ЄЛІСЄЄВА Ю. В., МАТВЄЄВА Н. А.
Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України
Україна, 03680, м. Київ, вул. Заболотного, 148, e-mail: eliseevauv@ukr.net

ВИКОРИСТАННЯ *AGROBACTERIUM RHIZOGENES*-ОПОСЕРЕДКОВАНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ ДЛЯ ПІДВИЩЕННЯ ВМІСТУ ПОЛІФРУКТАНІВ У КОРЕНЯХ САЛАТУ *LACTUCA SATIVA* L.

Одним з основних методів генетичної трансформації рослин є *Agrobacterium*-опосередкована трансформація. *Agrobacterium rhizogenes* містить Ri-плазміду, яка викликає формування „бородатих" коренів після її інтеграції в геном рослини.

В процесі трансформування відбувається поранення рослин, контактування з бактеріями, культивування рослин в умовах *in vitro* і вбудовування чужорідної Т-ДНК до геному рослини. Тому генетичну трансформацію у вигляді комплексу цих чинників можна розглядати як стресовий фактор, який діє на рослину [1]. Одним з видів прояву стресової відповіді є синтез та накопичення рослиною запасних речовин і вторинних метаболітів [2]. До сполук, які накопичуються в рослинах також і при дії стресових чинників, належать фруктани [3-4]. Фруктани – полісахариди, побудовані із залишків D-фруктози. Фруктани є головними запасними формами вуглеводів багатьох рослин – топінамбура, жоржини, дивосилу, цикорію, кульбаби, лопуха. В медицині, бродильній і харчовій промисловості поліфруктани використовують як сировину для отримання фруктози [5]. Також фруктани використовують як лікувальний засіб при дисбактеріозах, діабеті, серцево-судинних захворюваннях [6].

Методом генетичної трансформації за допомогою *A. rhizogenes* були трансформовані такі рослини як *Aconitum heterophyllum*, *Atropa belladonna*, *Brugmansia suaveolens*, *Catharanthus roseus*, *Cichorium intybus*, *Datura stramonium*, *Nicotiana tabacum*, *Ophiorriza pumila*, *Rauvolfia micrantha*, *Salvia sclarea*, *Tylophora indica*, та інші [2], в тому числі і рослини салату *Lactuca sativa* L. [7-8].

Lactuca sativa L. – лікарська рослина, в клітинах якої накопичується цілий ряд цінних для фармакології біологічно активних речовин, в тому числі і фруктани. Рослини салату різних сортів містять фруктани у кількості від 7 до 15 % сухої маси [9]. Тому цікавим було дослідити зміну синтезу та накопичення цих сполук в трансгенних коренях салату, а також залежність накопичення фруктанів від швидкості приросту маси трансгенних рослин салату.

Матеріали і методи

Вихідний матеріал – асептичні рослини салату *L. sativa* сортів Одеський Кучерявець та Грін Корал – отримували шляхом поверхневої стерилізації насіння. Для цього насіння послідовно витримували в 70% етанолі протягом 30 сек., розчині „Білизни" (1:3) протягом 10 хв., промивали тричі стерильною дистильованою водою. Простерилізоване насіння пророщували на агаризованому середовищі Мурасіге і Скуга (MS) [10] при температурі 24˚С, 16-годинному світловому періоді.

Генетичну трансформацію салату здійснювали за допомогою *A. rhizogenes* (вектор *pCB161*, цільовий ген *ifn-α2b*, селективний ген *nptII*). Для трансформації використовували сім'ядольні листки 10-14-денних проростків. На них робили поперечні надрізи і кокультивували з бактеріями протягом 30 хв. Далі культивували на агаризованому середовищі 1/2 MS (середовище MS зі зменшеним вдвічі вмістом макроелементів) протягом двох діб при температурі 24˚С, 16-годинному світловому періоді. Після цього експланти переносили послідовно на середовище 1/2 MS з антибіотиком цефотаксимом (600 мг/л) на 7 діб, потім на середовище 1/2 MS з антибіотиками цефотаксимом (600 мг/л) та канаміцином (25 мг/л), пересаджуючи кожний тиждень на нове середовище з антибіотиками (з такими ж концентраціями) до появи „бородатих" коренів.

Геномну ДНК з трансгенних коренів виділяли ЦТАБ-методом [11]. Присутність перенесених генів визначали методом ПЛР з праймерами наведеними у таблиці 1.

Для визначення приросту маси кінцеві ділянки коренів (до 15 мм) відділяли та культивували на середовищі 1/2 MS при 24˚С, 16-годинному світловому періоді. Через 30 діб визначали приріст маси отриманих трансгенних коренів.

Вміст поліфруктанів визначали використовуючи метод Мак-Рері і Слаттері (1960) [12]

(спектрофотометр *Eppendorf BioPhotometer plus*, довжина хвилі 550 нм), який базується на здатності кетоцукрів давати забарвлення з резорцином у кислому середовищі. Концентрацію кетоцукрів визначали за калібрувальним графіком (калібрування здійснювали по фруктозі). Всі експерименти проводили в трьох повторностях.

Таблиця 1. Праймери, використані для підтвердження присутності генів *nptII* та *ifn-α2b*.

Ген	Праймер	Розмір ампліфікованого фрагмента, п. н.
nptII	5'-cctgaatgaactccaggacgaggca-3' 5'-gctctagatccagagtcccgctcagaag-3'	622
ifn-α2b	5'-ctcctgcttgaaggacag-3' 5'-ggagtcctccttcatcag-3'	264

Результати та обговорення

Ріст „бородатих" коренів на експлантах, отриманих після генетичної трансформації *A. rhizogenes*, починався через 10-14 діб. Корені мали характерні для „бородатих" коренів ознаки: гормононезалежний ріст, негативний геотропізм, сильне розгалуження, що зумовлено переносом в геном T_L фрагменту Т-ДНК pRi плазміди. В експерименті визначали частоту утворення трансгенних коренів на експлантах після трансформації, яка складала 85±1 %. ПЛР-аналіз отриманих ліній показав присутність як селективного гена *nptII*, так і цільового *ifn-α2b.*

Показники приросту маси трансгенних коренів через 30 діб відрізнялись в обох сортах.У коренях сорту Одеський Кучерявець приріст маси становив від 0,06±0,03 до 0,16±0,01 г, сорту Грін Корал – від 0,02±0,003 до 0,12±0,03 г на одну точку росту (один кореневий експлант довжиною до 15 мм) (рис. 1).

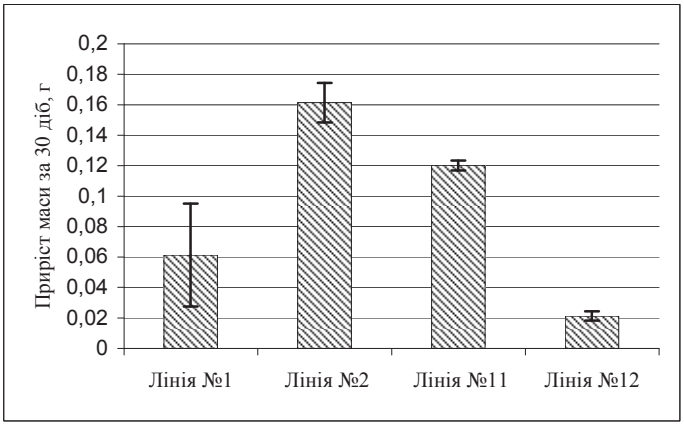

Рис. 1. Приріст маси трансгенних коренів салату *Lactuca sativa* L. сортів Одеський Кучерявець (лінія №1, лінія №2) та Грін Корал (лінія №11, лінія №12)

Отже, усі досліджувані лінії відрізнялися за швидкістю росту, а найбільший приріст маси відмічено для коренів лінії №2 сорту Одеський Кучерявець.

Через 30 діб культивування на агаризованому середовищі 1/2 MS вміст поліфруктанів у „бородатих" коренях салату варіював від 60,3±3,9 до 108,5±2,2 мг/г сухої маси для сорту Одеський Кучерявець та від 117,3±3,7 до 163,3±29,7 для сорту Грін Корал (рис. 2).

За вмістом поліфруктанів корені усіх досліджуваних ліній відрізнялися. Найбільший вміст поліфруктанів спостерігався у коренях лінії №11 сорту Грін Корал.

Визначали також загальне накопичення поліфруктанів за 30 діб (рис. 3).

За загальним накопиченням поліфруктанів лінії мали значні відмінності. Було виділено дві лінії трансгенних коренів (лінія №2 сорту Одеський Кучерявець – 0,137±0,002 мг та лінія №11 сорту Грін Корал – 0,15±0,01 мг), що характеризуються найбільшою загальною кількістю накопичених поліфруктанів за 30 діб культивування.

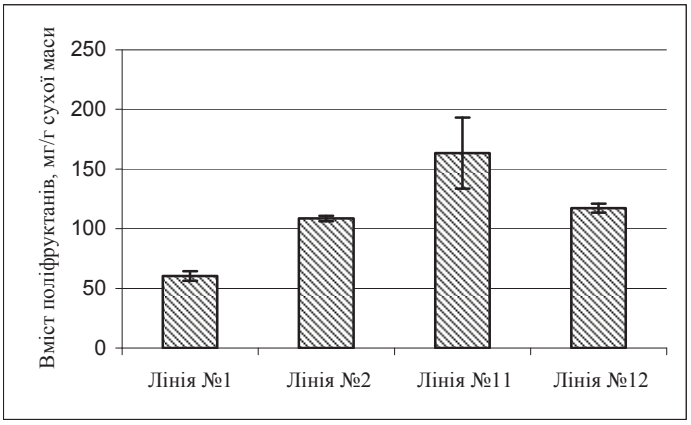

Рис. 2. Вміст поліфруктанів в трансгенних коренях салату *Lactuca sativa* L. сортів Одеський Кучерявець (лінія №1, лінія №2) та Грін Корал (лінія №11, лінія №12)

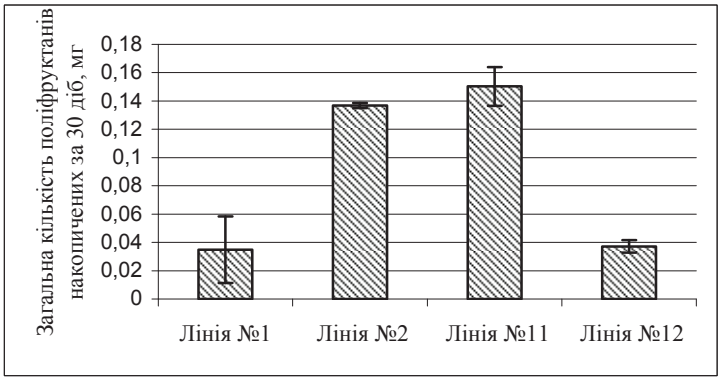

Рис. 3. Загальне накопичення поліфруктанів за 30 діб

Висновки

Отже, генетична трансформація за допомогою *A. rhizogenes* впливає на ріст „бородатих" коренів салату та накопичення в них поліфруктанів. Спостерігаються відмінності як у швидкості росту, так і у накопиченні поліфруктанів в різних лініях коренів салату двох сортів – Одеський Кучерявець та Грін Корал. Швидкість приросту маси у різних ліній відрізнялась у 2,7 та 6 разів відповідно для коренів сортів Одеський Кучерявець та Грін Корал. Загальний вміст поліфруктанів у лініях коренів салату Одеський Кучерявець та Грін Корал відрізнявся у 4 рази для коренів обох сортів. Такі відмінності, вірогідно, пов'язані з тим, що кожна лінія є окремою трансформаційною подією.

Література

1. Еникеев А.Г., Копытина Т.В., Семенова Л.А. и др. Агробактериальная трансформация как комплексный биотический стрессирующий фактор // Журнал стресс-физиологии и биохимии. – 2008. – Т. 4, №1. – С. 11–19.
2. Dipasree Roychowdhury, Anrini Majumder and Sumita Jha. *Agrobacterium rhizogenes*-Mediated Transformation in Medicinal Plants: Prospects and Challenges in: Biotechnology for Medicinal Plants, S. Chandra et. al. – Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, 2013. – P. 29-68.
3. De Roover J., Vandenbranden K., Van Laere A., Van den Ende W. Drought induces fructan synthesis and 1-SST (sucrose:sucrose fructosyltransferase) in roots and leaves of chicory seedlings (*Cichorium intybus* L.) // Planta. – 2000. – Vol. 210, №5. – P. 808–814.
4. Ebskamp M. J., van der Meer I. M., Spronk B. A., Weisbeek P. J., Smeekens S. C. Accumulation of fructose polymers in transgenic tobacco // Biotechnology (N.Y). – 1994. – Vol. 12, №3. – P. 272–275.
5. Петрушевский В. В., Бондарь Е. Г., Винокурова Е. В. Производство сахаристих веществ. – К.: Урожай, 1989. – 168 с.
6. Roberfroid M. B. Introducing inulin-type fructans // Br. J. Nutr. – 2005. – Vol. 93, №1. – P. 13–25.
7. Curtis I. S., He C., Power J. B., Mariotti D., de Laat A., Davey M. R. The effects of *Agrobacterium rhizogenes* rolAB genes in lettuce // Plant Science. – 1996. – Vol. 115, № 1. – P. 123–135.

8. Matveeva N. A., Shakhovskii A. M., Kuchuk N. V. Features of lettuce transgenic plants with *ifn-alpha2b* gene regenerated after *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation // Tsitol. Genet. – 2012. – Vol. 46, №3. – P. 27–32.
9. Muir J. G., Shepherd S. J., Rosella O., Rose R., Barrett J. S., Gibson P. R. Fructan and free fructose content of common Australian vegetables and fruit // J. Agric. Food Chem. – 2007. – Vol. 55 (16). – P. 6619-6627.
10. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture // Phys. Plant. – 1962. – Vol. 15, №.3. – P.473–497.
11. Генная инженерия растений. Лабораторное руководство: Пер. с англ. / Под ред. Дж. Дрейпера, Р. Скотта, Ф. Армитиджа, Р. Уолдена. – М.: Мир, 1991. – 242 с.
12. Ермаков А. И., Арасимович В. В., Ярош Н. П. и др. Методы биохимического исследования растений. – Л.: Агропромиздат, 1987. – 143 с.

YELISIEIEVA Y. V., MATVIEIEVA N. A.
Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of National Academy of Sciences of Ukraine
Ukraine, 03680, Kyiv, Zabolotnogo str., 148, e-mail: eliseevauv@ukr.net

AGROBACTERIUM RHIZOGENES-MEDIATED TRANSFORMATION FOR THE INCREASE OF POLYFRUCTANS CONTENT IN ROOTS OF _LACTUCA SATIVA_ L.

Aims. The studing of *Lactuca sativa* L. "hairy" roots was the aim of the work. ***Methods.*** The roots were obtained via cocultivation of leaves with *Agrobacterium rhizogenes* with pCB161 vector (selective *nptII* gene, target *ifn-α2b* gene). Selection of transgenic roots was performed on Murashige and Skoog medium with twice reduced content of macrosalts, 600 mg/l cefatoxime and 25 mg/l kanamycine. ***Results.*** Transformed "hairy" root lines differed in biomass increase from 0,02±0,003 to 0,16±0,01 g fresh weight during 30 days and polyfructans content from 60,3±3,9 to 163,3±29,7 mg/g dry weight. The maximum total fructan content was found in the one line of Odessky Kucheriavets cv "hairy" roots and one line of Green Coral "hairy" roots cultivated during 30 days (0,137±0,002 mg and 0,15±0,01 mg respectively). ***Conclusions*.** Differences of biomass increase and polyfructans content was observed in both lines of roots. Probably, such differences connected by that each line is separate transgenic event.
Key words: transformation, *Agrobacterium*, *Lactuca sativa*, fructans.

ЖУК І.В, ДМИТРІЄВ О.П.
Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України
Україна, 03680, м.Київ, вул. Заболотного, 148, e-mail: iren_zhuk@mail.ru

ІНДУКЦІЯ ЗАХИСНИХ РЕАКЦІЙ ПШЕНИЦІ, ІНФІКОВАНОЇ ЗБУДНИКОМ СЕПТОРІОЗУ

Ураження культурних рослин фітопатогенними грибами спричиняє значні втрати врожаю. Одним з найбільш поширених інфекційних хвороб пшениці є септоріоз. Збудник септоріозу гриб *Septoria tritici* вражає переважно листки і зменшує їх асиміляційну поверхню. Внаслідок цього порушується розвиток колоса, зменшується кількість зерен та формуються невиповнені зернівки. Втрати врожаю навіть при помірному розвитку хвороби становлять 10-15%, а при епіфітотійному, яке трапляється раз у 2-3 роки – 30-50% [2]. Захист посівів за допомогою фунгіцидів не завжди є ефективним і викликає забруднення навколишнього середовища отрутохімікатами, а нові сорти досить швидко втрачають свою хворобостійкість. Альтернативою застосуванню пестицидів є біологічні методи захисту рослин, серед яких у першу чергу слід назвати індукування стійкості [1, 5]. Індукована стійкість є тимчасовою фенотиповою стійкістю, що базується на експресії багатьох генів, і тому є неспецифічною.

Речовини фітопатогенів, що викликають таку стійкість, називають біотичними еліситорами. Останнім часом увага дослідників зосереджена на пошуку нових еліситорів та вивченні можливості їх поєднання з регуляторами сигнальних систем рослин. До числа останніх належить ендогенний оксид азоту (NO), який задіяний у реакції гіперчутливості. В наших попередніх дослідженнях показано, що обробка рослин донором NO – нітропрусидом натрію (НПН) – індукує неспецифічну стійкість у ярої пшениці в умовах польового досліду [2]. В подальшому