions.** The recombinant strains of *P. pastoris* with the deletion of *FBP* gene were constructed and analyzed. Δfbp strains did not grow in the medium with non-fermentable carbon sources. To study the mechanisms of catabolite degradation, plasmids for the expression of *FBP* fused with GFP were constructed. The recombinant strains with the expression of these plasmids were obtained and analyzed.

Key words: yeasts, fructose-1,6-bisphosphatase, catabolite degradation.

УДК 575.222.7:581.1

ДРОБОТ К.О., МАТВЄЄВА Н.А., КВАСКО О.Ю., ШАХОВСЬКИЙ А.М.

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Україна, 03680, м. Київ, вул. Заболотного, 148, e-mail: joyna56@gmail.com

СТВОРЕННЯ КУЛЬТУРИ «БОРОДАТИХ» КОРЕНІВ РОСЛИН АЛТЕЇ ЛІКАРСЬКОЇ *ALTHAEA OFFICINALIS* L. З ВИКОРИСТАННЯМ РІЗНИХ ВЕКТОРНИХ КОНСТРУКЦІЙ З ГЕНОМ *ifn- α 2b* ЛЮДИНИ

Алтея лікарська (*Althaea officinalis* L., Malvaceae), багаторічна трав'яниста рослина, поширена у Європі, є лікарською та використовується як у нетрадиційній медицині,

так і у фармакології для створення лікарських препаратів. Рослини алтеї мають ряд лікувальних властивостей завдяки наявності мукополісахаридів та інших сполук. Її листки та

корені є джерелом флавоноїдів, глікозидів, кумаринів і використовуються як протизапальний, відхаркувальний засіб. У медичній практиці алтею вживають у вигляді відвару коренів при захворюваннях органів дихання, шлунку та ін. [1].

Не зважаючи на широке використання рослин алтеї у народній медицині та фармакології, ця рослина залишається недостатньо вивченою у культурі *in vitro*. Поряд із цим, використання лікарських рослин у якості об'єктів досліджень є перспективним напрямком біотехнології, у тому числі генетичної інженерії. Перш за все, лікарські рослини є природними продуцентами цінних біологічно активних сполук, які використовуються для лікування та профілактики низки захворювань. Методи генетичної інженерії дозволяють створити рослини, які синтезують одночасно як природні, так і невластиві їм сполуки, що обумовлено перенесенням відповідних цільових генів. Використання таких рослин, передусім культивованих у ферментерах «бородатих» коренів може бути менш затратним та економічно вигідним. Використання рослинної сировини у лікувальних цілях є більш безпечним, порівняно з синтетичними медичними препаратами [2].

На даний час існують лише поодинокі публікації з уведення алтеї в асептичну культуру [3]. Останнім часом з'явилася публікація щодо генетичної трансформації алтеї з уведенням до її геному гена синтезу білка циановірина [4].

Одним з часто застосовуваних способів уведення генетичної інформації у рослини класу Двудольних є трансформація за допомогою ґрунтових бактерій роду *Agrobacterium*. Завдяки природній здатності інфікувати рослини та переносити частину свого геному ці бактерії широко використовуються у біотехнології, зокрема для отримання культури «бородатих» коренів [5].

Створення культури «бородатих» коренів алтеї з використанням *Agrobacterium rhizogenes* викликає інтерес, оскільки культивування трансгенних коренів має низку переваг. По-перше, культура «бородатих» коренів характеризується необмеженим та швидким ростом на живильному середовищі, що не містить екзогенних регуляторів росту; по-друге, «бородаті» корені є невибагливими до умов вирощування та не потребують освітлення, отже отримані корені можна культивувати у ферментерах, що не суперечить законодавчо встановленим нормам вирощування генетично

модифікованих рослин. По-третє, культурі трансгенних коренів притаманна більш висока генетична стабільність порівняно з культурою клітин [6]. Все це робить культивовані *in vitro* «бородаті» корені зручним об'єктом для біотехнологічних маніпуляцій.

Отже, досі є актуальним проведення досліджень з генетичної трансформації алтеї лікарської, у тому числі отримання культури «бородатих» коренів. Відомо, що в результаті генетичної трансформації можуть змінюватись фізіологічні та біохімічні характеристики рослин, а також є дані, що процес трансформації як стресовий чинник може призводити до підвищення синтезу запасних сполук [7]. Тому на часі є дослідження біохімічних особливостей трансформованих коренів, зокрема, накопичення у них запасних сполук.

В даній роботі досліджували можливість отримання «бородатих» коренів *A. officinalis* з геном інтерферону $\alpha 2b$ людини, використовуючи вектори, які відрізнялися за промотором гена *ifn- $\alpha 2b$* , а також вміст фруктозозамісних цукрів у отриманих трансгенних коренях.

Матеріали і методи

Вихідним матеріалом слугувало насіння рослин *A. officinalis* (виробництво фірми «Насіння України»). Для уведення рослин у культуру *in vitro* насіння стерилізували розчином комерційного препарату «Білізна» (у співвідношенні з водою 1:3) протягом 10 хвилин, після чого промивали тричі по 5 хвилин стерильною дистильованою водою та переносили насіння на поверхню агаризованого середовища Мурасіге та Скуга (SMS) [8] зі зменшеним вдвічі вмістом макросолей. Культивування проводили при температурі 24°C та 16-годинному освітленні.

Експлантами для генетичної трансформації слугували 14-денні проростки алтеї, від яких відокремлювали листя, сім'ядолі, стебло та корені. Генетичну трансформацію проводили з використанням *Agrobacterium rhizogenes*, що містили ген інтерферону *ifn- $\alpha 2b$* людини під контролем конститутивного 35S промотору вірусу мозаїки цвітної капусти (*pCB124* [9]) або під контролем коренеспецифічного MII промотору цукрового буряку (*pCB161* [10]). Також для трансформації використовували дикий штам *A. rhizogenes* A4. Трансформацію проводили за описаною нами раніше методикою [11]. Після кокультивування з агробактеріями експланти вирощували в чашках Петрі на агаризованому середовищі S MS протягом

двох діб, потім переносили на середовище S MS з 600 мг/л цефатоксиму. Оскільки використані вектори мали ген *nptII*, селекцію трансгенних коренів проводили у 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 S MS з 600 мг/л цефатоксиму.

Для визначення вмісту фруктанів використовували пробу Селіванова [12], яка базується на здатності кетоцукрів давати забарвлення з резорцином у кислому середовищі. Оптичну густина вимірювали при довжині хвилі $\lambda = 550$ нм.

Результати та обговорення

Ріст коренів на експлантах починався через 12–15 діб після кокультивування з агробактеріями. Корені формувалися лише на листових експлантах, частота коренеутворення становила 50 % для експлантів з векторними конструкціями *pCB* 124 та A4 і 75 % для *pCB* 161. Корені мали характерні для «бородатих» коренів ознаки – росли на безгормональному середовищі, мали від’ємний геотропізм та значну розгалуженість. При використанні інших типів експлантів (стебло, сім’ядолі, корені) не було отримано позитивних результатів.

Проведені молекулярно-генетичні аналізи з використання полімеразної ланцюгової реакції підтвердили наявність цільового та селективного генів (відповідно *ifn- α 2b* та *nptII*),

а також *rolB* гена агробактерій (рис.). Отже, «бородаті» корені алтеї було отримано як з використанням дикого штаму агробактерій, так і з використанням агробактерій, що несли векторні конструкції, у яких ген інтерферону знаходився під контролем або 35S або M11 промоторів.

Генетична трансформація алтеї лікарської призводила до достовірного збільшення рівня накопичення фруктозовмісних цукрів. Корені контрольних рослин алтеї містили близько 13 мг фруктанів на один грам сухої маси коренів. В той же час, лінія, отримана за допомогою векторної конструкції *pCB* 124, мала найвищий вміст фруктанів – близько 41 мг/г сухої маси. Вміст фруктанів у лініях, отриманих після трансформації векторами *pCB* 161 та A4, також перевищував вміст фруктанів у коренях контрольних рослин та становив відповідно 28 мг/г та 35 мг/г сухої маси.

Відомо, що процес генетичної трансформації є стресовим фактором, тому, можливо, підвищення рівня фруктозовмісних цукрів у отриманих транс генних коренях було обумовлено саме процесом трансформації: пораненням, контактом з патогеном. Також, можливим є зміна синтезу фруктанів у зв’язку з перенесенням чужорідних генів до генома рослин. Аналогічне підвищення вмісту фруктанів у культурах «бородатих» коренів ми спостерігали у рослин інших видів, зокрема, у цикорію, ендівію та салату.

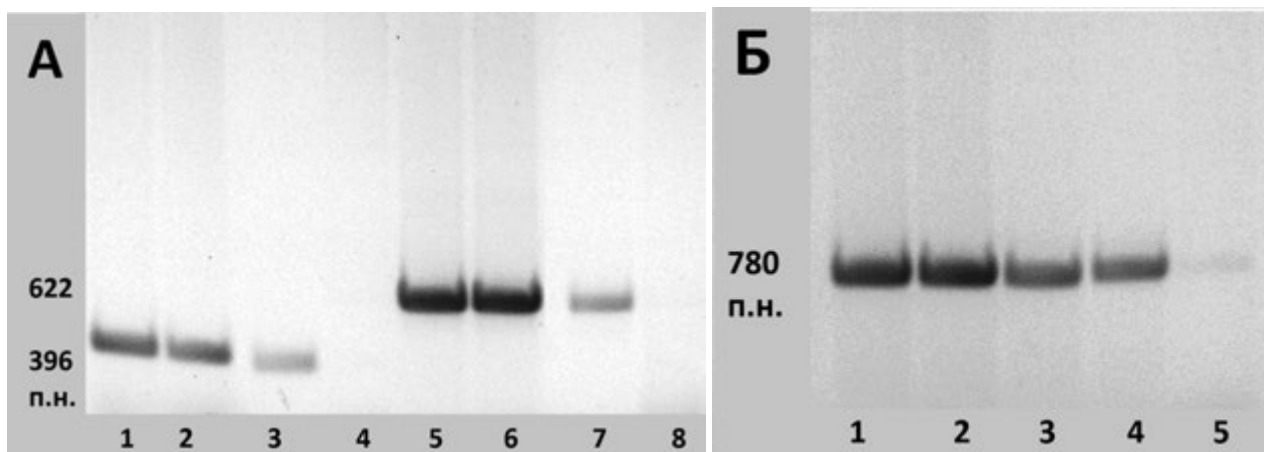


Рис. Електрофореграма результатів ПЛР аналізу присутності генів *ifn- α 2b* (А, 1–3) та *nptII* (А, 4–6), *rolB* (1–3) у трансгенних коренях алтеї; треки А4, А8 та Б5 – ДНК контрольних рослин; трек Б4 – ДНК *A. rhizogenes*

Висновки

Показано, що є можливим отримання трансгенних коренів алтеї з геном інтерферону $\alpha 2b$ людини при використанні векторних конструкцій, у яких ген *ifn- $\alpha 2b$* знаходиться під контролем 35S або MII промоторів. Отримати «бородаті» корені алтеї також можна, трансформуючи рослини диким штамом *A. rhizogenes* A4.

Найкращим типом експлантів виявилися листки, оскільки при використанні у якості

експлантів коренів та сім'ядоль «бородаті» корені отримати не вдалося.

Дослідження вмісту фруктанів показало, що генетична трансформація призводила до достовірного збільшення накопичення фруктанів у порівнянні з вмістом цих сполук у коренях контрольних нетрансформованих рослин.

Література

1. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. – К.: Логос, 2005. – С. 3–6.
2. Лікарські рослини: Енциклопедичний довідник / Відп. Ред.. А.М. Гродзинський. – К.: Голов. ред. УРЕ – 1989. – С. 37.
3. Ionkova I., Hu Z., Alfermann A. Polysaccharide production by hairy root cultures of some higher medicinal plants // *Planta Med* 59. – 1993. – P. 658–659.
4. Pascal M., Drake W., Luisa M. M., Tim H. Szeto, J. K-C. Ma. Transformation of *Althaea officinalis* L. by *Agrobacterium rhizogenes* for the production of transgenic roots expressing the anti-HIV microbicide cyanovirin-N [Електронний ресурс] // *Transgenic Research*. – 2013. – 22. – Режим доступу: <http://link.springer.com/journal/11248/22/6/page/1P.1225-1229>.
5. Zhou M-L., Xue-Mei ZhuX-M., Shao J-R., Tang Y.X., Wu Y.M. Production and metabolic engineering of bioactive substances in plant hairy root culture // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2011. – 90, N 4. – P. 1229 – 1239.
6. Roychowdhury D., Majumder A., Jha S. *Agrobacterium rhizogenes*-Mediated Transformation in Medicinal Plants: Prospects and Challenges // *Biotechnology for Medicinal Plants*. – 2013. – P. 29–68.
7. Livingston D.P., Hinch D.K., Heyer A.G. Fructan and its relationship to abiotic stress tolerance in plants // *Cell Molecular Life Science*. – 2009. – 66, N 13. – P. 2007–2023.
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. et al. High-level expression of human interferon alpha-2b in transgenic carrot (*Daucus carota* L.) plants // *Plant Cell Rep*. – 2011. – 30. – P. 407–415.
10. 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 Reports*. – 2011. – 30, N 3. – P. 407–415.
11. 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. – С. 56–63.
12. Рево А.Я. Практикум по органической химии (Качественные микрохимические реакции). – М.: Высшая школа, 1971. – 208 с.

DROBOT K.O., MATVIEIEVA N.A., KVASKO O.YU., SHACHOVSKY A.M.

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

CONSTRUCTION OF *ALTHAEA OFFICINALIS* L. «HAIRY» ROOTS WITH HUMAN INTERFERON ALPHA 2B GENE USING DIFFERENT TRANSFORMATION VECTORS

Aim. The obtaining of marshmallow *Althaea officinalis* L. “hairy” root culture with human interferon $\alpha 2b$ gene (*ifn- $\alpha 2b$*) was the aim of this work. **Methods.** We used *Agrobacterium rhizogenes* and different transformation vectors (*pCB 124* and *pCB 161*) with *ifn- $\alpha 2b$* gene under constitutive 35S CaMV promoter or MII rootspecific sugar beet promoter respectively. Also we used *A. rhizogenes* wild strain A4 for marshmallow genetic transformation. The genes were transferred into leafs, roots, stems and cotyledones explants via *A. rhizogenes*-mediated transformation. The presence of transgenes was determined by PCR analysis. Fructan content in “hairy” roots extracts was analyzed by Selivanoff-Probe. **Results.** Transformation frequency was up to 50 % if leaf explants was used for transformation (*pCB124* vector or

A. rhizogenes A4) and transformation frequency was up to 75 % for explants transformed using *pCB161* vector. PCR analysis proved the presence of *nptII*, *ifn- α 2b* and *rolB* genes in marshmallow roots obtained after *A. rhizogenes*-mediated transformation. The clones of transgenic roots differed in fructan synthesis. So the genetic transformation has led to increasing of the level of fructan content up to 41 mg/g dry weight. Fructan content was 13 mg/g dry weight in roots of control untransformed plants. **Conclusions.** Thus, we obtained the transgenic *A. officinalis* “hairy” roots using *A. rhizogenes*-mediated transformation. Extracts from “hairy” root culture were characterized by the higher level of fructan content in comparison with the fructan content in extracts from the roots of control plants.

Key words: genetic transformation, *Agrobacterium rhizogenes*, hairy root, *Althaea officinalis* L., fructans.

УДК 633.81:57.085.2

ЕГОРОВА Н.А., СТАВЦЕВА И.В., ЯКИМОВА О.В., КАМЕНЕК Л.И., КРИВОХАТКО А. Г.

Институт сельского хозяйства Крыма НААН Украины,

Украина, 95493, г. Симферополь, ул. Киевская, 150, e-mail: yegorova.na@mail.ru

РОЛЬ НЕКОТОРЫХ ФАКТОРОВ В ПРОЦЕССЕ ИНДУКЦИИ КАЛЛУСОГЕНЕЗА *IN VITRO* У ЭФИРОМАСЛИЧНЫХ РАСТЕНИЙ

Повышение эффективности растениеводства предполагает использование новых методических подходов, в том числе методов клеточной инженерии. Для разработки многих биотехнологий необходимы хорошо воспроизводимые методы получения каллусных культур, которые являются одним из основных объектов биотехнологических манипуляций. И хотя на настоящий момент получение каллусной ткани не представляет существенных сложностей у многих видов растений, тем не менее, у отдельных генотипов нередко возникают проблемы. При этом важно не только достижение высокой частоты индукции каллуса и его хорошей пролиферации, но и получение его из различных типов эксплантов. Происхождение каллусных тканей из разных органов растения влияет на их дальнейшую регенерационную способность, что нужно учитывать при разработке методов создания генетического разнообразия в селекции (индукции соматоклональной вариабельности, клеточной селекции и др.), а также на интенсивность синтеза биологически активных веществ, что важно для альтернативных биотехнологий получения вторичных метаболитов *in vitro* [1, 3]. Разработка таких биотехнологий является актуальной задачей для многих эфиромасличных растений, широко используемых в медицине, пищевой, парфюмерно-косметической промышленности и других отраслях. Для большинства изучаемых нами эфиромасличных растений в литературе имеются данные о получении каллусных культур, используемых в дальнейшем для

индукции морфогенеза, получения суспензий или в исследованиях вторичных метаболитов *in vitro* [5–11]. Их анализ показывает большое разнообразие предлагаемых разными авторами питательных сред, ограниченность используемых типов эксплантов, а также недостаточную изученность многих факторов, лимитирующих процесс каллусогенеза. Представленные в этих публикациях методики получения каллусных культур не всегда воспроизводимы при работе с новыми видами и сортами, что обусловлено влиянием многих экзогенных и эндогенных факторов на индукцию каллусообразования и, прежде всего, генетической обусловленностью этого процесса [3].

Целью нашей работы было изучение влияния некоторых факторов (генотипа и происхождения донорного растения, типа экспланта, сезона, состава питательной среды) на индукцию каллусогенеза у видов и сортов основных и перспективных эфиромасличных растений, возделываемых в Украине.

Материалы и методы

Материалом для исследований служили ткани и органы эфиромасличных растений: лаванды (*Lavandula angustifolia* Mill.) – сорта Степная, Синевя, Вдала, Ранняя, Крымчанка, Галлея, образцы №№ 58-1, 75-11, 61-1; шалфея (*Salvia sclarea* L.) – сорта С-785, С-1122, Тайган; кориандра (*Coriandrum sativum* L.) – сорта Янтарь, Ранний, Мисхор, Нектар, Медун; фенхеля (*Foeniculum vulgare* Mill.) – сорта Мэрцишор, Оксамит Крыма, Крымский; розы эфиромасличной (*Rosa spp.*) – сорта Радуга,