



**ОТРИМАННЯ КУЛЬТУРИ ТРАНСГЕННИХ КОРЕНІВ  
*ROBINIA PSEUDOACACIA* L. ШЛЯХОМ  
AGROBACTERIUM-ОПОСЕРЕДКОВАНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ**

**Олександр ПОРОВСЬКИЙ, Юлія ЛУЧАКІВСЬКА**

*Київський Палац дітей та юнацтва*  
вул. Івана Мазепи, 13, Київ 01010, Україна

**e-mail:** [sashaporovsky@gmail.com](mailto:sashaporovsky@gmail.com)

Культура «волохатих» коренів — це поширена трансгенна культура, отримана за допомогою *Agrobacterium rhizogenes*. Культури трансгенних коренів використовують у фармакології (для накопичення цінних вторинних метаболітів [1], для біосинтезу рекомбінантних фармацевтичних сполук [2] тощо), для фіторемедіації (наприклад, важких металів [3]) тощо. До переваг використання трансгенних кореневих культур для фармакологічних або фіторемедіаційних цілей відносять відносно низьку собівартість їх отримання та культивування через невибагливість до складу середовища, температурного та світлового режиму, швидкий приріст біомаси, відсутність геотропізму тощо.

Для нашого дослідження була обрана *Robinia pseudoacacia* L. через її здатність до ремедіації ґрунтів від важких металів [4]. Але в той же час акацію з 2023 року в Україні вважають інвазивним видом [5], тому інтродукція акації на території нашої країни для ремедіації стічних вод чи ґрунтів є неможливою. Отже, ми пропонуємо використання культури трансгенних коренів для очищення ґрунтів та стічних вод від забруднення важкими металами, в тому числі зумовленого воєнними діями.

Відповідно, метою даного дослідження було отримати культуру волохатих коренів *R. pseudoacacia* шляхом *Agrobacterium rhizogenes*-опосередкованої трансформації для подальшого дослідження їх здатності до фіторемедіації.

Насіння *R. pseudoacacia* L. промивали у мильному розчині (приблизно 15 хв), потім стерилізували у 70% розчині етанолу протягом 1 хв, надалі — в 50% розчині  $H_2O_2$  протягом 10 хв та культивували на середовищі Мурасіге-Скруга (MS) [6], за температури +22-24 °С.

Для *Agrobacterium*-опосередкованої генетичної трансформації використовували штам А4 *Agrobacterium rhizogenes*, люб'язно наданий Інститутом клітинної біології та генетичної інженерії НАН України. Нічну бактеріальну культуру отримували у м'ясо-пептонному бульйоні на шейкер-інкубаторі при температурі +28 °С та 200 об./хв. Надалі бактеріальні клітини осаджували центрифугуванням (4000 об./хв), та ресуспендували у рідкому середовищі MS з додаванням 200 мкМ ацетосирингону. Агробактеріальну трансформацію стеблових експлантів проводили шляхом співкультивування з бактеріальною культурою. За добу інокульовані експланти перенесли на тверде середовище MS із додаванням 400 мг/л антибіотика цефотаксиму для елімінації бактерії, де отриману культуру пасажували кожні 2 тижні.



**Рис.1.** Рослини акації в умовах *in vitro*

Ініціацію *Ri*-різогенезу на середовищі MS з додаванням 400 мг/л антибіотика цефотаксиму спостерігали приблизно на другий тиждень. Частоту генетичної трансформації визначали як співвідношення кількості точок ініціації *ri*-різогенезу до загальної кількості експлантів. Вона складала 29,6% у наших дослідженнях. Попри наші сподівання, збільшення тривалості культивування під час трансформації рослинних експлантів з суспензійною бактеріальною культурою призводило до зниження частоти трансформації внаслідок підвищення відсотка некротизації рослинних тканин.

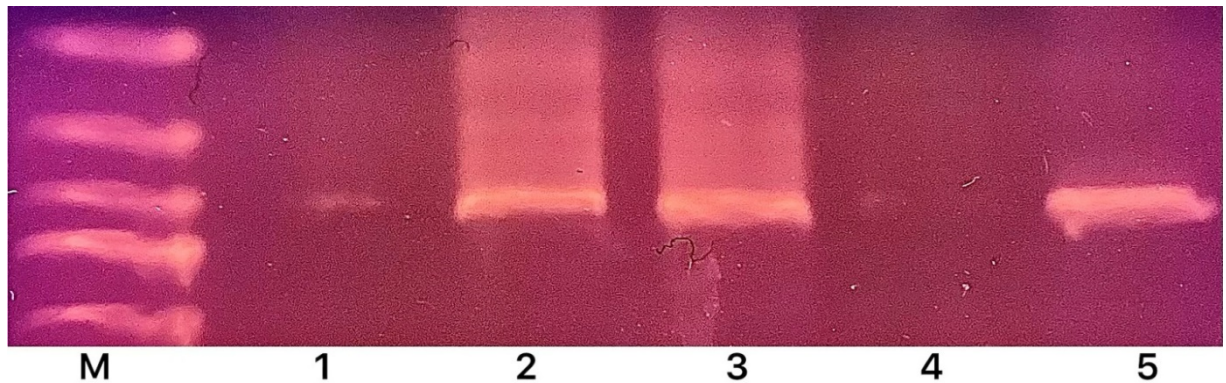


**Рис. 2.** Ініціація *Ri*-коренетворення на стеблових експлантах

Утворені корені на стеблових експлантах характеризувалися *Ri*-фенотипом (відсутністю геотропізму та характерною опушеністю), але спершу активна ініціація коренетворення надалі сповільнювалася, приріст біомаси був відносно невисоким, через що ініційовану культуру коренів переносили на середовище Гамборга (B5) [6] із додаванням 400 мг/л цефотаксиму та вдавалися до зміни температурного режиму та умов освітлення. Проте жодні зміни умов культивування не призвели до активізації темпів накопичення біомаси, можливо, внаслідок

видових особливостей розвитку культури коренів *Robinia pseudoacacia* L.

Тотальну рослинну ДНК екстрагували згідно Doyle J.L. та Doyle J.J. [8]. Присутність *rolB* гену підтверджували за допомогою аналізу методом ПЛР (розмір фрагмента 780 п.н., нуклеотидна послідовність праймерів: 5'-atggatcccaaatgctattcctccacga-3', 5'-ttaggctcttctctcaggtttactgcagc-3'). Продукти реакції фракціонували в 1% агарозному гелі у присутності бромистого етидію в трис-боратній буферній системі. ПЛР-аналіз дозволив виявити присутність агробактеріального *rolB* гену у досліджуваних зразках, що підтверджує трансгенну природу отриманої кореневої культури.



**Рис.3.** Електрофореграма ПЛР-аналізу на присутність *rolB* гену:

*M* – Маркер (2 kb Plus DNA Ladder, Fermentas); *1* – негативний контроль (проба без ДНК); *2,5* – позитивний контроль (плазмідна ДНК *Agrobacterium rhizogenes* A4); *3,4* – ДНК аналізованих зразків культури «волохатих» коренів.

Таким чином, було отримано культуру «волохатих» коренів рослин *R. pseudoacacia* L. та підтверджено їх трансгенне походження. В подальшому нами планується проведення досліджень фіторемедіаційної здатності отриманих культур.

### Література

1. M. Skarjinskaia *et al.* Hairy Roots as a Vaccine Production and Delivery System. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* Vol. 134, pp 115-134, 2013, DOI: 10.1007/10\_2013\_184
2. M. I. Georgiev, A. I. Pavlov, T. Bley Hairy root type plant in vitro systems as sources of bioactive substances. *Appl Microbiol Biotechnol.* Vol. 74, pp. 1175–1185, 2007, DOI 10.1007/s00253-007-0856-5
3. E. Agostini, M.A. Talano, P.S. González, *et al.* Application of hairy roots for phytoremediation: what makes them an interesting tool for this purpose? *Appl Microbiol Biotechnol* Vol. 97, pp.1017–1030, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4658-z>
4. M. Fan, Enhanced phytoremediation of *Robinia pseudoacacia* in heavy metal-contaminated soils with rhizobia and the associated bacterial community structure and function, *Chemosphere.* Vol.197, pp.729-740, 2018, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.01.102>
5. Наказ №695/39751 від 05/05/2023 Міністерство захисту довкілля та природних ресурсів України
6. T. Murashige, F. Skoog A revised medium for rapid growth than bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant,* Vol.15, №3, pp. 473– 97, 1962.
7. O. Gamborg, R. Miller, and K. Ojimi, Nutrient Requirements of Suspension Cultures of Soybean Root Cells. *Experimental Cell Research,* Vol.50, pp.151-158, 1968, doi: 10.1016/0014-4827(68)90403-5
8. J.J. Doyle, J.L. Doyle Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus,* №12, pp.13-15, 1990.