

навпаки, завдяки цьому земля не тільки не випадає з сільськогосподарського призначення, а й буде придатна до вирощування зернових через певний проміжок часу. Також беремо до уваги що, чим більше врожай тим більш активно проходить процес фотосинтезу, завдяки якому не тільки формується врожай, а й значно збагачується атмосфера киснем.

В інституті зернових культур НААН України ведеться селекція цукрового сорго для забезпечення всіх напрямків виробництва, та система підбору сортового складу в залежності від потреб виробника та його технічної оснастки. Також йде постійне удосконалення та наукове обґрунтування технологій вирощування в різних умовах для забезпечення максимального економічного ефекту.

УДК 604.6:582.661.21

ОТРИМАННЯ «БОРОДАТИХ КОРЕНІВ» У СОРТІВ *AMARANTHUS CAUDATUS* L. ТА ГІБРИДІВ *AMARANTHUS CAUDATUS* L. X *AMARANTHUS PANICULATUS* L. ПІСЛЯ ТРАНСФОРМАЦІЇ *AGROBACTERIUM RHIZOGENES*

М. В. Кучук, доктор біологічних наук, член-кореспондент

О. М. Ярошко, аспірант

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України

*Після трансформації гіпокотилів сортів видів *Amaranthus caudatus* L.: Helios, Karmin, Kremoyi rannii, та гібридів: *Amaranthus caudatus* x *Amaranthus paniculatus* L.- сорт Sterkh, *Amaranthus caudatus* x Sterkh – сорт Zhaivir диким штамом *Agrobacterium rhizogenes* A4 була отримана культура «бородатого коріння». Ветювання і транскрипція генів в корінні були підтверджені результатами ПЛР-аналізу*

*Ключові слова: *Amaranthus caudatus* L., *Amaranthus paniculatus* L., *Agrobacterium rhizogenes*, трансформація, трансгенне коріння, «бородате коріння»*

Рослини роду амарант використовуються в харчовій промисловості (хлібо-булочні вироби), медицині (лікування запальних процесів бактеріальної етіології, раку), косметології (засоби для омолодження шкіри), сільському господарстві (листя, стебла і зерно як корм для тварин). Амарант є джерелом біологічно активних речовин. Найбільш цінними з яких є сквален і амарантін. Сквален має протипухлинні і ранозагоюючі властивості, а амарантін – антиоксидантні.

Отримання біологічно цінних речовин можливо за допомогою біотехнологічних методів. На основі трансгенних рослин можливо створювати істивні вакцини – рослини, які синтезують біологічно активні речовини з заданим біохімічним складом.

Рослини, які синтезують не притаманні їм речовини, можливо отримувати за допомогою генетичної трансформації з використанням бактерії *Agrobacterium*. Представники цього роду є фітопатогенами. Завдяки Ti- і Ri - плазмідам ці бактерії можуть викликати у рослин утворення «бородатого коріння» (*A. rhizogenes*) або «корончатих галів» (*A. tumefaciens*). Після встроювання і експресування бактеріальних генів, змінюється гормональний баланс, що призводить до виникнення у інфікованих рослин специфічного фенотипу.

Метою даної роботи було отримати трансгенне коріння амаранту після генетичної трансформації диким штамом *A. rhizogenes* A4.

Об'єктами досліджень були сорти видів *Amaranthus caudatus* L.: *Helios*, *Karmin*, *Kremoyi rannii*, та гібридів: *A. caudatus* x *A. paniculatus* L.- сорт *Sterkh*, *A. caudatus* x *Sterkh* – сорт *Zhaivir*, насіння яких було отримано в ботанічного саду М.М. Гришка НАН України.

Для введення в культуру *in vitro*, насіння поверхнево стерилізували в 1% розчині комерційного препарату «Білізна» протягом 12 хв., тричі промивали дистильованою водою, після чого насіння занурювали у 3% розчин перекису водню на 12 хв. Насіння пророщували в стерильних умовах на живильному агаризованому середовищі Мурасіге і Скуга (MS_{30}) з 30 г/л сахарози за рН 5,7-5,9. Проростки вирощували за температури + 22-+25 °С, з освітленням 3000 – 4500 лк за 16-годинного світлового фотоперіоду.

Для трансформації використовували гіпокотилі 14-денних проростків таких сортів виду *A. caudatus* L.: *Helios*, *Karmin*, *Kremoyi rannii*, та гібридів: *A. caudatus* x *A. paniculatus* L. сорт *Sterkh*, *A. caudatus* x *Sterkh* – сорт *Zhaivir*.

Трансформацію проводили шляхом кокультування гіпокотилів з агропіновим штамом *A. rhizogenes* A₄. Трансформацію амарантів проводили згідно модифікації методики, запропонованої Jofre-Garfias і співавторами (Jofre-Garfias et al., 1997). Спочатку вирощували *A. rhizogenes* A₄ протягом 24-х годин (2 рази пересів на рідке середовище LB). Після цього *A. rhizogenes* відцентрували протягом 15 хв. і ресуспендували в середовищі S MS_{15} з додаванням 0,2 мМ ацетосирінгону. Наступним етапом було культивування бактеріальної суспензії при перемішуванні на шейкері протягом 1,5 год. Після цього бактерій інкубували з гіпокотиліями 14-денних проростків, протягом 2 год. Після 2 год. інкубування, експланти переносили на тверде поживне серед-

овище SMS₁₅ без антибіотиків. Кокультивування на цьому середовищі тривало 1 добу, після чого гіпокотилі переносили на середовище SMS₁₅ з додаванням 500 мг/л цефотаксима («Дарниця», Україна). Кожні 2 тижні гіпокотилі переносили на середовище SMS₁₅ зі зменшеним вмістом цефотаксима (400 мг/л, 300 мг/л, 200 мг/л). При останньому пересаджуванні використовували середовище SMS₁₅ без додавання цефотаксима. В якості контролю використовували гіпокотилі 14-денних проростків тих же самих сортів, які без попереднього кокультивували з *A. rhizogenes* A₄ розкладали спочатку на середовище SMS₁₅, а потім на SMS₁₅ з 500 мг/л цефотаксима. Наступні субкультивування для контрольних зразків не здійснювали, так як приблизно через 15 днів гіпокотилі відмирили.

Геномну ДНК виділяли ЦТАБ-методом. Для ПЛР аналізу використовували реакційну суміш такого складу: 2 мкл однократного ПЛР-буфера з сульфатом аммонія (Dream Taq Green Buf.), 2 мкл праймерів, 2 мкл дезоксинуклеотидтрифосфатів (dNTP), 0,15 мкл Dream Taq-полімерази, 2 мкл ДНК (2030 нг/мкл ДНК), 11,85 мкл H₂O. Об'єм реакційної суміші 20 мкл. Для виявлення гену *rolB*, використовували відповідні праймери, 5'-ctcactccagcatggagcca-3' і 5'-attgtgtggtgccgaagcta-3' (592 п.н.). Умови ампліфікування: первинна денатурація – 94 °С 3 хв, 30 циклів (94 °С,

Для підтвердження наявності в трансформованих коренях T_L-фрагменту Т-ДНК плазмід рRi проводили ампліфікацію сумарної ДНК з праймерами, специфічними гену *rolB*. При аналізі з 8 протестованих зразків сортів видів *A. caudatus* L.: *Helios*, *Karmin*, *Kremovyi rannii*, та гібридів:

30 с – 60 °С, 30 с – 72 °С, для *rolB* тривалість синтезу 40 с, 72 °С), завершальна полімеризація – 72 °С, 5 хв.

Ріст «бородатого» коріння амарантів на експлантат гіпокотилів спостерігали через 2025 днів після трансформації *A. rhizogenes* на середовищі SMS₁₅ з цефотаксимом. Було отримано 10 ліній коріння. При перенесенні частин коренів (~10 мм) на селективне середовище без регуляторів росту спостерігали їх інтенсивний ріст. Коріння зовнішньо мали характерний для «бородатого» коріння (Ri- коріння) вигляд (рис. 1), що обумовлене переносом T_L-фрагменту Т-ДНК плазмід рRi агропінового типу з генами *rolB*.



Рис. 1. Утворення «бородатого коріння», після трансформації гіпокотилів *A. caudatus* сорт *Helios* за допомогою *A. rhizogenes* A₄

A. caudatus x *A. paniculatus* L.- сорт *Sterkh*, *A. caudatus* x *Sterkh* – сорт *Zhaivir*, було виявлено присутність фрагменту ДНК розміром 592 п.н., для 3 зразків (1 зразок сорту *Helios* №3 і 2 зразка сорту *Karmin* - №6 і 8), що підтверджує наявність гену *rolB* в трансформованому корінні (рис. 2).

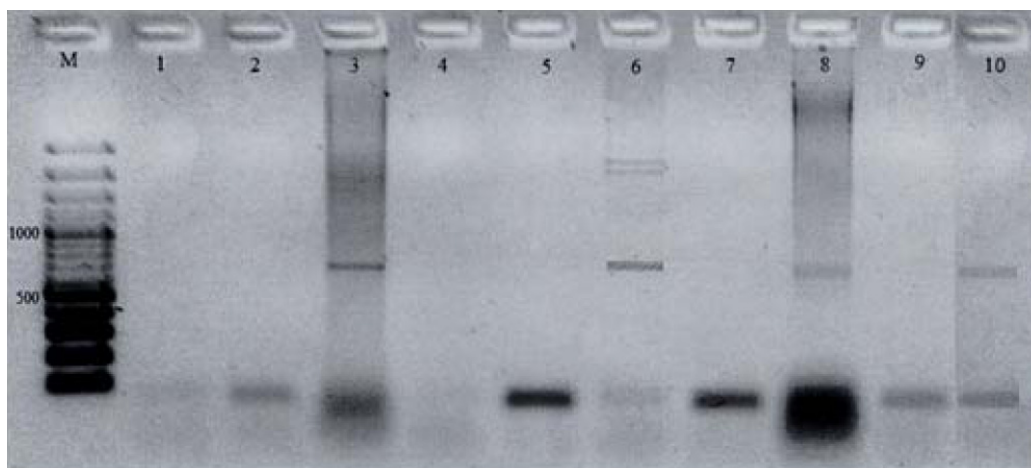


Рис.2. ПЛР-аналіз рослин амарантів з використанням праймерів к гену *rolB*: М-ДНК-маркер (O'GeneRuler™1kb DNA Ladder, «Fermentas»), 1-8 сумарна ДНК рослин, трансформованих *A. rhizogenes* A₄ (1 – *Sterkh*; 2, 3, 4 – *Helios*; 5- *Kremovyi rannii*; 6, 8, 9 – *Karmin*; 7 – *Zhaivir*), 9 – негативний контроль, ДНК нетрансформованої рослини, 10 – позитивний контроль, плазмідна ДНК *A. rhizogenes* A₄

Отже, після трансформації експлантів гіпокотилів сортів видів *Amaranthus caudatus* L.: *Helios*, *Karmin*, *Kremovyi rannii*, та гібридів: *A. caudatus* x *A. paniculatus* L.- сорт *Sterkh*, *A.*

caudatus x *Sterkh* – сорт *Zhaivir* амарантів за допомогою *A. rhizogenes* A₄, було отримане трансгенне коріння сортів *Helios* і *Karmin*. Проаналізовані зразки мали ген *rolB* *A. rhizogenes*.