

УДК 631.811.9875.117.2.577.2.08

РЕГУЛЯТОР РОСТУ ЧАРКОР ЯК ІНДУКТОР НАКОПИЧЕННЯ БІОМАСИ У КУЛЬТУРАХ «БОРОДАТИХ КОРЕНІВ» ЦИКОРІЮ — ПРОДУЦЕНТІВ ПОЛІФРУКТАНІВ

В. А. Циганкова¹
С. П. Пономаренко²
А. П. Галкін³
А. І. Ємець³

¹Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України, Київ
²Міжвідомчий науково-технологічний центр «Агробіотех»
НАН і МОН України, Київ
³Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України, Київ

E-mail: vTsygankova@ukr.net

Отримано 24.04.2012

У культурах чотирьох ліній коренів цикорію (*Cichorium intybus* L.), трансформованих *Agrobacterium rhizogenes*, досягнуто значного підвищення рівня синтезу поліфруктанів на живильних середовищах із регулятором росту Чаркор. Показано, що його присутність в агаризованому та рідкому середовищах 1/2МС збільшувала приріст маси коренів (за сухою масою) у 39–54 рази відносно контролю залежно від концентрації регулятора (від 2,5 до 10 мкл/л середовища). Вплив регулятора росту Чаркор на приріст маси коренів був подібним до дії ауксинів, зокрема індолілмасляної кислоти. Додавання в ці середовища регулятора росту Чаркор призводило до зменшення питомого вмісту поліфруктанів (мг/г сухої маси) у 2–8 разів, що пов'язано зі швидшим ростом коренів у таких умовах. Водночас за культивування культури коренів у присутності регулятора росту Чаркор загальний вміст поліфруктанів був значно вищим, ніж у контролі, і становив 48–30 мг/г загальної сухої маси коренів, що виростили за 30 діб.

Методом ДОТ-блот-гібридизації встановлено суттєву різницю в популяціях цитоплазматичних мРНК і si/miРНК між контрольними та дослідними рослинами. Це свідчить про часткову зміну в експресії генів під впливом регулятора.

Ключові слова: регулятор росту рослин Чаркор, «бородаті корені» цикорію, поліфруктани, ДОТ-блот-гібридизація.

Упродовж останніх десятиліть досягнуто значного прогресу в розвитку біотехнологічних методів та прийомів культивування *in vitro* трансгенних рослин — суперпродуцентів амінокислот, пептидів, протеїнів-ензимів, вітамінів, а також вторинних метаболітів (алкалоїдів, глікозидів, стероїдів, фенольних сполук, терпеноїдів, танінів, полісахаридів, пігментів, ефірних олій тощо), які широко використовують у медичній, фармацевтичній, парфумерній та харчовій промисловості. За допомогою генетичної інженерії отримано також клітини бактерій, дріжджів і тварин — «біофабрики» для масштабного виробництва біологічно активних протеїнів (інсуліну, соматотропіну, інтерферону та ін.) і використання їх як лікарських засобів [1–3].

Основним завданням для успішного розвитку цієї галузі біотехнології є оптимізація умов культивування ізольованих клітин і тканин трансгенних рослин *in vitro* з ме-

тою підвищення в них синтезу біологічно активних сполук. Відомо, що клітини трансформованих рослин здатні продукувати вторинні метаболіти в умовах *in vitro* і за відсутності спеціальних регуляторів росту. Разом з тим суспензійні та калюсні культури клітин можуть синтезувати вторинні метаболіти в меншій кількості, ніж цілі рослини [1–3].

В останні роки зусилля вчених спрямовано на модифікацію існуючих та розробку нових живильних середовищ з використанням ефективних замінників природних фітогормонів — фізіологічно активних сполук хімічного походження. Підтвердженням перспективності такої стратегії є всесвітній досвід застосування в культурах клітин і тканин рослин *in vitro* як традиційних (відомих вже понад півстоліття) синтетичних замінників фітогормонів з ауксиною та цитокініноюю активністю: 2,4-Д, НОК, ХФОК, кінетину, БА, БАП [4–7], так і нових

хімічних сполук, що їх вже синтезують і успішно використовують у біотехнологічній практиці. Численні експериментальні дані [8–12] свідчать про їхню здатність як індукувати процеси дедиференціації клітин з високоспеціалізованих клітин (калюсогенез), так і, навпаки, стимулювати морфогенетичні процеси.

До найширше застосовуваних у сільськогосподарстві України препаратів належать синтезовані в Інституті біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України і в Інституті органічної хімії регулятори росту хімічного походження [13]. В експериментах, проведених нами раніше в культурах ізольованих клітин рослин тютюну (*Nicotiana tabacum* L.), картоплі (*Solanum tuberosum* L.) і томатів двох видів (*Lycopersicon esculentum* L. та *L. peruvianum*), було показано, що синтетичні регулятори Івін (N-оксид 2,6-диметилпіридину), Триамелон (йодид-трис-(2,2-триметиламонійметил фосфат), регулятор Д-107 (1-ацетиламіно-1-ацетилтіо-2-оксо-2-фенілетан) і регулятор №2622 (похідний тетрагідротіофендіоксиду) можуть бути ефективними заміниками природних фітогормонів ауксинів і цитокінінів [14]. У подальших дослідженнях було відкрито феномен опосередкованої дії синтетичних регуляторів росту через підвищення ендогенного пулу фітогормонів (ауксинів та цитокінінів) [15]. Пізніше вченими різних країн проведено аналогічні експерименти, які стосувалися можливості використання в культурах ізольованих клітин і тканин різних видів рослин (*Arachis hypogaeae* L., *Pelargonium hortorum* Bailey, *Humulus lupulus* L., *Phaseolus radiatus* L.) нових індукторів морфогенетичних процесів синтетичних заміників цитокініну TDS (тидіазурон, похідний тіосечовини) [8–11] і ауксину BSSA (3-[бензо]b-селенієніл-оцтова кислота) [12] й отримано дані, які свідчать про значне підвищення рівня ендогенних фітогормонів ауксинів та цитокінінів у клітинах культивованих на цих середовищах рослин.

До вітчизняних регуляторів росту рослин природного походження належать створені в Інституті біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України разом із Державним підприємством «Міжвідомчий науково-технологічний центр «Агробіотех» НАН і МОН України нові регулятори росту (Потейтин, Зеастимулін, Чаркор, Біолан, Біоген, Радостим та ін.), до складу яких входять продукти життєдіяльності в культурі *in vitro* гриба-міксоміцета, вилученого з кореневої системи женьшеню (суміш амінокислот,

вуглеводів, жирних кислот, полісахаридів, фітогормонів та мікроелементів), що впливають на ростові процеси рослин, зокрема стимулюють проростання насіння і підвищують врожайність низки сільськогосподарських культур, а також стійкість до широкого кола патогенних та паразитичних організмів [16, 17]. Із цих регуляторів найефективнішим стимулятором коренеутворення у саджанців плодкових і ягідних культур, декоративних дерев, квітів та лікарських рослин є регулятор росту Чаркор [18]. З огляду на це теоретичний і практичний інтерес становить можливість використання цього регулятора не тільки у галузі сільськогосподарства, але й у біотехнології *in vitro*, особливо для індукції синтезу вторинних метаболітів у культурах «бородатих коренів» лікарських рослин.

Важливою сільськогосподарською та лікарською культурою є цикорій *Cichorium intybus* L., лікувальні властивості якого зумовлені присутністю запасних сполук — поліфруктанів (ПФ), з них найпоширенішим є полісахарид інулін, що має відносно низьку молекулярну масу ~5 000–6 000 Да [19–22]. Дослідниками Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України шляхом *Agrobacterium rhizogenes*-опосередкованої трансформації раніше було одержано культури «бородатих коренів» цикорію з генами туберкульозного антигена ESAT6 (esxA), Ag85 (fbpV^{ATMD}) та лейкоцитарного інтерферону людини ifn- α 2b і проведено визначення вмісту інуліну в трансформованих коренях [23]. Отримані трансгенні корені відзначалися збільшеним вмістом поліфруктанів, що, ймовірно, було наслідком стресу — генетичної трансформації.

Метою цієї роботи була перевірка можливості подальшого підвищення за допомогою регулятора росту Чаркор синтезу ПФ у культурі «бородатих коренів» цикорію *Cichorium intybus* L. сорту Пала росса, трансформованих *Agrobacterium rhizogenes*.

Матеріали і методи

В експериментах використовували трансгенні корені цикорію *Cichorium intybus* L. сорту Пала росса чотирьох ліній (№№ 2, 6, 14, 21), отриманих раніше шляхом трансформації сім'ядольних експлантів за допомогою *Agrobacterium rhizogenes* з використанням вектора pCB161 (селективний ген nptII, цільовий ген ifn- α 2b), наданих нам зав. лабораторією біології стрес-стійкості та біотехнології Інституту клітинної біології

і генетичної інженерії НАН України, к.б.н. Матвеевою Н. А. [23]. Термінальні ділянки коренів завдовжки 10 мм культивували на агаризованому та рідкому середовищах 1/2МС (середовище Мурасіге–Скуга [24] зі зменшеною удвічі концентрацією макроелементів) протягом 30 діб при +24 °С. До живильних середовищ додавали регулятор росту Чаркор у концентраціях відповідно: 0; 2,5; 5 та 10 мкл/л середовища. Для порівняння проводили також досліди з традиційними регуляторами росту: в рідке середовище 1/2МС додавали окремо по 0, 5 мг/л кінетину, ІМК, БАП і НОК; культивування коренів проводили за аналогічних умов.

Визначали: початкову масу коренів (m_0), масу коренів через 30 діб культивування (m_t); приріст маси коренів (Δm), суху масу ($m_{i-сух}$), питомий вміст поліфруктанів (у мг/г сухої маси коренів), загальний вміст поліфруктанів (у мг/загальну суху масу коренів, що виростили за 30 діб).

Для визначення загального вмісту ПФ корені висушували при 90 °С протягом 10 хв та досушували за кімнатної температури до постійної маси. Вміст ПФ визначали за методикою, що ґрунтується на здатності кетосахарів забарвлюватися резорцином у кислому середовищі [25]. До 100 мг сухого матеріалу додавали 5 мл дистильованої води, 5 мл 0,1%-го спиртового розчину резорцину та 5 мл концентрованої соляної кислоти, нагрівали на водяній бані 20 хв при температурі 80 °С. Після цього розчини охолоджували й вимірювали інтенсивність забарвлення на ФЕК (КФК-2) із зеленим світлофільтром (540 нм). Концентрацію ПФ встановлювали за калібрувальною прямою (калібрування за фруктозою).

Молекулярно-генетичні експерименти з метою визначення відсотка гомології в популяціях мРНК з контрольних і трансформованих *A. rhizogenes* коренів цикорію, вирощених на живильних середовищах з регулятором росту Чаркор, виконували за допомогою методу ДОТ-блот (точкової) гібридизації мРНК контрольних коренів з ^{32}P кДНК досліджуваних коренів [26, 27]. Із цією метою виділяли сумарний препарат РНК з клітин контрольних та досліджуваних коренів за методиками, які детально описано в раніше опублікованих нами роботах [28, 29]. Полімерність виділених сумарних препаратів РНК аналізували за допомогою електрофорезу в 1,5%-му агарозному гелі у присутності 7 М сечовини за методом Локера [30] (гелі фарбували розчином етидіумброміду перед фотографуванням

фракцій РНК в ультрафіолеті). Розділення полі(А) $^+$ мРНК (тобто мРНК) та полі(А) мРНК здійснювали на оліго(dT)-целюлозній колонці з наступним осадженням високомолекулярної полі(А) мРНК з елюату за допомогою 10%-го розчину поліетиленгліколю (мол. маса 8 000) з 0,5 М NaCl, а si/miRNA таким самим об'ємом 96%-го етанолу при -22 °С упродовж доби. Елюцію полі(А) $^+$ мРНК з оліго(dT)-целюлозної колонки проводили 2–3 об'ємами буфера такого складу: 10 мМ трис-НС1 (рН 7,5), 1 мМ ЕДТА, 0,05% ДДС-Na [26, 27]. Після елюції з колонки полі(А) $^+$ мРНК осаджували 96%-м етанолом.

Для синтезу ланцюга кДНК з дослідних коренів було використано буферний розчин, що містив: 100 мМ трис-НС1 (рН 8,3) при 42 °С, 10 мМ MgCl₂, 140 мМ КС1, 100 мкг/мл праймер оліго(dT)₁₂₋₁₈, 2 мМ метилгідраргієвого гідроксиду, 20 мМ β-меркаптоетанолу, 1 мМ ванадилрибонуклеозидних комплексів або 0,5 од/мкл РНКаз, 1 мМ розчин усіх чотирьох dNTP, 100 мкг/мл полі(А) $^+$ мРНК, 400–800 од/мл зворотної транскриптази і [α- ^{32}P]-dCTP (800 Кю/мМ) [26–28].

Для нанесення ^{32}P кДНК на фільтри її розчиняли в концентрації 20 мкг/мл у буфері 0,3 М NaCl — 0,03 М цитрат натрію, рН 7,0, (2xSSC) і для гібридизації наносили по 1 мл розчину [^{32}P]-кДНК на модифіковані й активовані целюлозні фільтри (Ватман 50, 2-амінофенілтіоефірний папір, який утворює ковалентні зв'язки з нанесеними ДНК чи РНК, на відміну від звичайних целюлозних чи нітроцелюлозних фільтрів, що утворюють водневі зв'язки з ДНК чи РНК). Це дозволяє уникнути втрати нуклеїнових кислот під час відмивання фільтрів [26, 31, 32].

Для гібридизації на фільтрах кДНК з мРНК вміщували у флакони для визначення радіоактивності, наповнені розчином 2xSSC з десятикратним надлишком мРНК відносно кДНК [26, 27]. У кожному досліді в окремі флакони вміщували фільтри з ДНК із генетично віддаленого джерела для контролю на специфічність гібридизації, а також фільтри, які не містили ДНК, з метою оцінювання величини неспецифічної сорбції РНК на матеріалі фільтрів. Флакони з фільтрами щільно закривали і ставили в термостат для гібридизації.

Гібридизацію проводили при 66 °С, однак у процесі роботи з нуклеїновими кислотами з різних джерел брали до уваги, що молекули РНК зі стійкішою вторинною структурою (за рахунок вмісту в ній більшої кількості ГЦ-пар, що може бути в сумарному препараті мРНК) інкубують при більш високих темпе-

ратурах. Оптимальну температуру і максимальний рівень гібридизації підбирали, вимірюючи рівень гібридизації мРНК відповідно з гомологічною і гетерологічною кДНК. Гібридизацію порівнювали в різні часові інтервали упродовж доби.

Після закінчення гібридизації флакони з фільтрами охолоджували, фільтри виймали і промивали у воронці з кожного боку 50 мл 2xSSC. Після промивання фільтри вміщували в розчин 2xSSC, що містив РНКазу в концентрації 20 мкг/мл. Після інкубації з РНКазою за кімнатної температури протягом 1 год фільтри знов промивали розчином 2xSSC, потім етиловим спиртом. Радіоактивність проб визначали на склофільтрах Millipore AP-15 у толуольному сцинтиляторі в сцинтиляційному лічильнику LS 100C фірми Beckman.

Для експериментів з гібридизації si/miРНК з мРНК (через кДНК) контрольних коренів препарати si/miRNA високої чистоти виділяли з контрольних та досліджуваних коренів цикорію, вирощених на живильних середовищах з регулятором росту Чаркор, за допомогою раніше розробленого нами методу [33]. Статистичну обробку експериментальних даних проводили за Стьюдентом.

Результати та обговорення

Вивчення чотирьох ліній (№№ 2, 6, 14, 21) трансгенних коренів цикорію *Cichorium intybus* L. сорту Пала росса показало різну чутливість їх до дії регулятора росту Чаркор (рис. 1). Хоча додавання регулятора росту в агаризоване середовище сприяло збільшенню маси коренів чотирьох ліній, найвищі показники приросту маси коренів отримано для лінії № 21. Для цієї лінії ріст коренів достовірно не відрізнявся за різної концентрації цього регулятора (2,5–10,0 мкл/л), але був значно вищим, ніж у контролі. Для лінії № 6 спостерігалось невелике збільшення росту коренів з підвищенням концентрації регулятора росту Чаркор від 2,5 до 10,0 мкл/л.

У процесі культивування в рідкому середовищі мінімальний приріст маси (за сухою масою) спостерігався в контролі (середовище 1/2МС без додавання регуляторів росту). З додаванням регулятора росту Чаркор приріст маси коренів збільшувався в 39–54 рази (лінія № 21) залежно від концентрації препарату (від 2,5 до 10 мкл/л середовища). Разом з тим статистично достовірних різниць впливу різної концентрації регулятора росту на приріст маси коренів не вияв-

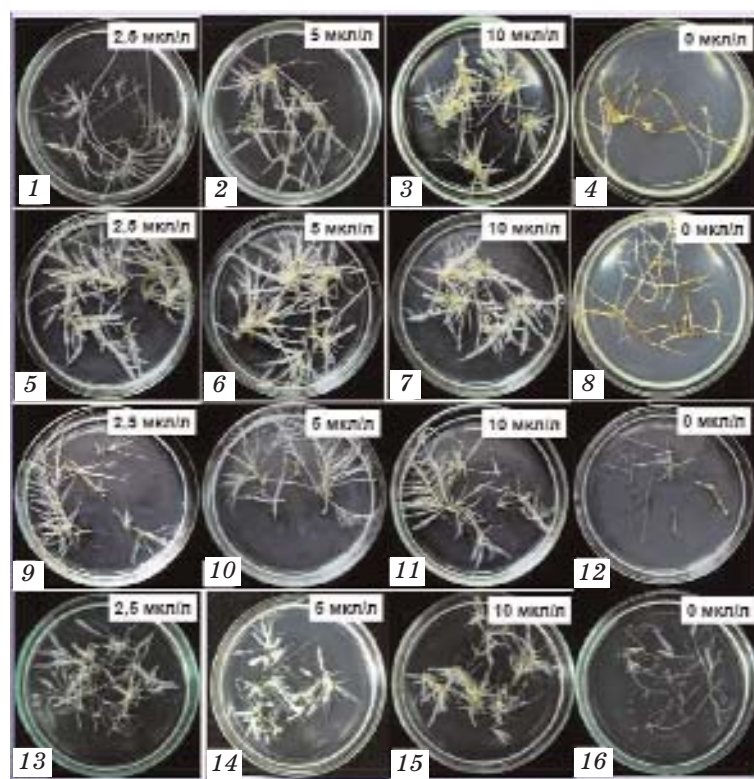


Рис. 1. Ріст трансгенних коренів цикорію на агаризованому середовищі: 1/2МС у присутності різних концентрацій регулятора росту Чаркор: 1–4 — лінія № 6; 5–8 — лінія № 21; 9–12 — лінія № 2; 13–16 — лінія № 14

лено (рис. 2). Найбільша питома концентрація ПФ спостерігалася в коренях, які культивували на середовищі 1/2МС (контроль, найповільніший ріст). Додавання препарату Чаркор зменшувало питому концентрацію (мг/г сухої маси) у 2–8 разів, причому мінімальна тестована концентрація (2,5 мг/л) зменшувала питому концентрацію ПФ більшою мірою (у 8 разів, рис. 2). Можливо, це пов'язано зі швидшим ростом коренів за таких умов.



Рис. 2. Ріст трансгенних коренів цикорію (лінія № 21) у рідкому середовищі (1/2МС) та синтез поліфруктанів у присутності різних концентрацій регулятора росту Чаркор

Найбільшу загальну кількість ПФ (48–130 мг/г загальної сухої маси коренів, що виростили за 30 діб) отримано під час культивування коренів у присутності регулятора росту Чаркор. Додавання регулятора підвищувало загальну кількість ПФ у 9–11 разів порівняно з контролем. Як видно з наведених діаграм (рис. 3), це відбувалося завдяки збільшенню маси коренів у разі їх культивування в присутності регулятора росту Чаркор. Таким чином, для підвищення кількості ПФ, що синтезуються в коренях цикорію, доцільно використовувати цей регулятор росту в концентрації від 2,5 до 10 мкл/л.

Проведено порівняння особливостей впливу препарату Чаркор та часто використовуваних традиційних регуляторів росту (БАП, ІМК, НОК, Кінетин). Отримані результати свідчать про значне підвищення швидкості росту трансгенних коренів у присутності ауксинів (НОК та ІМК), що сприяло збільшенню загального вмісту ПФ (рис. 4). Максимальний приріст маси коренів спостерігався в разі додавання в живильне середовище 0,5 мг/л ІМК; подібний ефект мав місце й за культивування коренів у присутності 5,0 мкл/л регулятора росту Чаркор.

Незначне збільшення аналогічних показників спостерігали і з додаванням у середовище Кінетину та БАП (по 0,5 мг/л).

При визначенні відсотка гомології у популяціях (наборах) цитоплазматичних мРНК-транскриптів, виділених із клітин контрольних та дослідних коренів цикорію (лінії № 6 та № 21), отриманих на живильних середовищах з регулятором росту Чаркор, методом ДОТ-блот-гібридизації ³²P-кДНК з мРНК встановлено достовірні відмінності в популяційних складах («спектрах») мРНК (таблиця). Значні зміни у популяційних показниках (відсоток гомології) малих регуляторних si/miРНК також виявлено за допомогою методу ДОТ-блот-гібридизації si/miРНК з мРНК між контрольними та дослідними варіантами «бородатих коренів» цикорію (лінії № 6 та № 21), вирощених на живильних середовищах із регулятором росту Чаркор.

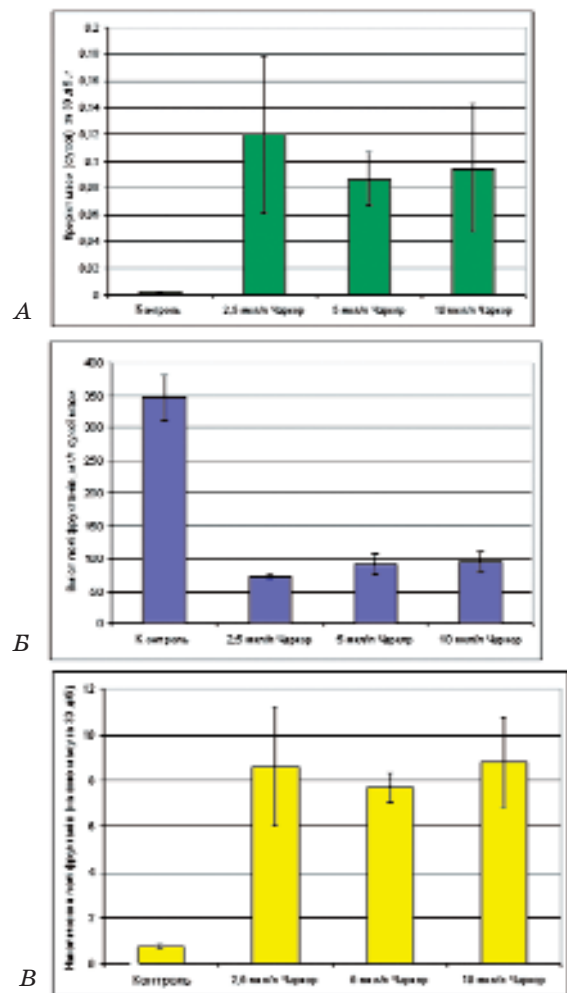


Рис. 3. Приріст маси коренів (А), питомий (Б) та загальний (В) вміст поліфруктанів у культурах «бородатих коренів» (лінія № 21), вирощених у присутності різних концентрацій регулятора росту Чаркор упродовж 30 діб

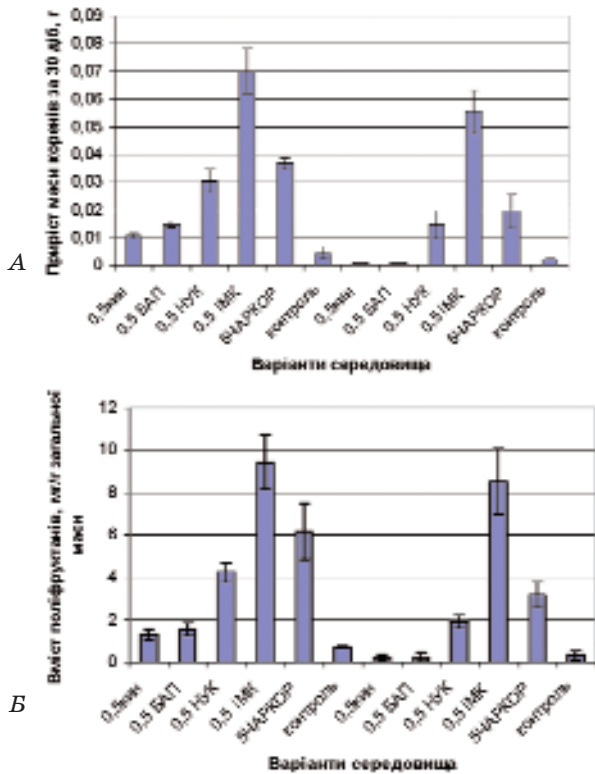


Рис. 4. Приріст маси коренів (А) та загальний вміст поліфруктанів (Б) у культурах «бородатих коренів», вирощених у присутності різних концентрацій регуляторів росту Кінетин, БАП, НОК, ІМК, Чаркор

Одержані результати щодо відмінностей у фенотипових ознаках у контрольних та дослідних коренів цикорію, а також у молекулярно-генетичних показниках (відсоток гомології у популяціях цитоплазматичних мРНК) свідчать про часткову зміну в експресії генів у дослідних рослин під впливом регулятора росту Чаркор. Насамперед це «включення» каскаду раніше неактивних, але близьких за функцією генів у мультигенних родинях або суперродинах генів біосинтезу

ендогенних фітогормонів (що підсилюють ріст біомаси та підвищують продуктивність — загальний вміст ПФ у коренях цикорію), в яких кожен член (варіант) родини генів дещо відрізняється за нуклеотидною послідовністю у регуляторних, кодувальних та некодувальних ділянках за їхньою структурою і регулюється різними зовнішніми чинниками, наприклад регуляторами росту (як було показано в проведених нами раніше дослідженнях [15, 16, 29, 34, 35], а також у роботах іноземних [8–12] та українських учених [36–42]). Встановлені фенотипові відмінності (значно більша розпушеність колоній клітин «бородатих коренів» на середовищі з регулятором Чаркор, що за фенотиповими ознаками подібні до адвентивних коренів рослин) можна також пояснити індукцією регулятором росту синтезу видоспецифічних, що регулюють ріст коренів, si/miРНК. На користь цього припущення свідчать дані літератури останніх років [43–47], де показано, що в коренях як звичайних, так і трансгенних рослин основна регуляторна функція si/miРНК полягає у вибіркового блокуванні трансляції (сайленсингу) мРНК низки негативних регуляторних транскрипційних ARF-факторів (Auxin Response Factor), що інгібують проведення сигналів фітогормонів ауксинів у адвентивних коренях рослин, унаслідок чого відбувається поліпшення передачі сигналів ауксинів і посилюється ріст адвентивних коренів. Очевидно, що й в умовах *in vitro* контрастне посилення росту подібних до адвентивних коренів колоній клітин «бородатих коренів» зумовлено значним підвищенням регулятором росту Чаркор синтезу ендogenous фітогормонів (зокрема, ауксинів), а також синтезу видоспецифічних, що регулюють ріст коренів, малих регуляторних si/miРНК, які блокують шляхом

Відсоток гомології у популяціях (наборах) цитоплазматичних мРНК-транскриптів, виділених із клітин контрольних та дослідних коренів цикорію (лінії № 6 та № 21), отриманих на живильних середовищах з регулятором росту Чаркор, методом ДОТ-блот-гібридації

№ лінії «бородатих коренів»	% гібридації мРНК (через κДНК) із мРНК з клітин контрольних та дослідних варіантів коренів цикорію				% гібридації мРНК (через κДНК) із si/miРНК з клітин контрольних та дослідних варіантів коренів цикорію			
	мРНК з κДНК необроблених регулятором клітин коренів (контроль)	Розведення регулятора: мкл в 1 л H ₂ O			мРНК, κДНК, si/miРНК з необроблених регулятором клітин коренів (контроль)	Розведення регулятора: мкл в 1 л H ₂ O		
		2,5	5,0	10,0		2,5	5,0	10,0
6	98±1,6	95±1,8*	93±1,6**	88±1,7**	97 ±1,4	94±1,3*	90±1,8**	86±1,4**
21	98±1,4	82±1,5**	78±2,2**	76±1,4**	98±1,6	86±1,8**	84±1,4**	82±1,6**

Примітка: середні дані з трьох дослідів (n = 3); * — наявність недостовірних відмін між дослідом та контролем; ** — наявність достовірних відмін від контролю, P < 0,05.

сайленсінгу трансляцію мРНК низки негативних регуляторних транскрипційних ARF-факторів, унаслідок чого покращується проведення сигналів ауксинів [43–47].

Таким чином, для отримання вищої кількості поліфруктанів із коренів цикорію доцільним є використання препарату Чаркор у живильному середовищі 1/2МС у концентрації 2,5–10 мкл/л, оскільки, незважаючи на відносно менший вміст ПФ на одиницю маси коренів, загальна кількість їх є вищою завдяки процесам активізації росту та значному збільшенню загальної маси коренів цикорію (у 39–54 рази за 30 діб) за культивування в присутності регулятора росту Чаркор відносно контролю.

Порівняльні досліді з традиційними синтетичними замінниками фітогормонів (БАП, ІМК, НОК, Кінетин) показали, що додавання до живильного середовища регулятора росту Чаркор сприяло збільшенню загального вмісту ПФ завдяки значно біль-

шому приросту біомаси коренів порівняно з вищезазначеними регуляторами.

За допомогою молекулярно-генетичного методу ДОТ-блот-гібридизації вперше встановлено істотну різницю в популяціях цитоплазматичних мРНК, а також у популяціях малих регуляторних si/miРНК, виділених із клітин контрольних та досліджуваних трансгенних коренів цикорію, вирощених на живильних середовищах з регулятором росту Чаркор. Отримані результати свідчать про наявність процесів зміни експресії відповідних генів у дослідних рослин під впливом цього регулятора через «включення» каскаду генів з високою активністю під сильними протомодулами в мультигенних родиннах або суперродинах генів біосинтезу фітогормонів (зокрема, ауксинів), які регулюють експресію генів росту коренів, унаслідок чого в умовах *in vitro* посилюється ріст біомаси та підвищується продуктивність (загальний вміст поліфруктанів) у культурах трансгенних коренів цикорію.

ЛІТЕРАТУРА

1. Кучук Н. В. Генетическая инженерия высших растений. — К.: Наук. думка, 1997. — 152 с.
2. Мельничук М. Д., Новак Т. В., Кунах В. А. Біотехнологія рослин. — К.: ПоліграфКонсалтинг, 2003. — 520 с.
3. Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. — К.: Логос, 2005. — 724 с.
4. Бутенко Р. Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. — М.: Наука, 1964. — 272 с.
5. Гамбург К. З., Кулаева О. Н., Муромцев Г. С. и др. Регуляторы роста растений. — М.: Колос, 1979. — 246 с.
6. Dorffling K. Das Hormonsystem der pflanzen. — Stuttgart: Springer, 1982. — 304 p.
7. Калинин Ф. Л. Применение регуляторов роста в сельском хозяйстве. — К.: Урожай, 1989. — 168 с.
8. Murthy B. N. S., Murch S. J., Saxena P. K. Thidiazuron-induced somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut (*Arachis hypogaea* L.): endogenous growth regulator levels and significance of cotyledons // *Physiol. Plant.* — 1995. — V. 94. — P. 268–276.
9. Hutchinson M. J., Saxena P. K. Role of purine metabolism in thidiazuron-induced somatic embryogenesis of geranium (*Pelargonium hortorum* Bailey) hypocotyl cultures // *Ibid.* — 1996. — V. 98. — P. 517–522.
10. Victor J. M. R., Murch S. J., Krishna S., Saxena P. K. Somatic embryogenesis and organogenesis in peanut: the role of thidiazuron and N6-benzylaminopurine in the induction of plant morphogenesis // *Plant Growth Regul.* — 1999. — V. 28. — P. 9–15.
11. Victor J. M. R., Murch S. J., Krishna S., Saxena P. K. Role of endogenous purine metabolism in thidiazuron-induced somatic embryogenesis of peanut (*Arachis hypogaea* L.) // *Ibid.* — 1999. — V. 28. — P. 41–47.
12. Pan R., Tian X. Comparative effect of IBA, BSSA and 5,6-Cl2-IAA-Me on the rooting of hypocotyl in mung bean // *Ibid.* — 1999. — V. 28. — P. 91–98.
13. Кухарь В. П., Карабанов Ю. В., Павленко А. Ф. и др. Новый регулятор роста Ивин. Физиологически активные соединения. — К.: Наукова думка, 1986. — Т. 18. — С. 3–14.
14. Tsygankova V. A., Blume Ya. B. Screening and peculiarity of the biological action of synthetic plant growth regulators // *Біополімери і клітина.* — 1997. — Т. 13, № 6. — С. 484–492.
15. Tsygankova V. A., Zayets V. N., Galkina L. A., Blume Ya. B. The phytohormone-mediated action of the synthetic regulators on cell extension growth in higher plants // *Там само.* — 1999. — Т. 15, № 5. — С. 432–441.
16. Цыганкова В. А. и др. Экспрессия генов при стимулировании регуляторами роста и развитии растений. Биорегуляция микробно-растительных систем / Под ред. Г. А. Иутинской, С. П. Пономаренко. — К.: Ничлава, 2010. — С. 291–332.
17. Tsygankova V. A. et al. Gene expression under regulators' stimulation of plant growth and development. New plant growth regulators: basic research and technologies of application / Ed. S. P. Ponomarenko, H. O. Iutynska. — Kyiv: Nichlava, 2011. — P. 94–152.

18. Пономаренко С. П. Регуляторы роста растений. — К.: СП Інтертехнодрук, 2003. — 319 с.
19. Методы химии углеводов / Под ред. Н. К. Кочеткова. — М.: Мир. — 1967. — С. 370–371.
20. Baert J. R. A., Vockstaele E. L. Cultivation and breeding of chicory root for inulin production // *Industr. Crops Prod.* — 1992. — V. 1, N 2–4. — P. 229–234.
21. Матвеева Н. А. Фруктаны, биосинтез у природі та в трансгенних рослинах // *Вісн. Укр. т-ва генетиків і селекціонерів.* — 2010. — Т. 8, № 2. — С. 312–319.
22. Матвеева Н. А., Кваско О. Ю. Особенности накопления полифруктанов у трансгенных растениях цикорію *Cichorium intybus* L. // Там само. — 2011. — Т. 9, № 1. — С. 65–69.
23. 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, № 3. — С. 56–63.
24. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture // *Phys. Plant.* — 1962. — V. 15, N 3. — P. 473–497.
25. Ермаков А. И., Арасимович В. В., Ярош Н. П. и др. Методы биохимического исследования растений. — Л.: Агропромиздат, 1987. — С. 143.
26. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. *Molecular cloning: A laboratory manual.* — New York: Cold Spring Harbor Lab, 1982. — 480 p.
27. *Promega protocols and applications guide.* Second edition. — USA: Promega Corporation, 1991. — 422 p.
28. Tsygankova V. A., Blume Ya. B. et al. An unusual minor protein appearing in embryonic axis cells of haricot bean seeds following germination process stimulated by 6-methylthiouracil // *Biopolymers and cell.* — 1998. — V. 14, N 5. — P. 438–448.
29. Цыганкова В. А., Мусатенко Л. И., Пономаренко С. П. и др. Изменение популяций функционально активных цитоплазматических мРНК в клетках растений под влиянием регуляторов роста и биотехнологические перспективы бесклеточных систем протеинового синтеза // *Біотехнологія.* — 2010. — Т. 3, № 2. — С. 19–32.
30. Locker J. Analytical and preparative electrophoresis of RNA in agarose-urea // *Anal. Biochem.* — 1979. — V. 98, N 2. — P. 358–367.
31. Методы биологии развития / Под ред. Т. А. Детлафа, В. Я. Бродского, Г. Г. Гаузе. — М.: Наука, 1974. — 619 с.
32. Davis L. G., Dibner M. D., Battley J. F. *Basic methods in molecular biology.* — New York: Elsevier Science Publishing Co., Inc., 1986. — 388 p.
33. Цыганкова В. А., Андрусевич Я. В., Блюм Я. Б. Виділення з клітин рослин малих регуляторних si/miRNA з антинематодною активністю // *ДАН України.* — 2011. — № 9. — С. 159–164.
34. Tsygankova V. A. Concerning the peculiarities of gene expression changes in plant leaf cells during twenty-four-hour period // *Біотехнологія.* — 2010. — Т. 3, № 4. — С. 86–95.
35. Цыганкова В. А., Пономаренко С. П., Галкін А. П. та ін. Особливості змін експресії генів в клітинах рослин під впливом екзогенних регуляторів росту / *Доп. Фізіологія рослин: проблеми та перспективи розвитку.* Укр. т-во фізіологів рослин. — К.: Логос, 2009. — С. 576–584.
36. Michalczuk L., Cooke T. J., Cohen J. D. Auxin levels at different stages of carrot embryogenesis // *Phytochemistry.* — 1992. — V. 31. — P. 1097–1103.
37. Michalczuk L., Ribnicky D. M., Cooke T. J., Cohen J. D. Regulation of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in carrot cell cultures // *Физиология растений (Россия).* — 1992. — Т. 100. — С. 1346–1553.
38. Cooke T. J., Racusen R. H., Cohen J. D. The role of auxin in plant embryogenesis // *Plant Cell.* — 1993. — V. 5. — P. 1494–1495.
39. Terek O., Romaniuk K. N., Terec K. Endogenous phytohormones of plants treated by growth regulators / In *Book of Abstracts of the 2nd Conference on progress in plant sciences from Plant Breeding to growth Regulation.* Mosonmagyaróvár — Hungary and Bergholz-Rehbrücke — Germany. — 1998 — P. 64.
40. Romaniuk N., Troyan V., Musiyaka V. et al. Investigation of growth regulation activity of Emistym, the new perspective plant growth regulator / *Ibid.* — 1998. — P. 75.
41. Мірюта Н. Ю., Кунах В. А. Динаміка клітинних систем *in vitro*. I. Організація у часі та стабільність системи культури тканин раувольфії зміїної на добовому рівні організації // *Біотехнологія.* — 2011. — Т. 4, № 5. — С. 25–38.
42. Мірюта Н. Ю., Кунах В. А. Динаміка клітинних систем *in vitro*. II. Організація у часі та стабільність системи культури тканин раувольфії зміїної на пасажному рівні // *Біотехнологія.* — 2011. — Т. 4, № 6. — С. 18–29.
43. Sorin C., Bussell J. D., Camus I. et al. Auxin and light control of adventitious rooting in *Arabidopsis* require ARGONAUTE 1 // *Plant Cell.* — 2005. — V. 17. — P. 1343–1359.
44. Sorin C., Negroni L., Balliau T. et al. Proteomic analysis of different mutant genotypes of *Arabidopsis* led to the identification of 11 proteins correlating with adventitious root development // *Plant Physiol.* — 2006. — V. 140. — P. 349–364.
45. Gutierrez L., Bussell J. D., Paccurar D. I. et al. Phenotypic plasticity of adventitious rooting in *Arabidopsis* is controlled by complex regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR transcripts and microRNA abundance // *The Plant Cell.* — 2009. — V. 21. — P. 3119–3132.
46. Marin E., Jouannet V., Herz A. et al. miR390, *Arabidopsis* TAS3 tasiRNAs, and their

AUXIN RESPONSE FACTOR targets define an autoregulatory network quantitatively regulating lateral root growth // *Ibid.* — 2010. — V. 22. — P. 1104–1117.

47. Meng Y., Mab X., Chen D., Wub P. Micro-RNA-mediated signaling involved in plant root development // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2010. — V. 393. — P. 345–349.

**РЕГУЛЯТОР РОСТА ЧАРКОР
КАК ИНДУКТОР НАКОПЛЕНИЯ
БИОМАССЫ В КУЛЬТУРАХ
«БОРОДАТЫХ КОРНЕЙ» ЦИКОРИЯ —
ПРОДУЦЕНТОВ ПОЛИФРУКТАНОВ**

**THE GROWTH REGULATOR CHARKOR
AS INDUCTOR OF BIOMASS
ACCUMULATION IN THE CHICORY
«HAIRY ROOTS» CULTURES —
PRODUCERS OF POLYFRUCTANS**

В. А. Цыганкова¹
С. П. Пономаренко²
А. П. Галкин³
А. И. Емец³

V. A. Tsygankova¹
S. P. Ponomarenko²
A. P. Galkin³
A. I. Yemets³

¹Институт биоорганической химии
и нефтехимии НАН Украины, Киев

¹Institute of Bioorganic Chemistry and
Petrochemistry of National Academy
of Sciences of Ukraine, Kyiv

²Межведомственный научно-технологический
центр «Агробиотех» НАН и МОН Украины,
Киев

²National Enterprise Interdepartmental Science
& Technology Center «Agrobiotech» of National
Academy of Sciences and Ministry of Education
and Science of Ukraine, Kyiv

³Институт пищевой биотехнологии
и геномики НАН Украины, Киев

³Institute of Food Biotechnology and Genomics
of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: vTsygankova@ukr.net

E-mail: vTsygankova@ukr.net

В культурах четырех линий корней цикория (*Cichorium intybus* L.), трансформированных *Agrobacterium rhizogenes*, достигнуто значительное повышение уровня синтеза полифруктанов на питательных средах с регулятором роста Чаркор. Показано, что его присутствие в агаризованной и жидкой средах 1/2МС увеличивало прирост массы корней (по сухой массе) в 39–54 раза относительно контроля в зависимости от концентрации регулятора (от 2,5 до 10 мкл/л среды). Влияние регулятора роста Чаркор на прирост массы корней было подобным действию ауксинов, в частности индолилмасляной кислоты. Добавление в эти среды регулятора роста Чаркор приводило к уменьшению удельного содержания полифруктанов (мг/г сухой массы) в 2–8 раз, что обусловлено более быстрым ростом корней в таких условиях. В то же время при культивировании корней в присутствии регулятора роста Чаркор общее содержание полифруктанов было значительно выше, чем в контроле, и составляло 48–130 мг/г общей сухой массы корней, выросших за 30 сут.

Root culture of four lines chicory (*Cichorium intybus* L.), transformed by *Agrobacterium rhizogenes*, showed the considerable increase of polyfructan (PF) synthesis level in nutrient media with growth regulator Charkor. It is shown that adding growth regulator Charkor into medium with agar and liquid medium 1/2MC increased root mass (by dry mass) in 39–54 times relative to control depending on concentration of regulator (from 2,5 to 10 µl/l of medium). Influence of growth regulator Charkor on growth of root biomass was similar to action of auxin, in particular, indolebutyric acid. Adding of growth regulator Charkor to these media diminished the relative concentration of polyfructans (mg/g of dry mass) in 2–8 times, that is related to hastier root growth on such conditions. At the same time when cultivation of root is done at presence of growth regulator Charkor, the general maintenance of polyfructans (48–130 mg/g of total dry root mass grown for a 30 twenty-four hours) was well above than in the control.

Методом ДОТ-блот-гибридизации установлена существенная разница в популяциях цитоплазматических мРНК и малых регуляторных si/miРНК между контрольными и опытными растениями. Это свидетельствует о частичных изменениях в экспрессии генов под влиянием регулятора.

The method of DOT-blot hybridization showed a considerable difference in populations of cytoplasmic mRNA and small regulatory si/miRNK between control and experimental plants. It is indicative of some changes in gene expression under the influence of the regulator.

Ключевые слова: регулятор роста растений Чаркор, «бородатые корни» цикория, полифруктаны, ДОТ-блот-гибридизация.

Key words: plant growth regulator Charkor, chicory «hairy roots», polyfructans, DOT-blot-hybridization.