

## AGROBACTERIUM RHIZOGENES – ОПОСРЕДОВАННАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ И ОСОБЕННОСТИ РЕГЕНЕРАНТОВ *DIGITALIS PURPUREA* L.

В настоящее время растения широко используются человеком не только для питания и получения сырья для хозяйственной деятельности, но и в качестве источника биологически активных компонентов, при производстве лекарственных препаратов, пестицидов, а также для косметической и пищевой промышленности. Однако растения, собранные в природных условиях, покрывают только 65–70 % от его необходимого количества, и сырье может не соответствовать экологическим нормам, а химический синтез необходимых компонентов либо затруднен, либо экономически невыгоден [1]. Это вынуждает обратить внимание на разработку биотехнологических подходов получения биологически активных веществ из биомассы культивируемых *in vitro* клеток и тканей растений [2, 3]. Однако установлено, что при выращивании культуры клеток растений в условиях *in vitro* происходит снижение уровня биосинтеза вторичных соединений по сравнению с содержанием таковых в интактных растениях. Это объясняется частичной утратой способности реализации генетической информации, относящейся к вторичному обмену, в результате дедифференциации клеток [4]. Одним из методов стимулирования синтеза биологически активных компонентов есть трансформация растения бактерией *Agrobacterium rhizogenes* и получение культуры генетически трансформированных корней «hair roots», которая может быть стабильной системой, продуцирующей биомассу с высоким уровнем синтеза вторичных метаболитов [5], а также получение *pRi* Т-ДНК растений-регенерантов, продуцирующих вторичные соединения в большем количестве по сравнению с интактными растениями [6].

Вещества, выделяемые из наперстянки пурпурной *Digitalis purpurea* L., являются основой большого количества лекарственных препаратов для лечения сердечно-сосудистой недостаточности. Разработка биотехнологических ме-

тодов получения экологически чистой биомассы этого растения для фармацевтического производства является актуальной задачей на сегодняшний день. Изучение культур клеток наперстянки разных видов показало, что биосинтез карденолидов зависит от степени морфологической дифференциации клеток [7, 8]. Генетически трансформированные корни *D. purpurea*, содержащие химерные *neo*- и *gus*-гены, производят кардиотоксические гликозиды на свету [9]. Используя для трансформации *D. purpurea* агропиновый штамм *A. rhizogenes* (LBA 9402), авторы установили, что быстро растущий *pRi*-трансформированный корень можно использовать для изучения синтеза гликозидов [10].

Исходя из вышесказанного, целью нашей работы являлось получение культуры генетически трансформированных корней и растений-регенерантов наперстянки пурпурной, а также исследование влияния агробактериальной трансформации на биосинтез вторичных метаболитов в культуре и в растениях *D. purpurea*.

### Материалы и методы

**Растительный материал:** асептические растения *D. purpurea* культивировали на среде МС [11], а культуру каллуса – на МС с добавлением 1 мг/л НУК+ 0,1 мг/л кинетина при 26±1°C, 16-часовом фотопериоде, освещении 3000 люкс. Субкультивировали ежемесячно на тех же средах, в тех же условиях. Для агробактериальной трансформации использовали суспензию *A. rhizogenes* штамм 15834, инкубированную на питательной среде Nutrient Broth (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India) 24 ч при 26°C на шейкере 120 об/мин в темноте. **Трансформация и регенерация.** Стерильные эксплантаты листьев выдерживали в бактериальной суспензии в течение 20 мин, помещали в чашки Петри на 24 часа на фильтровальную бумагу с 3 мл МС для ко-культивирования. После суточной инкубации растительный

материал переносили на агаризованную среду  $V_5$  с добавлением 500 мг/л цефотаксима для ингибирования роста бактерий до появления адвентивных корней. Частоту трансформации вычисляли по соотношению количества трансформированных эксплантатов к их общему количеству. Полученные линии корней переносили в жидкую безгормональную среду  $V_5$ . Интенсивность роста полученных культур измеряли, определяя их ростовой индекс, который представляет собой отношение конечной массы корней к их исходной массе и время удвоения массы. Регенеранты растений из трансформированных корней получали, инкубируя корневые эксплантаты на агаризованной МС с половинным содержанием солей азота на свету. Полученные побеги переносили на агаризованную МС, содержащую 0,1 мг/л НУК, для корнеобразования. Полученные регенеранты инкубировали на среде МС без гормонов при 25°C, 16-часовом фотопериоде и поддерживали перенесением верхушек розетки каждые 25–30 сут.

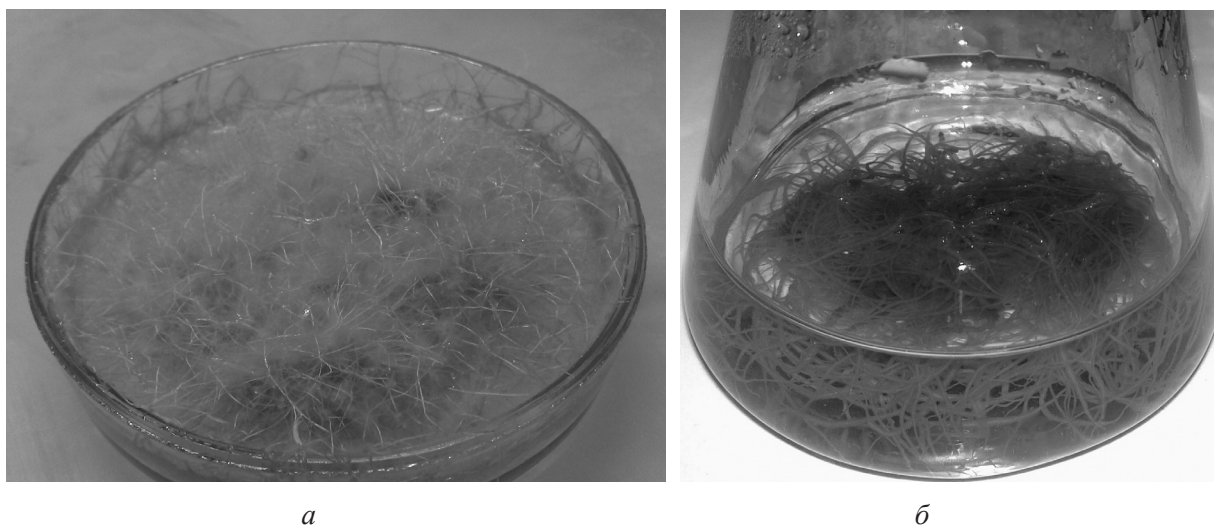
**Полимеразная цепная реакция (ПЦР).** Суммарную ДНК получали, используя набор реагентов для выделения ДНК «Diatom DNA Prep 100», Россия. Праймеры для *rolB*-гена: 5'-ATGGATC CCAAATTGCTATTCTTCCACGA, 3'-TTAGGC TTCTTTCTTCAGGTTTACTGCAGC. В качестве положительного контроля использовали плазмидную ДНК агробактерии. Реакцию проводили в термоциклере «Терцик» (Пушино, Россия). Конечный объем реакционной смеси 30 мкл: 1 мкл ДНК (50 нг), 0,2 мкМ каждого праймера, 200 мкМ каждого дНТФ (дезоксинуклеозидтрифосфата), 0,5 единицы Taq-полимеразы и 3 мкл 10×ПЦР буфера. Условия реакции: начальная денатурация 94°C в течение 3 мин, отжиг 60°C в течение 1 мин, элонгация 72°C 1 мин – 30 циклов, последний цикл – элонгация 72°C – 7 мин. Продукты амплификации анализировали при помощи электрофореза в 2 % агарозном геле в присутствии этидий бромид. Длина амплифицированного фрагмента в случае образцов, имеющих *rolB*-ген, составляла 780 п.н. **ВЭЖХ-хроматография.** Пробоподготовка: по 2 г анализируемой ткани (каллус, культура корней и листовые экспланты растений) суспендировали с добавлением воды и выдерживали 3 ч при 40°C. Затем образцы готовили, как описано у Фуджи [12]. Суммарный спектр кардиогликозидов определяли на хроматографе фирмы «Agilent», США с последующей компьютерной обработкой результатов. Разделительная колонка Rapid Resolution HT Cartridge 4.6x30mm, 1.8-micron, Zorbx Sb-c18,

подвижная фаза – ацетонитрил: метанол: вода (4:4:5), скорость движения – 3 мл/мин. Детектирование проводили при длине волны 215 нм. Хроматограммы оценивали по времени удержания и площади пика в автоматическом режиме. На диаграмме обозначено среднее значение пяти основных пиков ВЭЖХ-профиля в процентах по отношению к контролю. Результаты обработки в приложении Excel стандартного пакета Microsoft Office XP («Microsoft», США)

### Результаты и обсуждения

Для трансформации использовали дикий штамм *Agrobacterium rhizogenes* 15834 (любезно предоставленный к.б.н. И.Н. Кузовкиной, ИФР РАН) и листовые эксплантаты 8-недельных растений *in vitro* наперстянки пурпурной, полученной нами ранее [13]. В агробактериальную суспензию на 20 мин помещали листовые пластины, разрезанные на фрагменты размером около 1 см, проколотые острой иглой в участках выраженного жилкования. Затем сутки выдерживали на фильтре, смоченном 3 мл МС. После этого эксплантаты размещали на безгормональной среде  $V_5$  с добавлением цефотаксима 500 мг/л в условиях светового блока до появления признаков ризогенеза. Через 2 недели по кромкам листовых эксплантатов и в местах поранения наблюдали появление первых корешков, внешний вид которых уже свидетельствовал об их трансформации. Они активно росли, и их рост имел отрицательный геотропизм. Каждые 2 недели образовавшиеся эксплантаты с участком исходного материала переносили на свежую среду с уменьшенной концентрацией цефотаксима (250 мг/л, затем 100 мг/л) до полной элиминации бактерий. Далее образовавшуюся культуру корней культивировали на безгормональной среде  $V_5$  с добавлением ага-

Также корневые эксплантаты, помещенные в колбы с 20 мл жидкой питательной среды  $V_5$ , не содержащей гормонов, инкубировали на качалке (90 об/мин, температура 26°C) (рис. 1 б). Количество среды увеличивали по мере роста культуры. Через 2–3 пассажа были отобраны пять наиболее активно растущих линий культуры корней. Измерения ростовых показателей показало, что ростовой индекс к концу пассажа (24 дня) был равен 32, а время удвоения массы корневой культуры составляло 48 ч, что свидетельствовало о том, что клетки обладают стабильными ростовыми свойствами.



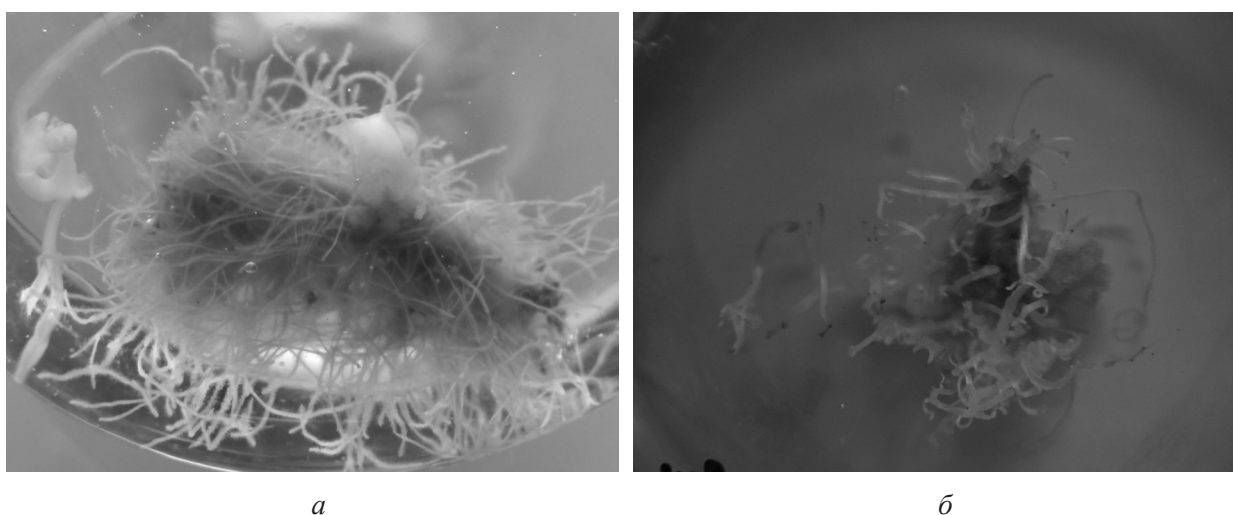
**Рис. 1.** Культура генетически трансформированных корней *D. purpurea*: а – поверхностное культивирование; б – глубинное культивирование

Инкубация корневых эксплантатов на свету приводила к спонтанной регенерации растений, причем на агаризованной среде наблюдалось появление множественных побегов (рис. 2 а), а при глубинном культивировании – соматический эмбриогенез (рис. 2 б). Это происходило только в культуре первого и второго пассажа. В дальнейшем способность к спонтанной регенерации из корней не наблюдалась. Затем растения были перенесены на среду МС с добавлением 0,1 мг/л НУК и после укоренения было выделено три линии для дальнейших исследований.

Спонтанная регенерация путем органогенеза или соматического эмбриогенеза из трансфор-

мированных корней была отмечена в ряде культур [14]. Для наперстянки наблюдалось появление побегов и регенерации трансформированных растений только на среде с добавлением цитокинина [10]. Наша культура инкубировалась на среде с низким содержанием азота и на свету, что могло стимулировать индукцию органогенеза на твердой среде и соматический эмбриогенез при глубинном культивировании без добавления гормонов.

Для подтверждения трансформации использовали ПЦР-анализ, который показал наличие гена *rolB* из ТL-области *Ri*-плазмиды *A. rhizogenes* в растениях-регенерантах. Получен-



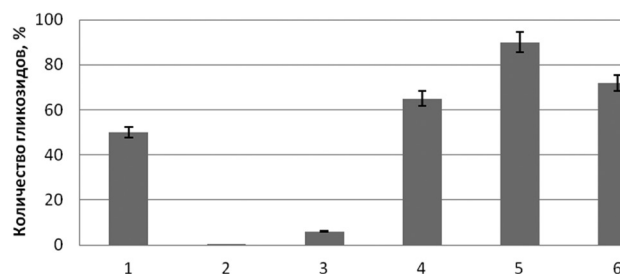
**Рис. 2.** Регенерация *D. purpurea* из культуры генетически трансформированных корней: а – множественное побегообразование на агаризованной среде; б – соматический эмбриогенез в жидкой среде



ные растения отличались от интактных интенсивным ризогенезом и увеличением общей массы на 25 %. Эффективность трансформации составляла 83 %.

Важным этапом работы было сравнение содержания суммарных гликозидов в исследуемых культурах. Для этого был проведен ВЭЖХ-анализ спиртовых экстрактов культур клеток (калуса и генетически трансформированных корней), интактных растений и растений-регенерантов. За 100 % брали количество вещества в интактном растении. Сравнение ВЭЖХ-профилей и средних значений площадей пиков показало, что культура корней синтезирует тот же спектр вторичных соединений, что и интактное растение, и характеризуется большим количественным содержанием гликозидов, чем каллусная культура *in vitro*. Больше всего веществ выявлено в растениях-регенерантах, и их было на 58 % больше, чем у интактных растений (рис. 3).

Полученные результаты можно объяснить встраиванием в ядерный геном растений *rol*-ге-



**Рис. 3.** Содержание гликозидов в анализируемой фракции веществ: 1 – интактные растения; 2 – каллус; 3 – трансформированные корни; 4–6 Ri-трансформированные растения-регенеранты

нов Т-ДНК из Ri-плазмиды *A. rhizogenes*, которые, вероятно, способны активировать ключевые гены вторичного метаболизма, возможно, через факторы транскрипции. Также перенесенные бактериальные гены способны повысить устойчивость клеток к экологическим стрессам путем активации *защитной* антиоксидантной *системы* [15].

### Выводы

Получена стабильно растущая культура генетически трансформированных корней «hairy roots» и растения-регенеранты наперстянки пурпурной *Digitalis purpurea* L. Подобраны и оптимизированы среды для их культивирования. В результате спонтанной регенерации из трансформированных корней на среде с пониженным содержанием азота в условиях инкубации на свету получены Ri-трансформанты наперстянки пурпурной. Регенеранты из корней характеризуются усиленным ризогенезом и эффективным увеличением массы. ПЦР-анализ подтвердил перенос гена *rolB* из Т-ДНК *A. rhizogenes* в геном растений. ВЭЖХ-анализ показал, что корни синтезируют весь комплекс вторичных соединений, типичных для целого растения, в количестве большем, чем в каллусной культуре, но недостаточном для промышленного культивирования. Растения-регенеранты синтезируют весь спектр вторичных соединений и их содержание на 58 % больше, чем в интактных растениях. Это подтверждает тезис о том, что введение в ядерный геном растений трансформирующей области *A. rhizogenes* изменяет не только морфологию растений, но и вызывает изменение их вторичного метаболизма.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Verpoorte R., Contin A., Memelink J. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites // *Phyto-chem. Rev.* – 2002. – 1. – P. 13–25.
2. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. – К.: Логос, 2005. – С. 526–548.
3. Nosov A.M. Application of cell technologies for production of plant derived bioactive substances of plant origin // *Appl. Biochem. Microbiol.* – 2012. – 48, N 7. – P. 609–624.
4. Запроматов М.Н. Вторичный метаболизм и его регуляция в культурах клеток и тканей растений // *Культура клеток растений: сб. статей / Под. ред. Р.Г. Бутенко.* – М.: Наука, 1981. – С. 37–49.
5. Georgiev M.I., Pavlov A.I., Bley T. Hairy root type plant *in vitro* systems as a sources of bioactive substances // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2007. – 27. – P. 1175–1185.
6. Giri A., Lakshmi Narasu M. Transgenic hairy roots: recent trends and applications // *Biotech. Adv.* – 2000. – 18, N 1. – P. 1–22.
7. Perez-Alonso N., Wilken D., Gerth A, Jahn A, Nitzsche H.M., Kerns G., Capote-Perez A., Jimenez E.9. Cardiotonic glycosides from biomass of *Digitalis purpurea* L. cultured in temporary immersion systems // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* – 2009. – 99. – P. 151–156.
8. Pradel H., Dumke-lehmann U., Dietrich B., Luckner M. Hairy root cultures of *Digitalis lanata*. Secondary metabolism and plant regeneration // *Journal of Plant Physiology.* – 1997. – 151. – P. 209–215.
9. Saito K., Yamazaia M., Shimomura K., Yoshimatsu K., Murakoshi I. Genetic transformation of foxglove (*Digitalis purpurea*) by chimeric foreign genes and production of cardioactive glycosides // *Plant Cell Reports.* – 1990. – 9. – P. 121–124.

10. Koga M., Hirashima K., Nakahara T. The transformation system in foxglove (*Digitalis purpurea* L.) using *Agrobacterium rhizogenes* and traits of regenerant // Plant Biotechnology. – 2000. – 17. – P. 99–104.
11. Murashige I., Scoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plantarum. – 1962. – 15, N 3. – P. 473–497.
12. Fujii Y., Ikeda Y., Yamazaki M. High-performance liquid chromatographic determination of secondary cardiac glycosides in *Digitalis purpurea* leaves // J. of Chromatography A. – 1989. – 479. – P. 319–325.
13. Лёшина Л.Г., Булко О.В. Культивирование *in vitro*, ростовые параметры и оценка способности к биосинтезу гликозидов культуры клеток *Digitalis purpurea* L. // Физиология та біохімія культурних рослин. – 2011. – 43, N 2. – С. 164–170.
14. Roychowdhury D., Majumder A., Jha S. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation in medicinal plants: prospects and challenges // Chandra S. et al. (Eds.) Biotechnology for Medicinal plants. – Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2013. – P. 29–68.
15. Bulgakov V.P., Shkryl Y.N., Veremeichik G.N., Gorpenchenko T.Y., Inyushkina Y.V. Application of *Agrobacterium rol* genes in plant biotechnology: a natural phenomenon of secondary metabolism regulation [Electronic resource] // «Genetic Transformation», book edited by María Alvarez. – 2011. – Mode of access: <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/18823.pdf>.

#### LIOSHINA L.G.<sup>1</sup>, BULKO O.V.<sup>1</sup>, STRELNİK O.A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 03143, Kyiv, Akad. Zabolotnogo str., 148, e-mail: [llioshina@ukr.net](mailto:llioshina@ukr.net)

<sup>2</sup> National Technical University of Ukraine «Kyiv Polytechnic Institute», Ukraine, 03056, Kyiv, Prospect Peremohy, 37, e-mail: [strelnikoksana@yandex.ua](mailto:strelnikoksana@yandex.ua)

#### **AGROBACTERIUM RHIZOGENES – MEDIATED TRANSFORMATION AND FEATURES OF DIGITALIS PURPUREA L. REGENERANTS**

**Aim.** The influence of *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation on morphological and biochemical features of *D. purpurea*. The goal was achieved through the study of the properties of the transformed cell cultures and regenerated plants. **Methods.** Transformation of *D. purpurea* using soil bacterium strain *A. rhizogenes* 15834, regeneration, PCR analysis, HPLC chromatography **Results.** A stable growing «hairy roots» culture and plant regenerates of *D. purpurea* were obtained. Cultural mediums for different types of explants cultivation were chosen and optimized. pRi-transformants were obtained by spontaneous regeneration of transformed roots. HPLC analysis showed that the synthesis of cardiac glycosides in hairy roots exceeds 3.5 times its synthesis in callus, and in Ri-transformants synthesis of cardiac glycosides was amplified by 0.6 compared to intact plants. **Conclusions.** Hairy roots culture and Ri-transformed plants of *D. purpurea* which were able to synthesise the whole range of secondary compounds typical to intact plants were obtained. The amount of cardiac glycosides in hairy roots was higher than in callus culture, but wasn't enough for commercial cultivation. In transformed plants, the synthesis of secondary metabolites is increased compared to intact plants. We associate it with the incorporation of the *rol*-genes *A. rhizogenes* into the nuclear genome.

**Keywords:** *Digitalis purpurea* L., «hairy roots», regenerated plants, secondary metabolites, cardiac glycosides.