

УДК 576.5/58:615.4

ИЗУЧЕНИЕ КОЛЛЕКЦИОННЫХ ШТАММОВ ПОЧВЕННЫХ АГРОБАКТЕРИЙ, С ЦЕЛЬЮ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ ДЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ КОРНЕЙ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

*А.А. Лукин, аспирант 2 года кафедры биотехнологии,
тел. 8(9609)03-62-81, stas-asp@mail.ru;*

*О.О. Бабич, доктор технических наук, доцент,
тел. 8(9609)03-62-81, olich.43@mail.ru;*

*А.В. Заушицна, доктор биологических наук, профессор,
тел. 8(9609)03-62-81, alexaz58@yandex.ru
ФГБОУ ВО Кемеровский государственный университет*

Ключевые слова: лекарственные растения, агробактерии, культуры *in vitro*, «бородатые корни».

Дикие штаммы Agrobacterium rhizogenes – 15834 и A4 были использованы для получения эксплантов, образующих «бородатые корни» в растениях моркови, огурца и люпина.

Работа выполнена в рамках исполнения Соглашения № 075-02-2018-223 от 26.11.2018 года (уникальный идентификатор соглашения RFMEFI57718X0285) по теме: «Получение биологически активных веществ лекарственных растений эндемиков Сибири с использованием культур клеток и органов высших растений».

Введение. В последние годы активизированы исследования лекарственных растений в плане поиска видов, в органах которых содержатся жизненно важные биологически активные вещества для лечения таких заболеваний, как сердечно-сосудистые, онкологические, диабет и другие [3].

Более широкое практическое применение в настоящее время получило важное направление современной биотехнологии – клеточная инженерия. Она основана на тотипотенстности клеток, на способности регенерировать целое растение, синтезировать важнейшие соединения вторичного метаболизма [1].

В основе создания эффективных и безопасных лекарственных средств лежат приоритетные направления научно-технического прогресса, основанные на новых знаниях в области наук о жизни и технологий живых систем. Всё многообразие методов биотехнологии направлено на использование биообъектов в качестве средств производства, прежде всего,

эффективных и безопасных лекарств, среди которых доля фитопрепаратов и биологически активных субстанций из растений составляет 60–65% [2].

К сожалению, доля новых лекарственных веществ с высокой физиологической активностью и новой формой продукта, полученных из растительного сырья к началу 21 века, не превысила 24%. Данный процесс сдерживается недостатком технологий эффективного производства биологически активных веществ из растительного сырья, слабой развитостью культивируемых ботанических лекарственных видов растений в хозяйствах разных форм собственности и даже в ботанических садах, дефицитом подготовленных кадров в этом направлении [3,6].

Более 40 лет эту проблему пытались решить методами размножения культуры клеток и тканей в условиях *in vitro*, отбора наиболее продуктивных клеточных линий растений, дифференцированных тканей. В большинстве случаев не удалось накопить и выделить из растительного сырья достаточного количества важных метаболитов. Одним из поворотных и обнадеживающих событий явилось открытие и использование метода генной трансформации растений с использованием почвенной агробактерии *Agrobacterium rhizogenes* [7, 9].

Агробактериальная трансформация корней растений позволила получать вторичные метаболиты, важные для медицинского использования: алкалоиды, кумарины, фенольные соединения и ряд других [8, 9]. Исследования растений в этом направлении особенно актуальны.

Культура «*hairy roots*» может быть использована как сырье для химического синтеза важных продуктов фармацевтики. Существует огромный потенциал роста данного сегмента рынка. В России культуре «*hairy roots*» до сих пор не уделяется должного внимания. Лишь несколько научных групп ведут фундаментальные и прикладные исследования, используя, в том числе, в качестве модельных объектов бородатые корни. При этом успешно реализованные в этой области коммерческие проекты в России и вовсе отсутствуют [4,5].

Данная работа посвящена изучению коллекционных штаммов почвенных агробактерий, таких как *Agrobacterium rhizogenes* 15834 и А4, с целью их применения для генетической трансформации корней лекарственных растений.

Материалы и методы исследований. Для трансформации использовали дикие немодифицированные штаммы *Agrobacterium rhizogenes* 15834 и А4 (рисунок 5.1). Штаммы выращивали на агаризованной питательной среде YEB (5 г/л пептона, 1 г/л дрожжевого экстракта, 5 г/л сахарозы, 0,5 г/л MgCl₂). Перед трансформацией суспензионную культуру агробактерии

наращивали в течение 24 ч в темноте, при +23°C на качалке с круговым вращением (амплитуда 5–10 см, скорость вращения 90 об./мин.).

Для исследования вирулентности штаммов *Agrobacterium rhizogenes* использовали следующие виды растений: корнеплоды моркови, проростки гороха, люпина, огурца. Согласно принятой методике инокулировали семядольные листья и эпикотиль. У моркови для исследований брали корнеплод, после тщательной стерилизации резали диски толщиной до 5 мм и раскладывали в чашки Петри. Аккуратно стерильным скальпелем делали неглубокие насечки на морковных дисках и шприцем вводили агробактериальную суспензию штамма *Agrobacterium rhizogenes A4*.

Результаты исследований и их обсуждение. Важнейшим фактором, оказывающим влияние на образование «бородатых корней», является выбор штамма агробактерий. Следует отметить, что использование для трансформации корней модифицированных объектов, несущих чужеродные генетические конструкции, связано с рядом проблем, если полученную культуру планируется применять на практике. Например, если целью эксперимента является создание *in vitro* культуры корней лекарственных растений, которые далее могут быть использованы в качестве альтернативного сырья в медицинской и пищевой промышленности, то есть необходимость вовлекать исключительно дикие штаммы агробактерий.

В работе использовали два диких штамма *A. rhizogenes* – 15834 и A4 и такие растительные объекты, как морковь, огурец и люпин.

Первые признаки инфицирования растений агробактериями наблюдали на 7-е сутки культивирования. Доля эксплантов, образующих «бородатые корни», относительно их общего количества, на 14-е сутки культивирования, представлена на рисунке 1.

Из рисунка 1 следует, что максимальной вирулентностью характеризуется штамм *A. rhizogenes A4* – частота ризогенеза варьируется от 64,7% до 75,8%. Для штамма *A. rhizogenes 15834* данная величина значительно ниже – от 31,0% до 33,4%.

Через 14 суток культивирования при использовании штамма *A. rhizogenes A4* выявили появление опухолей вблизи перидола корнеплода моркови, на 21 сутки – активный рост (рисунок 2).

Инокуляция органов огурца и люпина этим же штаммом *A. rhizogenes A4* также показали положительную реакцию. Вместо опухолевого образования через 2 недели после закладки эксперимента произошло активное появление отдельных корней из мест введения инокулята (рисунок 3). В отношении люпина в период второй недели отмечено активное корнеобразование, а к четвертой неделе уже актив-

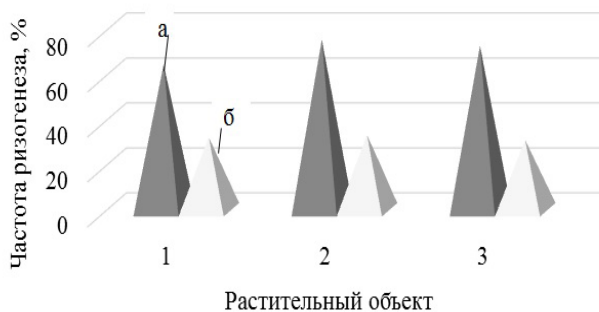
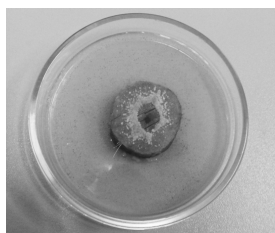
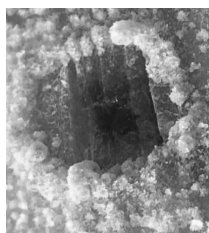


Рисунок 1 – Частота ризогенеза на эксплантах моркови (1), огурца (2) и люпина (3) на 14-е сутки при генетической трансформации различными штаммами *A. rhizogenes*: а – А4, б – 15834

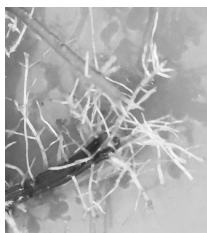


а

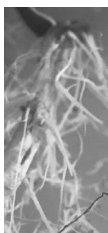


б

Рисунок 2 – Опухолевое образование на корнеплоде моркови при инфицировании штаммом *A. rhizogenes* А4: а) внешний вид на 14 сутки; б) опухолеобразование на 21 сутки



а



б



в



Рисунок 3 – Бородатые корни огурца (а, б) и люпина (в): а) стадия «перпендикулярных» корней и начала ветвления; б) корневая система на 6 неделе роста

ное ветвление корней и образование корней разных порядков в виде густого пушистого налета (рисунок 3).

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о чистоте штамма *A. rhizogenes* A4 и способности к генетической трансформации растений и дает основание использовать данный штамм агробактерий для целевого и прикладного исследования лекарственных растений.

Библиографический список:

1. Биотехнология растений / Пер. с англ. к.б.н. В.И. Негрука. Предисловие Чл.корр. АН СССР, Р.Г. Бутенко, М.: ВО Агропромиздат, 1987. – 302 с.
2. Объем рынка фитопрепаратов за пять лет вырастет до 35,4 млрд. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://vademec.ru/news/2015/10/30/obem_rynka_fitopreparatov_zh_pyat_let_vyrastet_do_35_4_mlrld/.
3. Прокофьева, М.Ю. Использование искусственных семян в технологии культивирования *in vitro* корней лекарственных растений / М.Ю. Прокофьева // Автореф. дисс... канд. биол. наук, М. – 2012. – 20 с.
4. Abdin, M.Z. Artemisinin, a novel antimalarial drug: biochemical and molecular approaches for enhanced production // M.Z. Abdin, M. Israr, R.U. Rehman et al / *Planta Med.* – 2003. – V. 69. – P. 289-299.
5. Adamo, V. Paclitaxel and cisplatin in patients with recurrent and metastatic head and neck squamous cell carcinoma // V. Adamo, G. Ferraro, S. Pergolizzi et al. / *Oral Oncology.* – 2004. – V. 40: P. 525–531.
6. Balunas, M.J. Drug discovery from medicinal plants // M.J. Balunas, A.D. Kinghorn / *Life Sci.* – 2005. – V. 78. – P. 431-441.
7. Bulgakov, V.P. Application of Agrobacterium rol genes in plant biotechnology: a natural phenomenon of secondary metabolism regulation. In: Alvarez M. // V.P. Bulgakov, Y.N. Shkyrl, G.N. et al / *Genetic Transformation. InTech, Rijeka.* – 2011. – P. 261-271.
8. Gafni, Y. Coniferyl alcohol, a lignin precursor, stimulates *Rhizobium rhizogenes* A4 virulence // Y. Gafni, Y. Levy / *Curr. Microbiol.* – 2005. – V. 50. – P. 262-265.
9. Pavlova, O.A. rol-Genes of *Agrobacterium rhizogenes* // O.A. Pavlova, T.V. Matveyeva, L.A. Lutova / *Russ. J. Genet. Appl. Res.* – 2014. – V.4. – P.137-145.

STUDY OF COLLECTIBLE STRAINS OF SOIL AGRO-BACTERIA AND THEIR APPLICATION FOR GENETIC TRANSFORMATION OF MEDICINAL PLANT ROOTS

Lukin A.A., Babich O.O., Zaushintsena A.V.

Key words: medicinal plants, agrobacteria, *in vitro* cultures, “hairy roots”.

Wild strains of Agrobacterium rhizogenes - 15834 and A4 were used to obtain “hairy roots” in carrot, cucumber and lupine plants.