

tase, as well as at the carbohydrates' content under effect of the *Agrobacterium*-mediated transformation by strain LBA4404.

Key words: *Zea mays* L., transformation, sucrose synthase, invertase carbohydrates' content, endosperm, T2-plants.

МАТВЄЄВА Н.А.¹, КУДРЯВЕЦЬ Ю.Й.², ЛІХОВА О. О.², КВАСКО О.Ю.¹, ШАХОВСЬКИЙ А.М.¹

¹Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України

Україна, 03680, м. Київ, вул. академіка Заболотного 148, e-mail joyna56@gmail.com

²Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є.Кавецького НАН України

Україна, 03022, г. Київ, ул.Васильківська 45

ПОРІВНЯННЯ ПРОТИВІРУСНОЇ АКТИВНОСТІ ЕКСТРАКТІВ З ТРАНСГЕННИХ КОРЕНІВ ЦИКОРІЮ, САЛАТУ ТА АЛТЕЯ

Створення рослин, що синтезують сполуки медичного призначення, є одним з актуальних напрямків сучасної біотехнології. Перелік таких сполук нині є досить великим. Серед рослин, у які переносили цільові білки, можна відмітити насамперед тютюн, який є класичним модельним об'єктом біотехнологій, а також арабідопсис, ріпак, сою, кукурудзу, капусту, картоплю та інші види.

Салат *Lactuca sativa* L. також використовувався для створення трансгенних рослин, що синтезують цільові білки медичного призначення [1-2]. Використання цих рослин має певні переваги, оскільки розроблено ефективні методи *in vitro* культивування, калюсоутворення та регенерації цих рослин [3-4].

До останнього часу рослини цикорію та алтею не використовували для отримання трансгенних рослин з геном інтерферону. Разом з тим, рослини цих видів становлять великий інтерес, оскільки відносяться до лікарських та мають цілу низку природних корисних властивостей. Зокрема, екстракти з рослин цикорію мають гепатопротекторні властивості, нормалізують рівень цукру у крові (застосовують при лікуванні діабету), сприяють кращому засвоєнню кальцію (використовують для профілактики остеопорозу), мають кардіотонічні властивості, активізу-

ють ріст біфідобактерій (є пребіотиками та застосовують у комплексній терапії дисбактеріозів) [5-8]. Рослини алтею відомі перш за все як засіб, що використовується при бронхолегеневих захворюваннях завдяки наявності сполук із лікувальними властивостями [9,10]. Саме тому для нас становило інтерес до природних властивостей цих рослин додати ще і штучні, невластиві. Крім того, завдання порівняння активності екстрактів з рослин, які мають ген інтерферону, дає можливість вибору оптимального об'єкту для трансформування, який надасть можливість отримання цільового продукту з високою ефективністю. Тому наші дослідження були спрямовані на перенесення до рослин салату, алтею та цикорію гена інтерферона- $\alpha 2b$ людини, дослідження ефективності трансформації та порівняння біологічної активності екстрактів з отриманих трансгенних рослин. Ми вважали, що, виходячи з перспективи отримання цільового продукту, перевага може бути надана культурі трансгенних коренів [11], оскільки для їх вирощування не потрібне освітлення, підвищена температура, компоненти середовища високої вартості. Саме тому для генетичної трансформації використовували бактерії *Agrobacterium rhizogenes*.

Матеріали і методи

Трансгенні корені цикорію та салату було отримано шляхом *Agrobacterium rhizogenes*-опосередкованої трансформації за методикою [12] при використанні у якості вихідного матеріалу сім'ядоль 10-14 денних рослин. Для отримання „бородатих” коренів алтею використовували листки 30-40-денних рослин, культивованих у стерильних умовах на середовищі Мурасіге та Скуга [13] зі зменшеним вмістом макросо-

лей при 16-годинному освітленні та температурі +24°C. *A. rhizogenes* A4 з векторною конструкцією pCB161 [14], яка мала цільовий ген *ifn-a2b* та селективний ген *nptII*. Наявність останнього дозволила здійснювати селекцію трансгенних коренів на живильному середовищі, що містило 25 мг/л канаміцину. Наявність та транскрибування генів *ifn-a2b*, *nptII*, *rollB* визначали відповідно методами ПЛР та ЗТ-ПЛР на ампліфікаторі

Mastercycler Personal (Eppendorf) з використанням раніше застосованих праймерів [15]. Рослинну ДНК виділяли згідно з методиками [16, 17].

Для отримання екстрактів використовували фосфатний буфер рН 7,1-7,4. Рослинний матеріал зважували, розтирали на холоді з буфером, центрифугували 5 хвилин при 10000g (+4°C). Надсадкову рідину відбирали, перенесли в пробирку та центрифугували 25 хвилин

Результати та обговорення

Після проведеної агробактеральної трансформації було отримано культури «бородатих» коренів рослин усіх трьох видів, причому частота трансформації (відсоток експлантів, на яких у селективних умовах на безгормональному середовищі утворювалися корені) була високою та досягала 100%. Проведений ПЛР аналіз виявив присутність гена *rollB* в

при 16000g (+4°C). Вміст загального розчинного білку у екстрактах визначали за методом Бредфорда [18]. Противірусну активність рослинних екстрактів визначали згідно з методикою, описаною раніше у статті [19] за зниженням цитопатичної дії вірусу везикулярного стоматиту (штам Індіана) в клітинах нирки бика лінії MDBK. Порівнювали противірусну активність екстрактів трансгенних коренів салату, цикорію та алтея (по 3-5 ліній кожного виду рослин).

усіх тестованих зразках, що свідчило про перенесення Ri-плазмиди агробактерії. Також було показано, що всі аналізовані лінії коренів мали гени *ifn-α2b* та *nptII* (рис.1). За результатами ЗТ-ПЛР аналізу у 100% аналізованих ліній рослин усіх видів відбувався синтез мРНК.

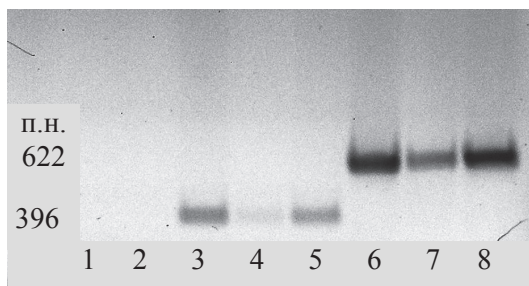


Рис.1. Електрофореграма результатів ПЛР аналізу присутності генів *ifn-α2b* (3-5) та *nptII* (6-8); 1, 2 – контрольні рослини

Визначення противірусної активності екстрактів з трансгенних коренів виявило значну варіабельність показників. Для однієї з ліній цикорію визначено відсутність інтерферноподібної активності (рис.2а, лінія 4), хоча наявність мРНК детектували.

Найвищу активність мали екстракти з трансгенних коренів алтея – більше 30000 МО/г маси та 16000 МО/мг загального розчинного білку (рис.2а, лінії 13 та 14).

Найменшу активність мали екстракти з коренів цикорію – до 2250 МО/г маси та 358 МО/мг загального розчинного білку (рис.2а, лінії 1–3). Крім того, було виявлено відмінності і у активності екстрактів різних ліній одного виду рослин. Наприклад, для алтею коливання активності становили від 446,48 до 16378,8 МО/мг

загального розчинного білку (рис.2б, лінії 12-14). Екстракти з коренів нетрансформованих рослин (контроль) противірусної активності не виявили (рис.2а, лінії 5, 11, 15).

Слід зазначити, що різні лінії трансформованих коренів усіх трьох видів рослин відрізнялися також і за швидкістю росту. Так, приріст маси коренів салату у ліній № 1 та 4 відрізнявся у три рази. Спостерігалася кореляція між швидкістю росту коренів та вмістом у зразках загального розчинного білку: чим більшим був приріст маси, тим меншим вміст білку. Можливо, цим частково можна пояснити і різницю у біологічній активності екстрактів, отриманих з різних ліній, адже, чим меншою є кількість синтезованого загального білка, тим меншою буде і кількість інтерферону.

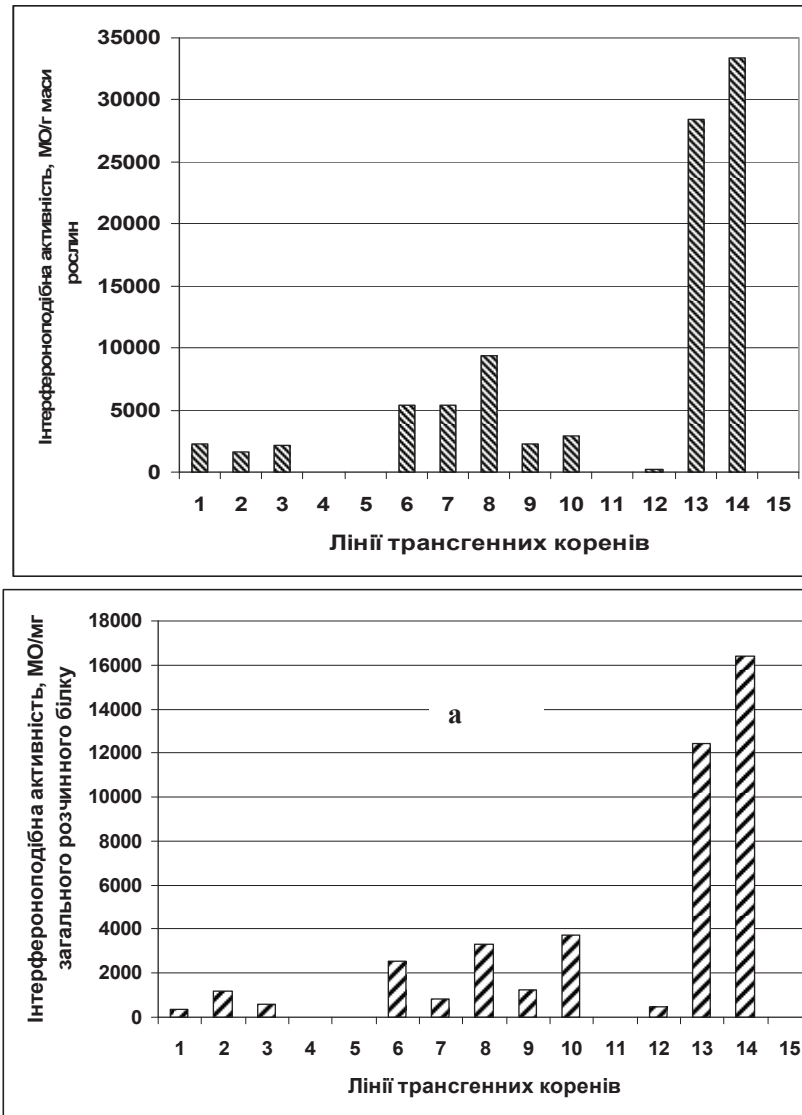


Рис.2. Інтерфероноподібна активність екстрактів із трансгенних коренів *C. intibus* (1-4), *L. sativa* (6-10) та *A. officinalis* (12-14); відповідні корені нетрансформованих рослин – лінії 5, 11 та 15

Висновки

Порівняно ефективність зниження цитопатичної дії вірусу везикулярного стоматиту (штам Індіана) в клітинах нирки бика лінії MDBK при додаванні екстрактів з трансгенних коренів салату (5 ліній), цикорію (4 лінії) та алтею (3 лінії). Виявлено значні відмінності у інтерфероноподібній активності екстрактів як різних ліній одного виду рослин, так і міжвидові

відмінності. Найвищу активність проти вірусу везикулярного стоматиту мали екстракти з трансгенних коренів алтею – до 16378,8 МО/мг загального розчинного білку. Таким чином, рослини цього виду можуть бути об'єктом генетичної трансформації векторами з геном інтерферону- $\alpha 2b$ людини для отримання високоефективного противірусного препарату.

Література

1. Kapusta J., Modelska A., Figlerowicz M. et al. A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus // FASEB J. – 1999. – Vol. 13. – P. 1796-1799.
2. Marcodes J., Hansen E. Transgenic lettuce seedlings carrying hepatitis B virus antigen HbsAg // Braz. J. Infect. Dis. – 2008. – Vol. 12. – P. 469-471.
3. Michelmore R.W., Marsh E., Seely S., Landry B. Transformation of lettuce (*Lactuca sativa*) mediated by *Agrobacterium tumefaciens* // Plant Cell. Rep. – 1987. – Vol. 6 – P. 439-442.

4. Ahmed M.B., Akhter M.S., Hossain M., et al. An Efficient *Agrobacterium-mediated* Genetic Transformation Method of Lettuce (*Lactuca sativa* L.) With an Aphidicidal Gene, *Pta* (*Pinellia ternata* Agglutinin) // Middle-East J. of Scientific Res. – 2007. – Vol. 2. – P. 155-160.
5. Ki C.G., Yim D., Lee S.Y. Biological activities of root of *Cichorium intybus* // Nat. Prod. Science. – 1999. – Vol. 5. – P. 155-158.
6. Gadgoli C., Mishra S.H. Antihepatotoxic activity of *Cichorium intybus* // Ethanopharmacology. – 1997. – Vol. 58. – P. 131-134.
7. Ahmad K.D., Gilani S.N., Akhta A.H., Khan L. 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. – P. 92-96.
8. Hughes R., Rowland I.R. Stimulation of apoptosis by two prebiotic Chicory fructans in the rat colon // Carcinogenesis. – 2001. – Vol. 22. – P. 43-47.
9. Alihah S. M., Akhtar Naveed, Akram M. et al. Pharmacological activity of *Althaea officinalis* L. // J. of Medicinal Plants Research. – 2011. – Vol. 5. – P. 5662-5666.
10. Gudej J. Flavonoids, phenolic acids and coumarins from the roots of *Althaea officinalis* // Planta Med. – 1991. – Vol. 57 – P. 284-285.
11. Mei-Liang Zhou, Xue-Mei Zhu, Ji-Rong Shao et al. *Production* and metabolic engineering of bioactive substances in plant hairy root culture // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2011. – Vol. 90, №4. – P. 1229-1239.
12. 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. – Т. 4. – С. 56-63.
13. 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.
14. 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. – Vol. 30. – P. 407-415.
15. Матвеева Н.А., Шаховський А.М., Кучук Н.В. Особенности трансгенных растений салата с геном интерферона- $\alpha 2b$, полученных путем *Agrobacterium rhizogenes*-опосредованной трансформации // Цитология та генетика. – 2012. – Т. 46, №3. – С. 27-32.
16. Дрейпер Дж., Скотт Р. Выделение нуклеиновых кислот из клеток растений // Генная инженерия растений. – М.: Мир, 1991. – С.241-245.
17. Logemann J., Schell J., Willmitzer L. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues // Analytical Biochem. – 1987. – Vol. 163. – P.16-20.
18. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – Vol. 7. – P. 248–254.
19. Матвеева Н.А., Кудрявец Ю.И., Лихова А.А. и др. Противовирусная активность экстрактов трансгенных растений цикория и салата с геном интерферона α -2b человека // Цитология и генетика. – 2012. – Т. 46, №5. – С. 28-35.

MATVIEIEVA N.A.¹, KUDRYAVETS YU.I.², LICHOVA O.O.², KVASKO O.YU¹, SHACHOVSKY A.M.¹

¹ *Institute of Cell Biology and Genetic Engineering NAS of Ukraine*

Ukraine, 03680, Kyiv 143, 148 Zabolotnogo str., e mail: joyna56@gmail.com

² *R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology NAS of Ukraine*

Ukraine, 03022, Kyiv, 45 Vasylykivska str.

COMPARISON OF ANTIVIRAL ACTIVITY OF EXTRACTS FROM TRANSGENIC CHICORY, LACTUCA AND MARSHMALLOW PLANTS

Aim. Comparison of antiviral activity effectiveness (suppression of vesicular stomatitis virus Indiana strain in bovine kidney cell line MDBK) by extracts from transgenic roots of lettuce, chicory and marshmallow with *ifn- $\alpha 2b$* gene was done. **Methods.** The transgenic plants were obtained by *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation. The presence of transgenes and their transcription were determined by PCR and RT-PCR respectively. Antiviral activity was investigated by suppression of vesicular stomatitis virus (Indiana strain) in bovine kidney cell line MDBK. **Results.** There were significant differences in antiviral activity of extracts from different root strains and also differences of antiviral activity of extracts from different species. The extracts from marshmallow transgenic roots had highest activity against vesicular stomatitis virus – up to 16378,8 MU/mg of total soluble protein. So, marshmallow plants are suitable object for *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation using vectors with human interferon $\alpha 2b$ gene. **Conclusions.** The extracts from transgenic lettuce, chicory and marshmallow have antiviral activity against

vesicular stomatitis virus. The *Althaea officinalis* is a most suitable plant species for obtaining transgenic plant with high antiviral activity.

Key words: *Agrobacterium rhizogenes*, transformation, *Lactuca sativa* L., *Althaea officinalis* L., *Cichorium intybus* L.

МЕЛЬНИЧУК М.Д., КОЛОМІЄЦЬ Ю.В., ЛІХАНОВ А.Ф., АВETИСЯН Ю.Ф.

*Національний університет біоресурсів і природокористування України
Україна, 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 13, e-mail: julyja@i.ua*

СПЕЦИФІЧНА ТРАНСФОРМАЦІЯ ТКАНИН РЕПРОДУКТИВНИХ ОРГАНІВ ТОМАТІВ (*LYCOPERSICON ESCULENTUM* MILL.) ПІД ВПЛИВОМ ПАТОГЕННИХ МІКРООРГАНІЗМІВ

Томати – одна з популярних і основних культур овочівництва. Плоди томатів піддаються бактеріальним хворобам, що суттєво знижує врожайність культури і якість продукції. Для визначення надійних ознак стійкості рослин до фітопатогенних чинників та отримання високопродуктивних і несприйнятливих до збудників хвороб сортів томатів регулярно проводяться цитологічні та гістологічні дослідження патогену,

які уможливають виявлення специфічних морфо-фізіологічних маркерних ознак конституціональної стійкості рослин, а також дозволяють визначити специфіку взаємодії організмів у системі рослина – патоген. У зв'язку з цим метою наших досліджень було вивчення трансформації тканин і клітин репродуктивних органів томатів (*Lycopersicon esculentum* Mill.) в умовах бактеріозів.

Матеріали і методи

Для досліджень специфіки трансформації тканин репродуктивних органів томатів нами були обрані сорти «Стожар», «Лагідний», «Настенька», «Санька», «Ефемер», «Новичок». Структурно-функціональну перебудову у насінневих зачатках і плодах вивчали методами світлової та люмінесцентної мікроскопії. Анатомо-гістологічні дослідження тканин проводили за стандартними протоколами [2] з використанням мікроскопа AxioScore A-1 Carl Zeiss. Анатомо-гістохімічні дослідження квіток і плодів проводили на постійних мікропрепаратах товщиною 10-12 мкм. Рослинний матеріал фіксували розчином Чемберлена [1]. Зразки зневоднювали

і просочували парафіном. Зрізи виготовляли на санному мікромомі. Тканини фарбували ацетофуксином, сафраніном – водним синім, гематоксилином за Гейденгайном, корифосфіном, флуоресцеїном (розведення 1 : 10000). Лінійні показники анатомічних структур вимірювали у спеціалізованій комп'ютерній програмі Axio Vision Rel. 4.7. Морфометричні показники тканин визначали у 10-ти кратній повторності, діаметр клітин, структурні елементи генеративних органів - у 30-ти кратній. Отриманні результати обробляли статистично з використанням програм Microsoft Office Excel та STATISTICA 6.

Результати та обговорення

З'ясовано, що в обраних нами сортах томатів навіть після застосування хімічних засобів боротьби з фітопатогенними мікроорганізмами, виявлялися симптоми бактеріальних захворювань. Рослини томатів, які уражені патогенами мають ознаки структурної перебудови мезофілу листків, мікроспорангіїв, плаценти та насінневих зачатків на тканинному і клітинному рівні. Первісною захисною реакцією рослин на шкодочинну дію фітопатогенних мікроорганізмів є процес опробковіння, посиленої кутинізації та суберінізації клітинних стінок епідермісу та мезофілу листків, паренхіми квіток і плодів. Бактеріальні інфекції томатів викликають порушення мікро-

спорогенезу, що призводить до зменшення загальної кількості фертильного пилку і орбікул, до складу яких входить спорополенін; викликають аберації насінневих зачатків за трьома типами.

Встановлено, що бактеріальний патогенез призводить до повного руйнування хлоропластів і ядер клітин. Під впливом екзометаболітів бактерій у клітинах мезокарпію утворюється в'язкий за консистенцією секрет полісахаридної природи (позитивна реакція ШИК), який викликає значні функціональні порушення протопластів, індукує створення додаткових клітинних перетинок, викликає хлорози з подальшою некротизацією тканин (рис. 1, а,б).