

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА  
«ІНСТИТУТ ХАРЧОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА ГЕНОМІКИ  
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ»**

**БУЗІАШВІЛІ АНАСТАСІЯ ЮРІЇВНА**



УДК 633.85: 581.1+581.4: 58.084.

**ОТРИМАННЯ ГЕНЕТИЧНО МОДИФІКОВАНИХ РОСЛИН  
РОДИНИ SOLANACEAE З ГЕНОМ ЛАКТОФЕРИНУ ЛЮДИНИ  
ДЛЯ ПІДВИЩЕННЯ ЇХ СТІЙКОСТІ ДО ФІТОПАТОГЕНІВ**

03.00.20 – біотехнологія

**АВТОРЕФЕРАТ**  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Київ – 2021

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у відділі клітинної біології та біотехнології Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України»

**Науковий керівник:** доктор біологічних наук, професор,  
член-кореспондент НАН України  
**Ємець Алла Іванівна,**  
ДУ «Інститут харчової  
біотехнології та геноміки НАН України»,  
завідувач відділу клітинної біології  
та біотехнології

**Офіційні опоненти:** доктор біологічних наук, старший науковий  
співробітник  
**Циганкова Вікторія Анатоліївна,**  
Інститут біоорганічної хімії  
та нафтохімії імені В.П.Кухаря НАН України,  
провідний науковий співробітник відділу хімії  
біоактивних азотовмісних гетероциклічних основ

доктор сільськогосподарських наук, доцент  
**Коломієць Юлія Василівна,**  
Національний університет біоресурсів і  
природокористування України,  
декан факультету захисту рослин, біотехнологій та  
екології

Захист відбудеться 06 квітня 2021 року о 14:00 годині на засіданні спеціалізованої  
вченої ради Д 26.254.01 ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН  
України» за адресою: 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а.  
Тел/факс: (044) 463 15 31, e-mail: d26.254.01@ukr.net

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці ДУ «Інститут харчової біотехнології  
та геноміки НАН України» за адресою: 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а.

Автореферат розіслано 05 березня 2021 року.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради, к.б.н., доц.



Н.Л. Пастухова

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Обґрунтування вибору теми дослідження.** Протягом останніх років в усьому світі і в Україні, зокрема, спостерігають загальносвітові тенденції змін клімату – підвищення середньорічної температури та зменшення кількості опадів, що сприяє інтенсивному розвитку в міжвегетаційний період шкідників та фітопатогенних мікроорганізмів (McDonald & Stukenbrock, 2016). Неконтрольоване використання хімікатів для обробки рослин з метою запобігання їх зараження хворобами та недотримання умов зберігання врожаю також сприяють зміні генетичної структури популяції фітопатогенів та збільшенню їх агресивності (Чередниченко, 2012).

В Україні протягом останнього десятиліття найбільш розповсюдженими та шкодочинними грибними хворобами, що заражають томати (*Lycopersicon esculentum* Mill. або *Solanum lycopersicum* L.) та картоплю (*Solanum lycopersicum* L.), є фітофтороз та фузаріоз, збудниками яких є *Phytophthora infestans* та *Fusarium spp.* Elan-sky et al., 2015; Федорчук, 2017; Шотик та ін., 2014; Сергієнко, 2012; Тимошук, 2013; Тарасенко та Чечітко, 2006). Серед збудників бактеріальних хвороб томатів, найбільш розповсюдженими на території України є *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Xanthomonas vesicatoria* та *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Kolomiec & Avetisyan, 2014; Kolomiets et al., 2017a, 2017b, 2019a, 2019b; Коломієць та ін., 2014, 2016, 2017; Аветисян та ін., 2014). Картоплю найчастіше заражають бактеріальні патогени *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *Pectobacterium* sp., *Dickeya* sp (Бородай та Парфенюк, 2018). Також, надзвичайно важливим патогеном, що заражає більшість представників родини Пасльонових та завдає значних економічних збитків, є *Ralstonia solanacearum*. В Україні, даний патоген є карантинним мікроорганізмом (Грицай та Варбанець, 2012).

Враховуючи вищезазначене, надзвичайно актуальною проблемою є створення нових сортів томатів та картоплі, стійких до широкого спектру фітопатогенів. Так, в роботі (Шотик та ін., 2014) протягом 2010-2014 років було досліджено стійкість до фітопатогенів більш ніж 10 тис. сортів томатів, і в результаті виявлено, що понад 75,4% сортів були високочутливими до грибних хвороб. Крім того, більшість виробників картоплі в Україні використовує для садіння несертифікований матеріал багаторічних репродукцій, значною мірою уражений вірусами, бактеріями і грибами (Чередниченко, 2012, 2013). Отже, отримання нових сортів томатів та картоплі, зокрема і вітчизняних, стійких до захворювань, що викликають дані патогени, є важливим завданням на сьогоднішній день.

Використання методів генної інженерії рослин як альтернативного підходу до традиційної селекції та застосування пестицидів може забезпечити комплексну довготривалу стійкість до бактеріальних, грибних та вірусних фітопатогенів. Раніше було встановлено, що перенесення генів, які забезпечують стійкість до фітопатогенів, зокрема, гена лактоферину людини, до рослинного генома може бути одним з перспективних методів захисту рослин від хвороб (Bruce, 2012; Ceasar & Ignacimuthu, 2012; Grant et al., 2013; Rommens & Kishore, 2000; Strange & Scott, 2005; Yemets et al., 2014). Лактоферин – це  $Fe^{3+}$ -зв'язуючий білок із родини трансферинів, який міститься у великій кількості у молоці та секреторних рідинах ссавців. Лактоферин є компонентом неспецифічного природного імунітету людини, оскільки проявляє протизапальну, протиракову, противірусну, бактерицидну, фунгістатичну та ін. активності (Stefanova et al., 2008; Yemets et al., 2014; Lakshman et al., 2013). Слід зазна-

чити, що рослинні трансфериноподібні білки (TF-like proteins) на сьогоднішній день були виявлені лише у деяких видах *Chlorophyta* (*Chlorella variabilis*), *Pteridophyta* (*Selaginella moellendorffii*) та *Angiospermae* (*Glycine max*, *Theobroma cacao*, *Medicago truncatula* та *Citrus clementina*) (Lina et al., 2016).

У попередніх дослідженнях було показано антибактеріальні властивості рекомбінантного лактоферину чи його фрагментів, отриманого у результаті експресії в трансгенних рослинах тютюну (Mitra & Zhang, 1994; Zhang et al., 1998; Fukuta et al., 2012; Chahardoli et al., 2018), люцерни (Stefanova et al., 2013), груші (Malnoy et al., 2003), томату (Lee et al., 2002), рису (Takase et al., 2005), а також фунгіцидну активність у результаті експресії в трансгенних рослинах тютюну (Fukuta et al., 2012; Nguyen et al., 2011), рису (Takase et al., 2005), пшениці (Han et al., 2012), арабідопсицу (Nguyen et al., 2011), тощо.

Отже, отримання рослин томатів (*Lycopersicon esculentum*) та картоплі (*Solanum tuberosum*) з геном лактоферину людини є актуальним завданням, оскільки його експресія може підвищити стійкість трансгенних ліній даних рослин до найбільш поширених та небезпечних фітопатогенів бактеріальної та грибної природи, зокрема, *Phytophthora infestans*, збудника фітофторозу томатів та картоплі, *Fusarium sam-bucinum*, збудника сухої гнилі картоплі, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, що спричиняє бактеріальний рак томатів, *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*, що є збудником кільцевої гнилі картоплі, та *Ralstonia solanacearum*, що спричиняє бактеріальне в'янення томатів та буру гніль картоплі. Саме на вирішення цього питання і була спрямована дана робота.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота була виконана за фінансової підтримки проекту «Застосування гена лактоферину для створення стійких до фітопатогенів ліній рослин родини Solanaceae» цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Молекулярні та клітинні біотехнології для потреб медицини, промисловості та сільського господарства» (номер державної реєстрації – 0115U005021, 2015-2019 рр.).

**Мета і завдання дослідження.** Метою роботи було отримання генетично модифікованих ліній рослин родини Solanaceae, зокрема, картоплі та томатів, з геном лактоферину людини (*hLf*), підтвердження інтеграції цього гена в геном досліджуваних рослин та його експресії за допомогою молекулярно-генетичних та біохімічних методів, оцінка морфологічних показників трансгенних рослин та їх стійкості до збудників бактеріальних та грибних хвороб.

У відповідності до поставленої мети, до завдань експериментальної роботи входило:

1) Введення в культуру *in vitro* рослин томату сортів Money Maker, Лагідний і Перлина, а також аналіз впливу різних комбінацій фітогормонів у складі живильних середовищ на морфогенетичний потенціал їх експлантів.

2) *Agrobacterium*-опосередкована трансформація картоплі сортів Вернісаж, Світанок Київський, Левада та Зарево, томатів сортів Money Maker та Лагідний геном *hLf* та селекція трансгенних ліній рослин.

3) Молекулярно-генетичний аналіз трансгенних ліній картоплі сортів Вернісаж, Світанок Київський, Левада та Зарево та томатів сортів Money Maker та Лагідний для підтвердження інтеграції гена *hLf* в геноми досліджуваних рослин.

4) Біохімічний аналіз трансгенних ліній томатів та картоплі для підтвердження експресії лактоферину в цих рослинах і визначення вмісту цього білка в трансгенних рослинах томатів та картоплі.

5) Дослідження антибактеріальної та фунгіцидної активності зразків трансгенних ліній картоплі та томатів, що експресують лактоферин, до бактеріальних (*C. michiganensis*, *R. solanacearum*) та грибних (*P. infestans*, *F. sambucinum*) фітопатогенів за допомогою біотестів.

6) Аналіз стійкості трансгенних рослин картоплі та томатів до зараження *P. infestans* та *F. sambucinum* в умовах *in vitro*.

**Об'єкт дослідження.** Генетично модифіковані рослини картоплі та томату та їх стійкість до фітопатогенів.

**Предмет дослідження.** Перенесення гена лактоферину людини (*hLf*) в рослини томату (*L. esculentum*) та картоплі (*S. tuberosum*) для підвищення їх стійкості до фітопатогенів бактеріального та грибного походження.

**Методи дослідження.** Методи культури тканин і органів рослин *in vitro*, генетична трансформація за допомогою *A. tumefaciens*, молекулярно-генетичний аналіз (полімеразна ланцюгова реакція), біохімічний аналіз (Вестерн блот гібридизація), методи культури бактеріальних клітин та міцелію грибів *in vitro*, метод дифузії в агар, метод зараження *in vitro* інтактних стерильних рослин та тканин конідіями *Phytophthora infestans* та *Fusarium sambucinum*, методи статистичного аналізу.

**Наукова новизна отриманих результатів.** Розроблено методику введення в культуру *in vitro* сортів томату Лагідний та Перлина та досліджено їх морфогенетичний потенціал. За допомогою *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації отримано генетично модифіковані лінії томатів сортів Money Maker та Лагідний та картоплі сортів Вернісаж, Світанок Київський, Зарево та Левада, що експресують ген лактоферину людини. Вперше продемонстровано антибактеріальний ефект зразків (соку), отриманих із трансгенних рослин картоплі, що експресують лактоферин, на фітопатогенні бактерії *R. solanacearum* (збудник бактеріального в'янення томатів та бурої гнилі картоплі) та *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* (збудник кільцевої гнилі картоплі). Вперше встановлено, що зразки трансгенних ліній томатів з геном *hLf* проявляють антибактеріальну дію до *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (збудник бактеріального раку томатів). Вперше показано фунгістатичний ефект зразків трансгенних ліній картоплі та томатів, що експресують лактоферин, на *P. infestans*, а також зразків трансгенних ліній картоплі на *F. sambucinum*, який є збудником сухої гнилі бульб картоплі. Також, в умовах зараження *in vitro* рослин та тканин вперше показано підвищення стійкості трансгенних ліній картоплі та томатів, що експресують *hLf*, до *P. infestans*, та трансгенних ліній картоплі до *F. sambucinum*.

**Практичне значення одержаних результатів.** Отримані в даній роботі трансгенні рослини томату та картоплі, що експресують ген лактоферину людини, є стійкими до небезпечних фітопатогенних бактерій (*R. solanacearum*, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*) та грибів (*P. infestans*, *F. sambucinum*) і можуть бути використані у селекційній роботі та подальших наукових дослідженнях. Результати даної роботи вказують на перспективність генетичної трансформації цінних рослинних культур геном лактоферину людини для підвищення їх стійкості до широкого спектру фітопатогенів.

**Особистий внесок здобувача.** Постановку наукових завдань досліджень, наступну інтерпретацію отриманих результатів та розробку структури дисертаційної

роботи було здійснено спільно з науковим керівником. Основні дослідження – отримання трансгенних ліній рослин, їх молекулярно-генетичний аналіз та біотести на стійкість до фітопатогенів було проведено автором особисто. Біохімічний аналіз отриманих ліній рослин було здійснено разом із співавторами публікацій.

**Апробація результатів дисертації.** Результати досліджень було апробовано на IX Всеукраїнській конференції молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (Київ, Україна, 2015 р.), XI Міжнародній науковій конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів» (Одеса, Україна, 2016 р.), XV Міжнародній науковій конференції «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки» (Київ, Україна, 2017 р.), Третій конференції молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія» (Київ, Україна, 2017 р.), Міжнародній конференції молодих вчених «Сучасні проблеми мікробіології та біотехнології» (Одеса, Україна, 2017 р.), IV Міжнародному симпозіумі Євразійського біорізноманіття (Київ, Україна, 2018 р.), V Міжнародній науковій конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Фундаментальні та прикладні дослідження в біології та екології» (Вінниця, Україна, 2018 р.), VI з'їзді Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом (Яремче, Україна, 2019 р.), XIV Міжнародній науковій конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів» (Київ, Україна, 2019 р.), XVIII Міжнародній науковій конференції «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки» (Київ, Україна, 2020 р.), XIV Всеукраїнській конференції молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (Київ, Україна, 2020 р.), V Міжнародній науковій конференції «Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології» (Дніпро, Україна, 2020 р.).

**Публікації.** За результатами роботи опубліковано 15 наукових праць, в тому числі 2 статті у міжнародних наукових журналах, 3 статті у вітчизняних фахових виданнях, та 10 тез у матеріалах наукових конференцій, симпозіумів та з'їздів.

**Структура і обсяг дисертації.** Дисертація викладена на 170 сторінках друкованого тексту та складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень, їх аналізу та обговорення, висновків, списку використаних джерел, який містить 291 посилання, додатку. Дисертаційна робота містить 25 рисунків, 2 таблиці.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ ДИСЕРТАЦІЇ

В огляді літератури охарактеризовано біотехнологічні підходи щодо покращення характеристик томатів та картоплі, окреслено особливості культивування *in vitro* вказаних видів рослин, описано найбільш небезпечні фітопатогени, які вражають томати та картоплю. Також, охарактеризовано структуру та біологічну активність білка лактоферину та узагальнено результати попередніх досліджень із трансформації генами лактоферину різних видів рослин з метою підвищення їх стійкості до хвороб.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

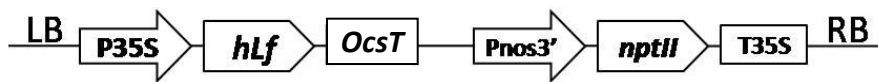
У дослідженнях було використано асептичні рослини 4-х сортів картоплі української селекції – Вернісаж, Світанок Київський, Левада та Зарево, люб'язно надані Інститутом картоплярства НААН України. Також було використано українські сорти томатів Лагідний та Перлина та модельний сорт Money Maker. Як фітопатогени використовували штами бактерій *Ralstonia solanacearum* ATCC 11696 (Yabuuchi et

al., 1992), *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Ac-1996, *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* Ac-1995, та гриба *Fusarium sambucinum* F-52211 (Подгорський і др., 2007) із колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології та вірусології ім. акад. Д.К. Заболотного НАН України. Ізолят *P. infestans* високовірулентної раси 1.2.3.4.5.6.6+0.7.8.9.10.11 хуз (Ткачик, 2014) було люб'язно надано Інститутом картоплярства НАН України.

Введення в культуру *in vitro* томатів сортів Лагідний, Перлина та Money Maker здійснювали за методикою, описаною у (Танасієнко та ін., 2014). Як експланти використовували сім'ядольні листки, гіпокотилі, листові диски та міжвузля пагонів. Тестували різні комбінації цитокінінів та ауксинів, зокрема БАП, зеатин, 2,4-Д, НОК, ІОК в концентраціях 0,1-4 мг/л на морфогенетичний потенціал досліджуваних сортів в умовах *in vitro* та частоту регенерації пагонів з різних типів експлантів. Частоту регенерації пагонів визначали через 30 діб після початку експерименту як співвідношення кількості експлантів, на яких відбувалась регенерація пагонів, до загальної кількості висаджених експлантів, помножене на 100%. Мікроклональне розмноження, пре- та кокультивування рослин томатів (під час генетичної трансформації) проводили на середовищі МСТ, до складу якого входило 4,3 г/л макро- та мікросолей Мурасіге-Скуга (Murashige & Skoog, 1962), 0,5 мг/л піридоксину, 0,5 мг/л нікотинової кислоти, 1 мг/л тіаміну, 2 мг/л гліцину, 100 мг/л міо-інозиту, 30 г/л сахарози, 8 г/л агару, рН 5.7. Мікроклональне розмноження картоплі здійснювали на середовищі МСК (4,3 мг/л мікро- та макро-солей МС, 0,8 мг/л піридоксину, 2 мг/л тіаміну, 5 г/л сахарози, 8 г/л агару, рН 5.7) (Жук та ін., 2009).

Фітопатогенні бактерії та гриби вирощували на середовищі КДА (картопляно-декстрозний агар) (Thomas et al., 1998), до складу якого входило 200 г/л картоплі, 20 г/л декстрози та 15 г/л агару. Штам *A. tumefaciens* ЕНА105, що ніс плазмідний вектор pBin35LF, вирощували на середовищі LB (Sambrook et al., 2012) із додаванням 15 г/л агару, 100 мг/л канаміцину та 50 мг/л рифампіцину.

Трансформацію рослин томатів та картоплі здійснювали за використання супервірулентного штаму *A. tumefaciens* ЕНА 105, який ніс плазмідний вектор pBin35LF, що містив ген лактоферину людини (*hLf*) під контролем 35S промотора вірусу мозаїки цвітної капусти (CaMV35S), а також ген неоміціофосфотрансферази II (*nptII*), що забезпечує стійкість до канаміцину (Танасієнко та ін., 2014) (Рис. 1).



**Рис. 1.** Схема Т-ДНК бінарної плазмиди pBin35LF: LB та RB – ліва та права

границі Т-ДНК, P35S – промотор вірусу мозаїки цвітної капусти; *hLf* – ген лактоферину людини, OcsT – октопіновий термінатор, Pnos – промотор нопалінсинтетази, *nptII* – ген неоміціофосфотрансферази II; T35S – термінатор вірусу мозаїки цвітної капусти.

Трансформацію картоплі здійснювали за наступною методикою. Як експланти використовували міжвузля пагонів, що містили 1-2 бічні бруньки. В кожному експерименті використовували по 30-60 експлантів. Інокуляцію експлантів нічною культурою агробактерії ( $OD_{600}=0.6$ ), яку вирощували при 28°C у середовищі LB у присутності 100 мг/л канаміцину, 50 мг/л рифампіцину, проводили протягом 30 хв із додаванням 0.15 мМ ацетосирингону, після чого експланти кокультивували з агробакте-

рією на середовищі МСК-К (4,3 г/л мікро- та макросолей МС, 0,5 мг/л піридоксину, 0,5 мг/л нікотинової кислота, 1 мг/л тіаміну, 2 мг/л гліцину, 100 мг/л міо-інозиту, 0,5 мг/л БАП, 0,25 мг/л 2,4-Д, 30 г/л сахарози, 8 г/л агару, рН 5.7), протягом 16 год при 28°C. Селекцію трансгенних ліній здійснювали протягом 3 місяців на середовищі МСК-С1 із додаванням 100 мг/л канаміцину, 600 мг/л цефотаксиму. Частоту трансформації картоплі визначали як співвідношення кількості експлантів, на яких утворювались пагони в умовах селективного тиску, до загальної кількості експлантів, взятих для трансформації, помножене на 100% (Jeroen et al., 1993). Після селекції стійкі до канаміцину рослини мікроклонально розмножували для їх подальшого молекулярно-генетичного (ПЛР) та біохімічного аналізу (Вестерн блот гібридизація) задля підтвердження стабільної інтеграції гена *hLf* в їх геном та експресії лактоферину.

Трансформацію томатів проводили за методикою, аналогічною до трансформації картоплі. Як експланти використовували сім'ядольні листки, які виділяли із 10-12-денних проростків та прекультивували протягом 24 год на середовищі МСТ. Далі експланти інокулювали нічною культурою агробактерії ( $OD_{600}=0.6$ ) протягом 20 хв з додаванням 0.15 мМ ацетосирингону та кокультивували протягом 16 год при 28°C. Селекцію трансгенних ліній проводили протягом 3 місяців на середовищі МСТ-С (склад якого був аналогічний до середовища МСТ, але із додаванням 1 мг/л зеатину, 1 мг/л ІОК, 100 мг/л канаміцину, 600 мг/л цефотаксиму). Після 3 місяців селекції визначали частоту трансформації як співвідношення кількості експлантів, на яких регенерували пагони в умовах селективного тиску, до загальної кількості експлантів, які були взяті для трансформації, помножене на 100%. Регенеровані пагони переносили на середовище МСТ-Р, яке було аналогічного складу до середовища МСТ, але доповнене 600 мг/л цефотаксима, та культивували протягом 1 місяця для подальшого росту та розвитку рослин. Далі трансформовані лінії мікроклонально розмножували на середовищі МСТ для ПЛР-аналізу та Вестерн блот гібридизації. Адаптацію трансгенних рослин *in vivo* проводили в стерильному ґрунті в умовах теплиці.

Ізолювання геномної ДНК здійснювали за допомогою методу ЦТАБ (Rogers & Bendick, 1985) із незначними модифікаціями. Плазмідну ДНК ізолювали за допомогою методу лужного лізису (Sambrook et al., 2012). Концентрацію ДНК визначали спектрофотометрично за використання біофотометра Eppendorf (США). Для ПЛР використовували зразки із концентрацією ДНК 1 мг/мл. Для підтвердження інтеграції гена *hLf* в геном трансформованих ліній картоплі та томатів проводили ПЛР-аналіз із праймерами, специфічними до гена лактоферину людини: *GL-F* (5'-TGTCTTCSTCGTCCSTGCTGTTCC-3') та *GL-R* (5'-CATACTCGTCCSTTTCAGC-STCG-3'). Ампліфікацію здійснювали за таких умов: первинна денатурація протягом 3 хв при 94°C; 45 циклів по 30 с при 94°C, 30 с при 62°C, та 1 хв при 72°C; остаточний синтез протягом 7 хв при 72°C. ПЛР-аналіз проводили в об'ємі 25 мкл. До складу реакційної суміші входили: 5x буфер для Таq-полімерази, 50–100 нг геномної ДНК, 0.2 мкМ кожного праймера, 200 мкМ кожного дНТФ, та 0.5 U Таq-ДНК-полімерази (Fermentas, Литва) (Tanasienko et al., 2011). ПЛР проводили за використання ампліфікатора PCR Applied Biosystem 2720 (США). Продукти реакції розділяли за допомогою електрофорезу в 1%-му агарозному гелі у присутності етидіум броміду, для визначення довжин фрагментів ДНК використовували маркер GeneRuler 100 bp Plus (ThermoScientific, США). Ефективність трансформації томатів та картоплі визначали як співвідношення кількості рослин із підтвердженою інтег-



рацією *hLf* в їх геном до загальної кількості трансформованих експлантів, помножене на 100%.

Для підтвердження експресії лактоферина в трансгенних лініях проводили Вестерн блот гібридизацію фракції тотального білка трансгенних рослин із використанням специфічних моноклональних антитіл проти лактоферину. Тотальний білок ізолювали відповідно до методики (Mitra & Zhang, 1994) із незначними модифікаціями. Для ізолювання фракції тотального білка використовували буфер для екстракції, до складу входило 50 мМ Трис-НСІ (рН 6.5), 1 мМ ЕДТА, 100 мМ NaCl, 0.1% Triton X-100 (Rachmawati et al., 2005) та суміш інгібіторів протеаз (P9599, Sigma-Aldrich, США) у концентрації 10 мкл/мл. Концентрацію тотального білка у зразках вимірювали згідно (Bradford, 1976). Як позитивний контроль використовували бичачий лактоферин (L9507, Sigma-Aldrich, США). Для визначення молекулярної маси білків використовували маркер PageRuler™ Prestained Protein Ladder (ThermoFisher Scientific, США). Зразки розділяли за допомогою електрофорезу в 12%-му поліакриламідному гелі в денатуруючих умовах (Laemmli, 1970) та переносили на нітроцелюлозну мембрану (RPN3032D, GE Healthcare, Mickleton, США) за використання апарату Bio-Rad Criterion™ Blotter (Bio-Rad, США) при 250 мА. Як первинні використовували моноклональні кролячі антитіла проти лактоферину (Merck Millipore, CA, США) (1:15000) та вторинні анти-кролячі антитіла кози, кон'юговані із пероксидазою хрому (A4914, Sigma-Aldrich, США), які розводили (1:5000) у буфері TBS-T (20 мМ Трис-НСІ, 15 мМ NaCl, 0.1% Triton X-100, рН 8.0). Сигнал посиленої хемілюмінесценції фіксували після інкубування мембрани із ECL буфером (0,1М Трис-НСІ, рН 8,5, 250 мМ люмінола, 90 мМ кумарової кислоти, 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) за використання апарату ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad, США). Результати Вестерн блот гібридизації аналізували за допомогою програмного забезпечення ImageLab™ 2.0.

Визначення бактеріцидної та фунгістатичної активності зразків, отриманих з трансгенних рослин картоплі та томату, проводили відповідно до методики (Chahardoli et al., 2015) із незначними модифікаціями. Зразки отримували із 1 г рослинного матеріалу (пагонів та листя), стерилізували крізь нітроцелюлозні фільтри (0,45 мкм) та одразу використовували для аналізу (Onuoha & Alisa, 2013). Комерційний лактоферин (Jarrow Formulas, США) розчиняли у воді та аналізували у концентраціях 0.02-2 мг/мл. Культури бактерій у рідкому середовищі LB доводили до оптичної щільності OD<sub>600</sub> = 0.1, і 100 мкл суспензії, що містила 10<sup>8</sup> КУО, інокулювали на чашках Петрі діаметром 9 см із середовищем КДА. На середовищі розміщували диски стерильного фільтрувального паперу діаметром 5 мм, на які наносили по 20 мкл зразків трансгенних та контрольних рослин та комерційний лактоферин (позитивний контроль). Після інкубування бактерій протягом 16 год при 28°C, вимірювали радіус зон затримки росту навколо дисків з досліджуваними зразками.

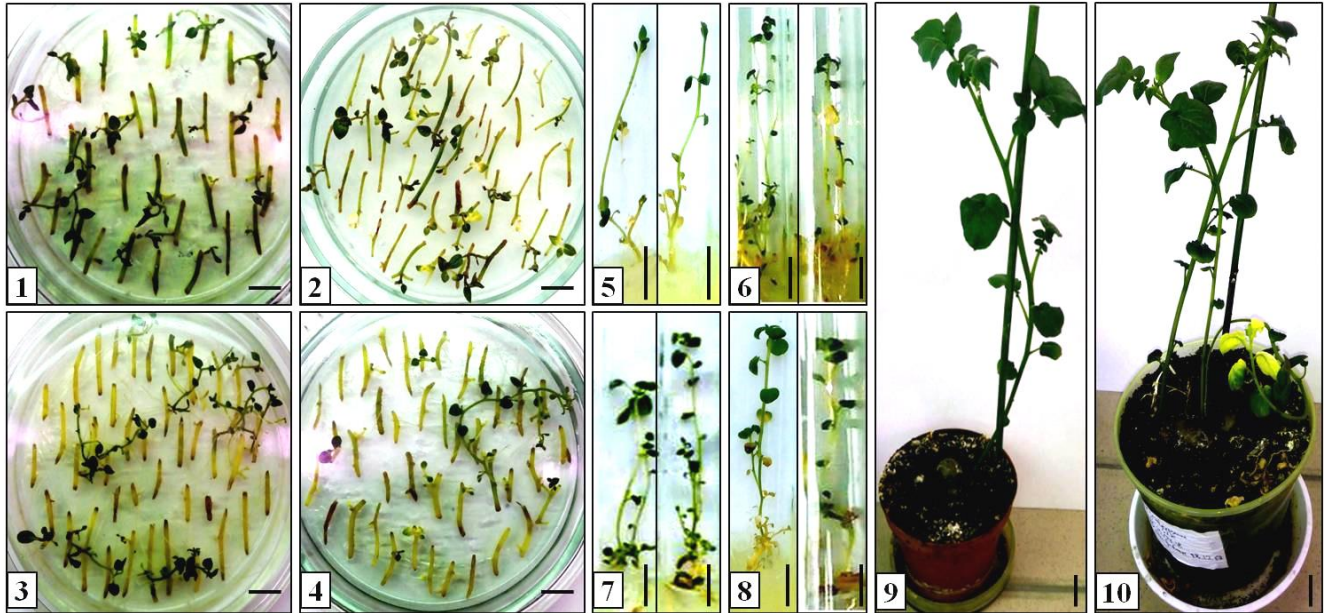
Вплив свіжоізолюваних зразків (соку) трансгенних рослин на *P. infestans* та *F. sambucinum* визначали за методикою, описаною у (Han et al., 2012) з деякими модифікаціями. Для проведення тесту «дифузії в агар» у чашках Петрі (d=9 см) із середовищем КДА вирізали циліндричні лунки (d=5 мм), в які вносили по 100 мкл зразків трансгенних та контрольних рослин, після чого по центру чашок Петрі розміщували диск агару із міцелієм *P. infestans* або *F. sambucinum*. Фунгістатичну активність зразків визначали через 10 днів інкубування міцелію при 28°C, оцінюючи затримку його росту та зниження інтенсивності утворення конідій навколо лунок із зразками.

Стійкість трансгенних рослин до фітофторозу та фузаріозу визначали із застосуванням методики зараження *in vitro* (Ткачик, 2014). В кожному дослідженні використовували по 10 трансгенних та контрольних рослин, зараження проводили за використання інокуляту із кількістю конідій  $3-3,5 \cdot 10^4$ /мл, які змивали стерильною дистильованою водою з культур *P. infestans* або *F. sambucinum*. Для виходу зооспор суспензію конідій витримували 4 год при 4°C, після чого на рослини наносили по 300 мкл інокуляту за допомогою обприскувача. Результати зараження оцінювали на 1-у, 4-у та 8-у добу експеримента. Стійкість трансгенних та контрольних ліній оцінювали за 9-бальною шкалою, за якою 9 балам відповідає відсутність ураження, 8 балам – відсутність симптомів на стеблах та поодинокі плями на 5% листків, 6-7 балам – відсутність симптомів на стеблах та ушкодження від 5 до 25% листків, 4-5 балам – ознаки в'янення та плями некрозу вкривають більш ніж 25% стебел та 25-50% листків, 2-3 балам – в'янення та некроз покривають від 25 до 50% поверхні стебел та 50-75% листків, та 1 балу відповідає ушкодження більш ніж 75% поверхні всієї рослини. Також стійкість відокремлених листків томатів до *P. infestans* в умовах *in vitro* визначали відповідно до методики (Ткачик, 2014), з деякими змінами. Листки розміром 1,5-2 см відокремлювали від рослин, вирощених в умовах *in vitro*, та розміщували у чашках Петрі на 4 шарах фільтрувального паперу, змоченого стерильною дистильованою водою. На адаксіальну сторону листків наносили по 10 мкл інокуляту з кількістю конідій  $3-3,5 \cdot 10^4$ /мл або 10 мкл стерильної дистильованої води (негативний контроль). Частоту ураження відокремлених листків визначали через 8 діб як співвідношення кількості листків з вираженими некротичними плямами до загальної кількості заражених листків.

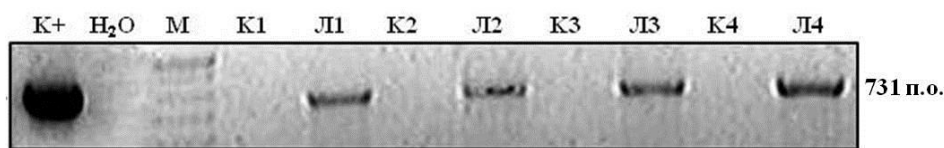
## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

**Отримання та аналіз трансгенних рослин *S. tuberosum*.** У результаті *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації та селекції на середовищі МСК-С1 (Рис. 2, 1-4), рослини висотою 2-3 см із темно-зеленим листям, повністю розвиненими стеблами та корінням відокремлювали від експлантів та переносили на середовище МСК-С2 (Рис. 2, 1-8), на якому рослини культивували протягом 2 місяців. Було встановлено, що частота трансформації картоплі за результатами селекції для сортів Вернісаж, Левада, Світанок Київський та Зарево становила 24,2, 30,2, 24,5 та 18,5%, відповідно. Відібрані лінії з нормальною морфологією, подібною до такої у контрольних (нетрансгенних) рослин, аналізували за використання метода ПЛР та Вестерн блоттингу для підтвердження стабільної інтеграції гена *hLf* в геном трансгенних рослин та його експресії (шляхом ідентифікації рекомбінантного білка лактоферина у тканинах досліджуваних рослин). За допомогою ПЛР було проаналізовано 44 лінії картоплі сорту Вернісаж, 26 ліній сорту Левада, 25 ліній сорту Світанок Київський та 16 ліній сорту Зарево, стійких до канаміцину. Інтеграцію гена *hLf* було виявлено у всіх 4-х сортів, використаних у дослідженні (Рис. 3). Таким чином, ефективність трансформації за результатами ПЛР становила 6,8, 3,8, 4 та 6,25% для сортів Вернісаж, Левада, Світанок Київський та Зарево, відповідно. Отримані в даній роботі показники ефективності трансформації аналогічні до тих, що були встановлені в інших роботах з генетичної трансформації картоплі, зокрема, у (Han et al., 2015) цей показник був на рівні 0,5-18,4%, у (Shin et al., 2011) - близько 1,2-10,7%.

Для підтвердження експресії лактоферину в трансгенних рослинах картоплі було проведено Вестерн блот, в результаті якого в трансгенних лініях, як і в позитивному контролі, було виявлено білок молекулярної маси близько 80 кДа, що відповідає лактоферину (Рис. 4, як це показано, зокрема, для трансгенної лінії сорту Зарево). За допомогою денситометричного аналізу було встановлено, що вміст лактоферину в трансгенних лініях картоплі, зокрема, для сорту Зарево (Рис. 4) становив близько 0,05% від загальної кількості тотального розчинного білка (ТРБ).

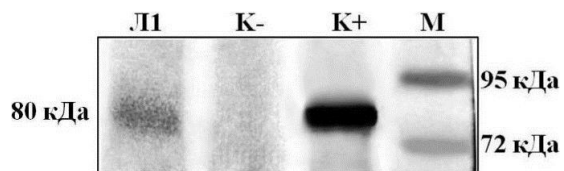


**Рис. 2.** Результати *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації експлантів картоплі геном *hLf*: 1-4 – експланти картоплі сортів Вернісаж, Світанок Київський, Левада та Зарево, відповідно, на середовищі МСК-С1 через 1 місяць після трансформації, 5-8 – трансформовані пагони картоплі сортів Вернісаж, Світанок Київський, Левада та Зарево на середовищі МСК-С2 через 3 місяці після трансформації, 9 – контрольна (нетрансгенна) рослина картоплі сорту Зарево, 10 – трансгенна рослина картоплі сорту Зарево *in vivo*. Масштабна позначка: 1-8 – 1,5 см; 9, 10 – 3 см.



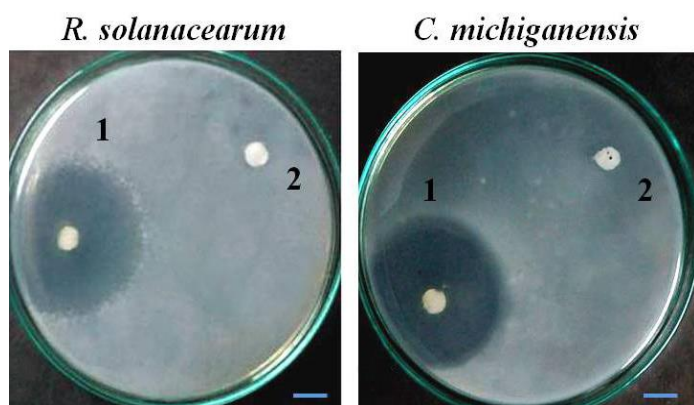
**Рис. 3.** Результати ПЛР-аналізу геномної ДНК картоплі за використання праймерів,

специфічних до гена *hLf*: К+ – позитивний контроль (плазміда рVin35LF), H<sub>2</sub>O – негативний контроль (вода), М – маркер довжин фрагментів ДНК, К1, К2, К3, К4 – контрольні (нетрансгенні) рослини, Л1, Л2, Л3, Л4 – трансгенні лінії (ампліфікований фрагмент гена *hLf* розміром 731 п.о.), К1, Л1 – сорт Вернісаж, К2, Л2 – сорт Левада, К3, Л3 – сорт Світанок Київський, К4, Л4 – сорт Зарево.

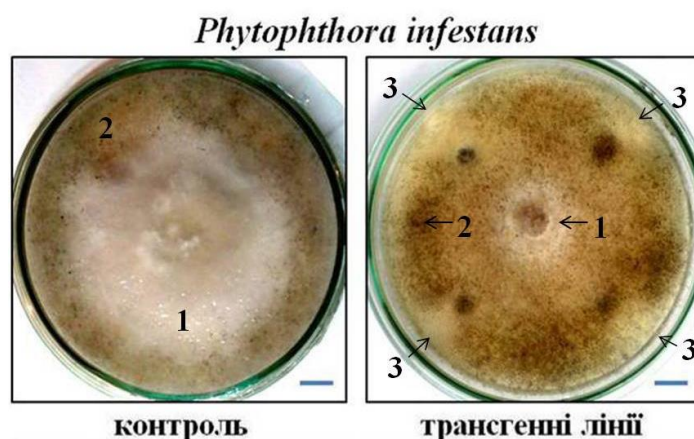


**Рис. 4.** Результат ідентифікації лактоферину за допомогою Вестерн блоттинга: Л1 – трансгенна лінія картоплі сорту Зарево, К – контрольна рослина, К+ – бичачий лактоферин (позитивний контроль), М – маркер молекулярної маси білків.

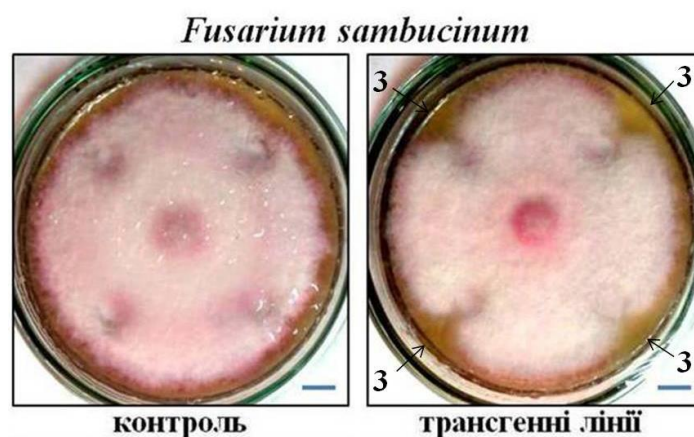
Хоча рівні експресії рекомбінантного лактоферину в різних видах трансгенних рослин суттєво відрізняються (Yemets et al., 2014), і вміст лактоферину може бути вищим, ніж в нашому дослідженні, наразі відома лише одна робота з генетичної трансформації картоплі геном *hLf* під контролем 2-х різних типів промоторів (поширеного 35S та *mas P2* промотора) (Chong & Langridge, 2000), в якій вміст рекомбінантного лактоферина було визначено на рівні 0,01% та 0,1% (залежно від типу промотора, відповідно) від загальної кількості тотального розчинного білка. В інших трансгенних лініях картоплі сортів Вернісаж, Левада та Світанок Київський вміст лактоферину був аналогічний (на рівні 0,04-0,05% від ТРБ). Лінії, в яких було підтверджено експресію лактоферину, були успішно адаптовані до умов *in vivo* та мали морфологію, аналогічну до контрольних рослин (Рис. 2, 9-10).



**Рис. 5.** Антибактеріальний ефект зразків контрольних та трансгенних ліній картоплі сорта Зарево на бактерії *R. solanacearum* та *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*: 1 – трансгенна лінія, що експресує ген *hLf*, 2 – контроль (нетрансгенна лінія). Масштабна позначка: 1 см.



**Рис. 6.** Фунгістатичний вплив зразків трансгенних та контрольних ліній картоплі сорту Зарево на *P. infestans* та *F. sambucinum*. 1 – міцелій *P. infestans*, 2 – конідії *P. infestans*, 3 – зони інгібування росту. Масштабна позначка: 1 см



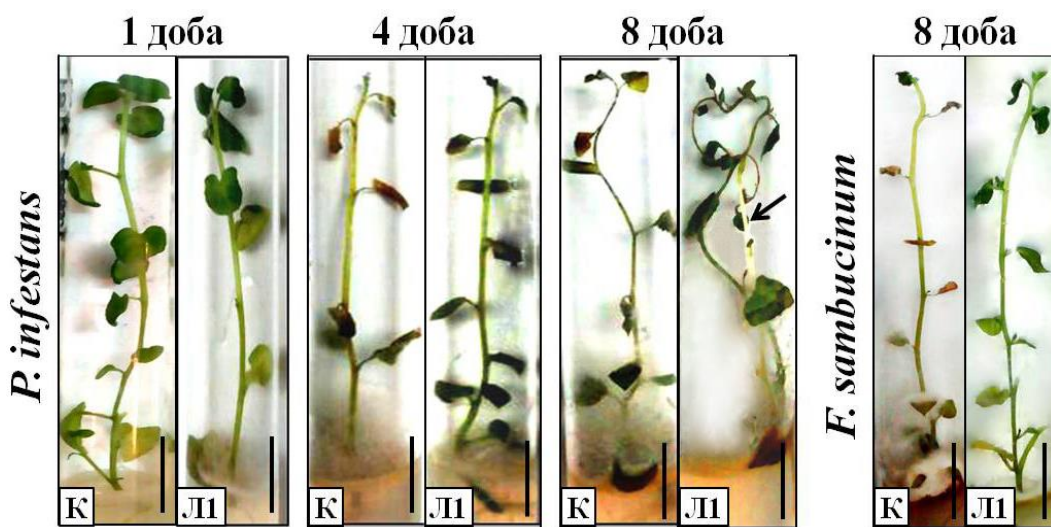
Для перевірки стійкості трансгенних ліній картоплі до фітопатогенів проводили тест «дифузії в агар». В результаті було встановлено, що свіжоізолювані зразки трансгенних рослин картоплі інгібують ріст фітопатогенних бактерій *R. solanacearum* штаму АТСС 11696 та *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* штаму Ас-1996, що можна пояснити наявністю в них рекомбінантного лактоферина, в той час як зразки контрольних рослин не мали впливу на ріст бактерій (Рис. 5).

В роботі (Chong & Lahgridge, 2000) також було отримано трансгенні лінії картоплі з геном *hLf* і показано антибактеріальну активність тотальної фракції білка, виділеного із їх бульб, проти 3 видів бактерій умовно-патогенних для людини

(*E. coli*, *S. aureus*, *S. paratyphi*). В нашій роботі було виявлено, що зразки, отримані із трансгенних ліній картоплі, інгібують ріст фітопатогенних бактерій *C.michiganensis* та *R. solanacearum*, а отже, лінії картоплі із геном *hLf* можуть мати підвищену стійкість до хвороб, спричинених даними бактеріями, в умовах *in vivo*.

Також, за результатами тесту «дифузії в агар» показано фунгістатичний вплив зразків трансгенних рослин, який проявлявся в затримці росту міцелію *P. infestans* та *F. sambucinum* біля лунок у середовищі КДА, в які їх вносили, що ймовірно є результатом впливу лактоферину, що міститься у зразках трансгенних рослин картоплі на відміну від зразків із контрольних рослин (Рис. 6).

У результаті аналізу стійкості до фітофторозу та фузаріозу трансгенних та контрольних ліній картоплі було виявлено, що, загалом, ті лінії, які експресують лактоферин, проявляють менш виражені симптоми фітофторозу та фузаріозу. Так, на 4-у добу після інокуляції, більш ніж 75% листя на контрольних рослинах зав'яло, і спостерігали інтенсивний ріст міцелію на живильному середовищі біля стебел контрольних рослин. В той же час на трансгенних рослинах лише 25-50% листя було ушкоджено, і розвитку міцелію біля основи стебла рослин не спостерігали (Рис. 7). На 8-у добу після зараження всі контрольні рослини в'янули та були повністю уражені грибом, тоді як ураження трансгенних рослин сягало лише 50-75%, а деякі рослини в умовах зараження продовжували рости та розвиватись (Рис. 7). Результати оцінки зараження *in vitro* свідчать про підвищення стійкості трансгенних рослин картоплі до 7 балів до *P. infestans* та до 7 балів до *F. sambucinum* за 9-бальною шкалою, тоді як для контрольних рослин ці показники були на рівні 1 та 2 балів, відповідно (Рис. 7).



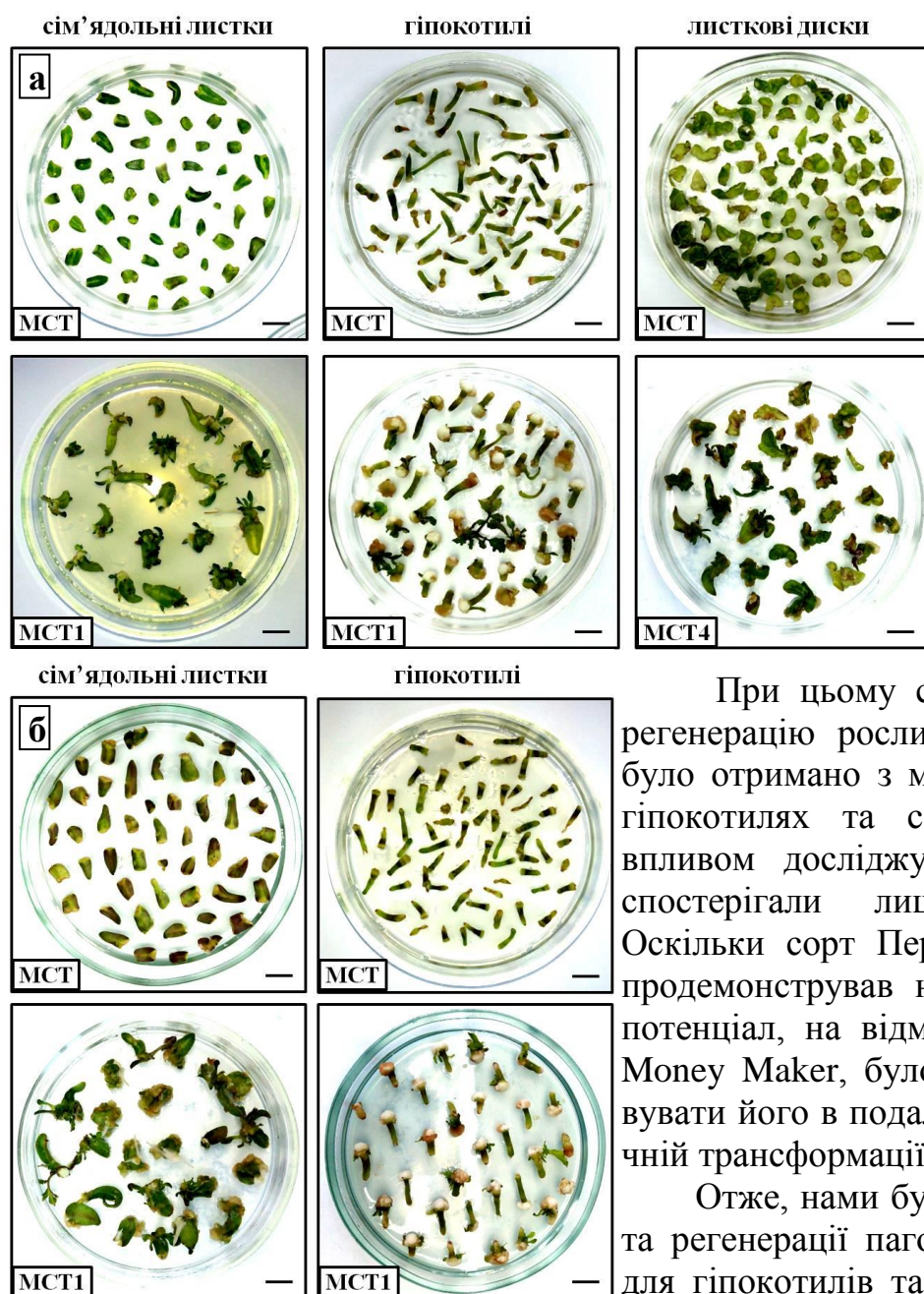
**Рис. 7.** Результати біотеста на чутливість картоплі сорта Зарево до *P. infestans* та *F. sambucinum* в умовах *in vitro*: К – контрольна лінія, Л1 – трансгенна лінія. Стрілка вказує на регенерований па-

гін, не ушкоджений *P. infestans*. Масштаб: 1,5 см.

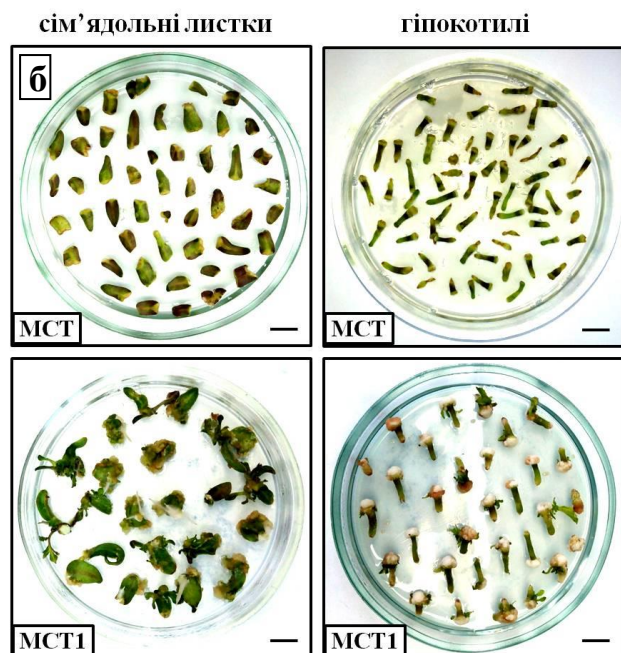
Фунгістатичну дію зразків трансгенних рослин *Nicotiana tabacum* та *Arabidopsis thaliana*, що експресують бичачий лактоферин (*bLf*), також було показано у (Nguyen et al., 2011) проти *Rhizoctonia solani*. В іншому дослідженні (Han et al., 2012) автори повідомляють про фунгістатичну активність зразків трансгенних рослин пшениці, що експресують рекомбінантний бичачий лактоферин *bLf*, проти *Fusarium graminearum*. В роботі (Fukuta et al., 2012) показано, що експресія бичачого лактоферицину підвищує стійкість трансгенних рослин тютюну до *Botrytis cinerea*. Отже, нами перше продемонстровано, що рослини картоплі, що експресують лактоферин

людини, мають підвищену стійкість до високовірулентних фітопатогенних грибів *P. infestans* та *F. sambucinum*.

**Введення в культуру *in vitro* та аналіз регенераційного потенціалу різних експлантів томатів сортів Перлина, Лагідний та Money Maker.** Перед проведенням дослідів по генетичній трансформації обраних сортів томатів геном лактоферину додатково було проведено дослідження по введенню в культуру *in vitro* сортів томатів Лагідний і Перлина та оцінці їх морфогенетичного потенціалу у порівнянні з модельним сортом Money Maker. У результаті було встановлено, що найбільш сприятливим для культивування *in vitro* та мікроклонального розмноження трьох досліджуваних сортів томатів є безгормональне живильне середовище МСТ. Ефективна регенерація пагонів відбувалась на гіпокотиліях та сім'ядольних листках на середовищі МСТ, що містило як фітогормони – 1 мг/л зеатину та 1 мг/л ІОК (Рис. 8).



**Рис. 8.** Результати впливу фітогормонів в живильних середовищах, зокрема 1 мг/л зеатину, 1 мг/л ІОК (МСТ1), а також 3 мг/л БАП, 0,1 мг/л ІОК (МСТ4) на регенерацію пагонів на різних типах експлантів *L. esculentum* в умовах *in vitro*: а – сорту Money Maker; б – сорту Лагідний; Масштабна позначка: 1 см.



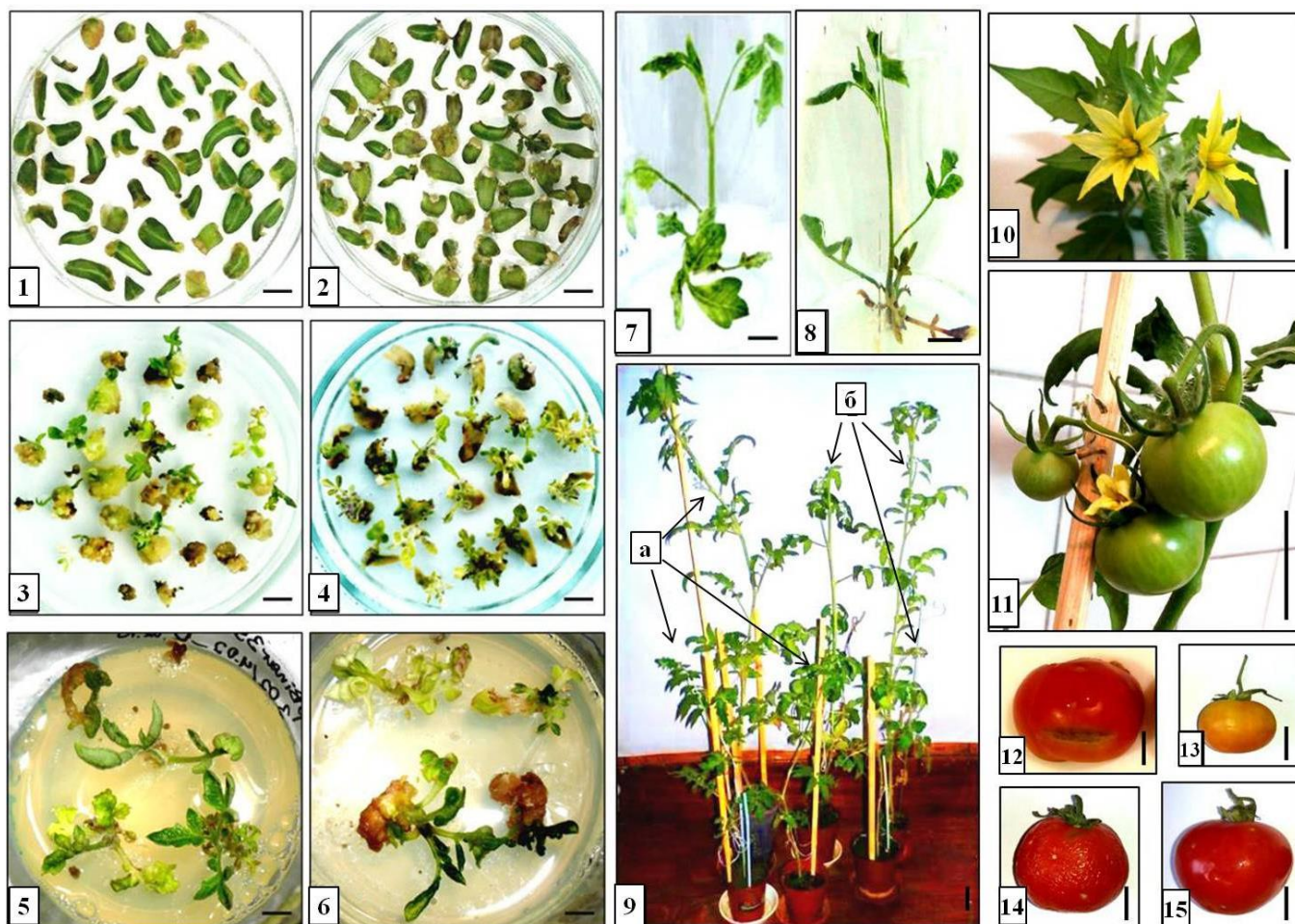
При цьому слід зазначити, що пряму регенерацію рослин томату сорту Перлина було отримано з міжвузлів, в той час як на гіпокотиліях та сім'ядольних листках під впливом досліджуваних регуляторів росту спостерігали лише утворення калюсу. Оскільки сорт Перлина в культурі *in vitro* продемонстрував низький морфогенетичний потенціал, на відміну від сорту Лагідний і Money Maker, було вирішено не використовувати його в подальших дослідях по генетичній трансформації геном лактоферину.

Отже, нами було встановлено, що частота регенерації пагонів становила 76 та 73% для гіпокотилів та сім'ядольних листків томату сорту Money Maker, і 65 та 40% для томату сорту Лагідний на середовищі МСТ1 (Рис. 8).

Цей результат підтверджують інші дослідження, спрямовані на підбір умов для ефективної регенерації *in vitro* рослин томату сорту Money Maker (Khan et al.,

2006; Chaudhry et al., 2010) – у цих роботах, у присутності 1 мг/л зеатину та 1 мг/л ІОК у складі живильного середовища частота регенерації досягала значення 69% для сім'ядольних листків. Отже, для подальшої трансформації томатів використовували сім'ядольні листки та живильне середовище МСТ1, доповнене 1 мг/л зеатину та 1 мг/л ІОК, оскільки показник частоти регенерації пагонів на даному типі експлантів був найвищим за використання саме такої комбінації фітогормонів.

**Отримання та аналіз трансгенних рослин *L. esculentum*.** Після проведення *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації томатів та селекції протягом 30 діб на експлантах утворювався переважно ембріогенний калюс (Рис. 9, 1-2).



**Рис. 9.** Регенерація пагонів на експлантах томатів сортів Лагідний (1, 3, 5, 7) та Money Maker (2, 4, 6, 8) в умовах *in vitro* на селективному середовищі, що містило 100 мг/л канаміцина, та вирощування *in vivo* регенованих рослин: 1, 2 – формування ембріогенного калюсу на експлантах через 1 місяць селекції, 3, 4 – експланти із регенованими пагонами через 3 місяці селекції, 5, 6 – регеновані пагони через 4 місяці селекції, 7, 8 – вигляд рослин через 1 місяць культивування на середовищі МСТ-Р, 9 – вирощування *in vivo* трансгенних (а) та контрольних (б) ліній томатів сортів Money Maker, 10, 11 – квіти та 30-добові плоди трансгенних ліній сорта Money Maker, 12, 13 – 60-добові плоди трансгенних ліній сорту Money Maker, 14, 15 – 60-добові плоди трансгенних ліній сорту Лагідний. Масштабна позначка: 1-8, 10-15 – 1 см, 9 – 3 см.

Протягом наступних 3-х місяців на калюсі утворювались пагони (Рис. 9, 3-6), які в подальшому відокремлювали і переносили на середовище МСТ-Р та мікроклонально розмножували на середовищі МСТ для проведення ПЛР-аналізу, Вестерн блоттингу, біотестів та вирощування *in vivo* (Рис. 9, 7-8). Трансгенні рослини, вирощені в умовах закритого ґрунту, мали морфологію, аналогічну до контрольних рослин (Рис. 9). Через 60 діб після цвітіння було отримано плоди та, відповідно, насіння F1 трансгенних ліній томату сорту Money Maker та Лагідний (Рис. 9, 10-15).

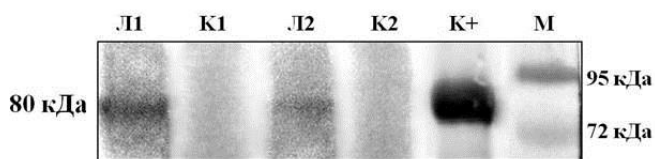
У результаті селекції було відібрано 35 ліній томатів сорту Money Maker та 27 – сорту Лагідний, стійких до канаміцину. За допомогою ПЛР-аналізу цих ліній було підтверджено інтеграцію гена *hLf* в геном рослин кожного з досліджуваних сортів (Рис. 10). Встановлено, що частота трансформації для сорту Money Maker була на рівні 8,1%, для сорту Лагідний – 2,5%, тоді як ефективність трансформації для сорту Лагідний становила 3,7 % і була дещо вищою, ніж для сорту Money Maker (2,8 %). Такі показники співставні з даними інших дослідників по трансформації томатів (Jeroen et al., 1993; Frary & Earle, 1996; Vříza et al., 2008; El-Siddig et al., 2009; Jabeen et al., 2009; Sharma et al., 2009; Saker et al., 2011).

Експресію лактоферину людини в трансгенних лініях (Л1 та Л2) обох сортів було підтверджено за використання Вестерн блот аналізу (Рис. 11). Також за допомогою денситометричного аналізу було виявлено, що вміст лактоферину у трансгенних рослинах становив 0.04% від тотального розчинного білка (8.3 мкг/г тканини) для сорту Лагідний та 0.02% (4.8 мкг/г тканини) для сорту Money Maker.



**Рис. 10.** Результати ПЛР-аналізу із праймерами, специфічними до *hLf*, для підтвердження

інтеграції гена *hLf* в геноми трансгенних рослин томатів сортів Money Maker (а) та Лагідний (б): М – маркер довжин ДНК, К+ – позитивний контроль (плазмід рBin35LF), ампліфікований фрагмент – 731 п.о.; Н<sub>2</sub>О – ампліфікація у відсутності ДНК (негативний контроль), К- – нетрансгенні лінії, Л1 – трансформовані лінії.

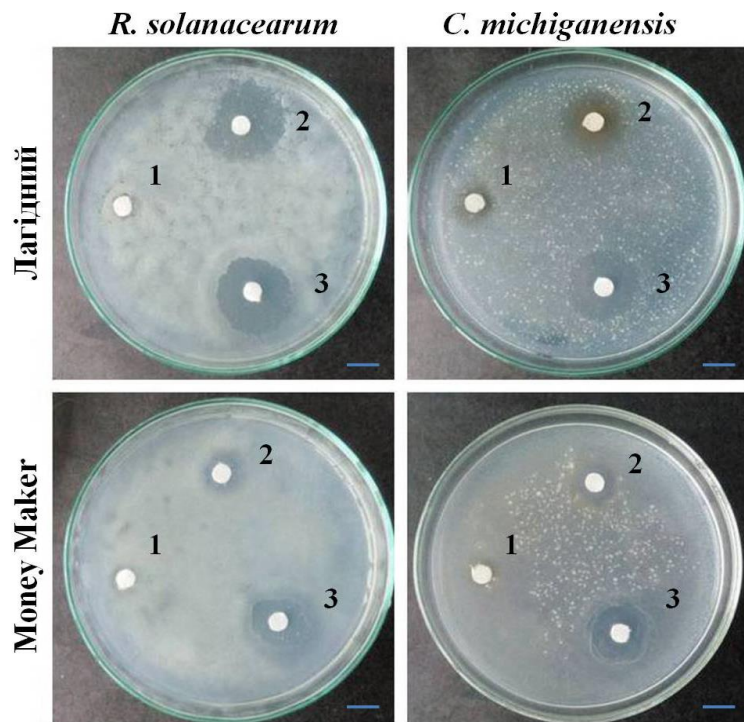


**Рис. 11.** Результати Вестерн блоттингу трансгенних ліній томатів сортів Лагідний та Money Maker за використання моноклональних антитіл проти лактоферину: Л1 – трансгенна лінія сорту Лагідний, К1 – нетрансгенна лінія сорту Лагідний, Л2 – трансгенна лінія сорту Money Maker, К2 – нетрансгенна лінія сорту Money Maker, К+ - бичачий лактоферин (позитивний контроль), М – маркер молекулярної маси білків.

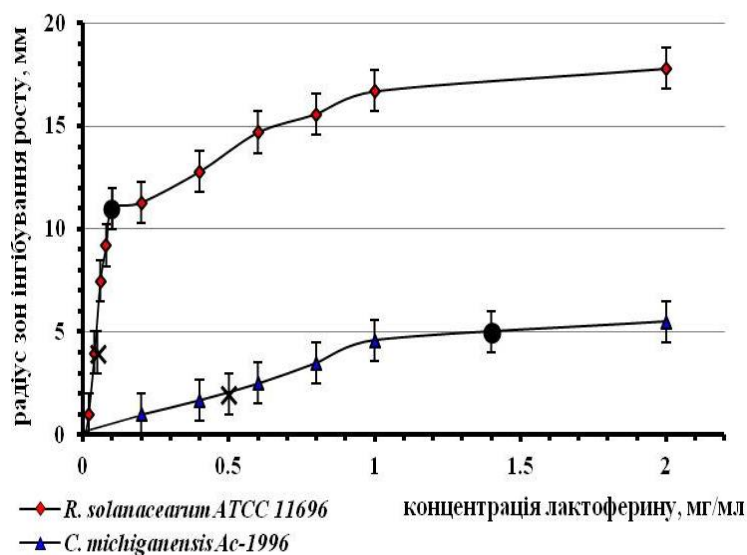
трансгенна лінія сорту Лагідний, Л2 – трансгенна лінія сорту Money Maker, К2 – нетрансгенна лінія сорту Money Maker, К+ - бичачий лактоферин (позитивний контроль), М – маркер молекулярної маси білків.

В попередніх дослідженнях з отримання трансгенних ліній люцерни, що експресують ген лактоферина людини, було показано нижчий рівень експресії лактоферину, зокрема вміст лактоферину в них становив 0,0035% та 0,0047% від ТРБ (Stefanova et al., 2013a), тоді, як зазначено вище в роботі (Chong & Langridge, 2000), в трансгенних рослинах картоплі вміст цього білка був на рівні 0,01% від ТРБ, що узгоджується з нашими даними.

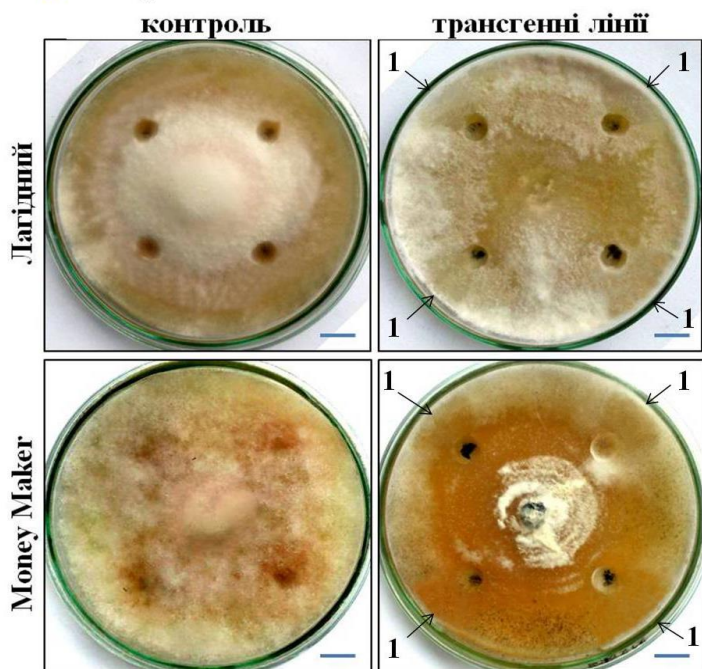




**Рис. 12.** Результати тестів «дифузії в агар», які показують антибактеріальну активність зразків, ізольованих із трансгенних ліній томатів сортів Лагідний та Money Maker, проти *R. solanacearum* ATCC 11696 та *C. michiganensis* Ac-1996: 1 – зразки із нетрансформованих рослин, 2 – зразки із трансгенних ліній із *hLf*, 3 – комерційний лактоферин, нанесений на диски. Масштабна позначка: 1 см.



**Рис. 13.** Радіуси зон інгібування росту на *R. solanacearum* ATCC 11696 та *C. michiganensis* Ac-1996 після інкубування протягом 16 год із різними концентраціями лактоферину на дисках. Круглі точки відповідають радіусам зон інгібування росту для зразків із рослин сорту Лагідний, що експресують лактоферин, «X»-образні точки – зразкам рослин трансгенної лінії сорту Money Maker.



**Рис. 14.** Фунгістатичний ефект зразків, отриманих з контрольних та трансгенних рослин томатів сортів Лагідний та Money Maker, що експресують *hLf*, на *P. infestans*: 1 – зони затримки росту міцелію. Масштабна позначка: 1 см.

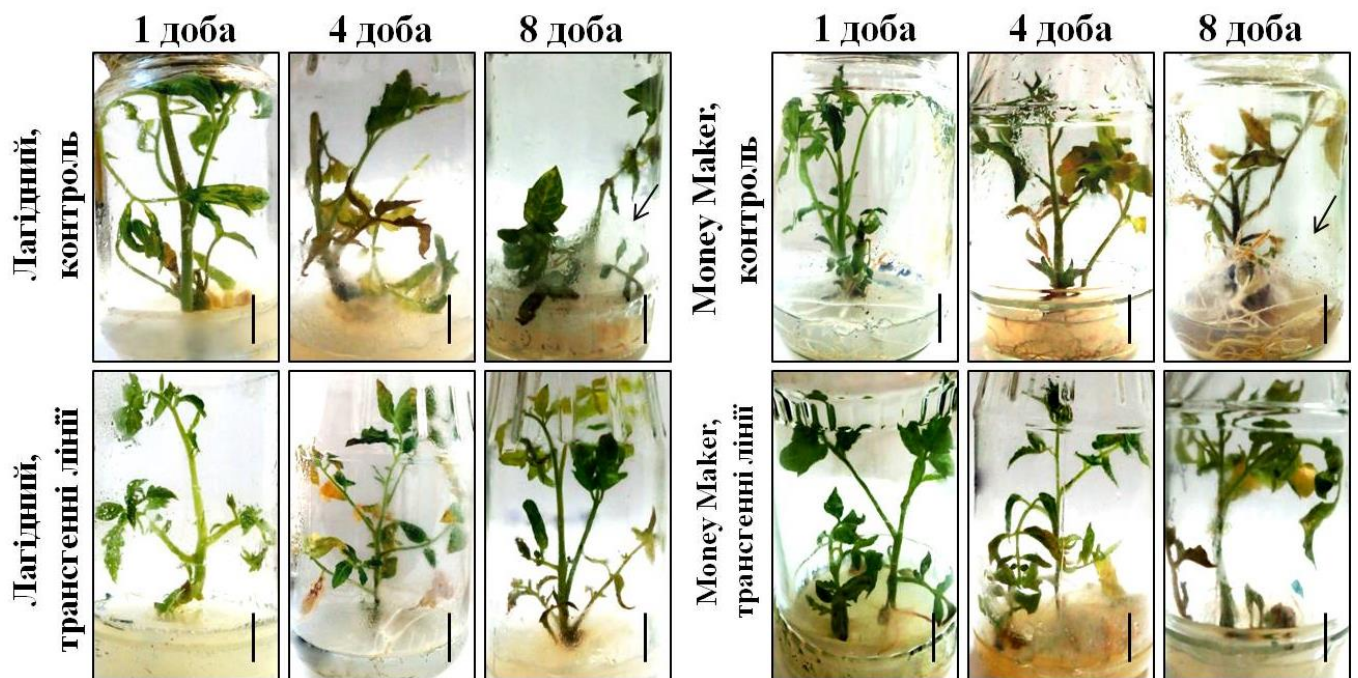
Ріст-інгібуючий вплив зразків трансгенних ліній томатів на фітопатогенні бактерії *R. solanacearum* (штаму ATCC 11696) та *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (Ac-1996), як і зразків із трансгенних ліній картоплі, досліджували за допомогою тесту «дифузії в агар».

Зони інгібування росту було виявлено навколо дисків із зразками, отриманих із трансгенних ліній томатів обох сортів. Більш того, було встановлено помітну кореляцію між інгібіторним ефектом на ріст бактерій та концентрацією лактоферину у зразках (Рис. 12, Рис. 13).

Відповідно до підрахунків, кількість лактоферину в 20 мкл свіжоізольованих зразків, нанесених на диски, становила близько 0.09- 0.12 мг/мл для сорту Лагідний та 0,04-0,05 мг/мл для сорту Money Maker – такі значення відповідають кількості комерційного лактоферину у контрольних зразках (Рис. 13).

Фунгістатичний вплив зразків трансгенних ліній томатів на ріст міцелію *P. infestans* також визначали за допомогою тесту «дифузії в агар» (Рис. 14). Було показано, що зразки контрольних рослин суттєво не впливають на ріст міцелію, в той час як зразки трансгенних рослин демонструють значний фунгістатичний ефект (Рис. 14), який проявлявся у затримці його росту та інгібування утворення конідій *P. infestans*.

У результаті аналізу стійкості до фітофторозу трансгенних ліній томатів, що експресують лактоферин людини, було показано, що на восьмий день після зараження рівень ушкодження контрольних рослин сягав більше ніж 75%, тоді як на трансгенних рослинах було ушкоджено лише близько 25% листків (Рис. 15); більш того, біля основи стебла контрольних рослин спостерігали інтенсивний розвиток



**Рис. 15.** Результати дослідження стійкості томатів сортів Лагідний та Money Maker до *P. infestans* в умовах *in vitro*. Стрілки вказують на міцелій *P. infestans*. Масштабна позначка: 1,5 см.

міцелію (Рис. 15). Отже, рівень стійкості ліній томатів сортів Money Maker та Лагідний, що експресують *hLf*, відповідає 7 балам за 9-бальною шкалою, а стійкість контрольних ліній може бути оцінена на рівні 1 балу. В інших дослідженнях (Nguyen et al., 2011; Nan et al., 2012) була показана здатність фракції тотального білка рослин *A. thaliana*, *N. tabacum* та *T. aestivum*, які експресують лактоферин, затримувати ріст інших видів фітопатогенних грибів (*Rhizoctonia solani*, *Fusarium graminearum*). Нами

вперше продемонстровано, що трансгенні рослини томатів, що експресують лактоферин, здатні пригнічувати ріст міцелію *P. infestans*.

Результати тесту на стійкість відокремлених листків томатів до *P. infestans* в умовах *in vitro* також показують підвищення стійкості трансгенних ліній до фітофторозу у порівнянні із контрольними рослинами. Так, частота прояву симптомів фітофторозу на листках трансгенних рослин томатів сортів Лагідний та Money Maker була нижчою, ніж на листках контрольних рослин, і становила 43% та 69% для сорту Лагідний, 55% та 75% – для сорту Money Maker, відповідно.

Отже, в нашій роботі було встановлено, що експресія гена лактоферина людини в трансгенних рослинах картоплі та томатів (Табл.1) значно підвищує їх стійкість до бактеріальних (*C. michiganensis* та *R. solanacearum*) та грибних (*P. infestans*, у випадку картоплі і до *F. sambucinum*) патогенів.

Таблиця 1

### Оцінка стійкості трансгенних та контрольних ліній томатів сортів Лагідний та Money Maker до бактеріальних та грибних патогенів

Рослини Патогени	Лагідний, контрольні	Лагідний, трансгенні	Money Maker, контрольні	Money Maker, трансгенні
<i>R. solanacearum</i>	-	+++	-	++
<i>C. michiganensis</i>	±	++	-	+
<i>P. infestans</i>	-	+	-	+

Рівень стійкості до фітопатогенів за результатами біотестів: для тесту «дифузії в агар» “-” – відсутність інгібування росту, “±” – зона інгібування росту розміром 1 мм, “+” – 2 мм, “++” – 4-5 мм, “+++” – 11 мм; для оцінки стійкості до *P. infestans* в умовах *in vitro* “-” – стійкість на рівні 1-2 балів за 9-бальною шкалою, “+” – стійкість на рівні 7 балів за 9-бальною шкалою.

Отримані результати вказують на перспективність застосування технологій перенесення гена лактоферину для підвищення стійкості культурних рослин до фітопатогенів.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі встановлено, що перенесення гена лактоферину людини в рослини картоплі та томатів за допомогою *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації з подальшою інтеграцією цього гена в геном та його експресією в отриманих трансгенних лініях призводить до прояву ними антибактеріальної і фунгістатичної активності до ряду фітопатогенних бактерій та грибів.

1. Встановлено, що на живильному середовищі МСТ, доповненому зеатином (1 мг/л) та ІОК (1 мг/л), ефективність регенерації пагонів томатів сортів Money Maker та Лагідний є максимальною та становить 40 та 65% для гіпокотилів та сім'ядольних листків томату сорту Лагідний, і 73 та 76% для гіпокотилів та сім'ядольних листків томату сорту Money Maker.

2. У результаті *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації отримано трансгенні лінії томатів та картоплі, при цьому частота трансформації томатів становила 8,1% для сорту Money Maker, 2,5% для сорту Лагідний, частота трансформації кар-

топлі - 24,2, 30,2, 24,5 та 18,5% для сортів Вернісаж, Левада, Світанок Київський та Зарево, відповідно.

3. За результатами ПЛР-аналізу підтверджено трансгенну природу відібраних ліній картоплі та томатів і встановлено, що ефективність трансформації становила: для томатів – 2,8% для сорту Money Maker та 3,7% для сорту Лагідний, для картоплі – 6,8, 3,8, 4 та 6,25% для сортів Вернісаж, Левада, Світанок Київський та Зарево.

4. За використання Вестерн блоту підтверджено наявність рекомбінантного лактоферину людини в досліджуваних трансгенних лініях томатів та картоплі та визначено його вміст на рівні 0,04% та 0,02% від тотального розчинного білка для томатів сортів Лагідний та Money Maker, та на рівні 0,05% для трансгенних ліній картоплі, зокрема, сорту Зарево.

5. Встановлено антибактеріальний та фунгістатичний вплив зразків соку, отриманого з тканин трансгенних ліній картоплі та томатів, зокрема на бактеріальні патогени *R. solanacearum* (ATCC 11696), *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (Ac-1996), *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Ac-1995) та грибний патоген *P. infestans*, а також на *F. sambucinum* (F-52211) у випадку трансгенних ліній картоплі.

6. Встановлено, що інгібіторний вплив зразків соку трансгенних рослин на досліджувані фітопатогени був подібним до впливу комерційного лактоферину у таких же концентраціях, що були визначені і в зразках трансгенних ліній.

7. У результаті зараження трансгенних рослин та листків томатів сортів Money Maker та Лагідний конідіями *P. infestans*, а також трансгенних рослин картоплі сорту Зарево конідіями *P. infestans* та *F. sambucinum* в умовах *in vitro* встановлено підвищення стійкості трансгенних рослин томатів та картоплі до фітофторозу і рослин картоплі до фузаріозу.

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ РОБІТ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Buziashvili AY**, Cherednichenko LM, Kropyvko SV, Blume YB, Yemets AI. Transgenic tomato lines expressing human lactoferrin show increased resistance to bacterial and fungal pathogens. *Biocatal. Agricult. Biotechnol.* 2020;25. (Q2). <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101602>. (Особистий внесок здобувача: проведення дослідження, аналіз експериментальних даних, написання статті).
2. **Buziashvili AY**, Cherednichenko LM, Kropyvko SV, Blume YB, Yemets AI. Obtaining transgenic potato plants expressing the human lactoferrin gene and analysis of their resistance to phytopathogens. *Cytol. Genet.* 2020;54(3):179–188. (Q4). <https://doi.org/10.3103/S0095452720030020>. (Особистий внесок здобувача: проведення дослідження, аналіз експериментальних даних, написання статті).
3. **Бузіашвілі АЮ**, Ємець АІ. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація українських сортів картоплі та томату геном лактоферину людини. *Доповіді НАН України.* 2018;10:88-94. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2018.10.088>. (Особистий внесок здобувача: проведення дослідження, аналіз експериментальних даних, написання статті).
4. **Бузіашвілі АЮ**, Чередниченко ЛМ, Кропивко СВ, Ємець АІ. Лінії томатів, які експресують ген лактоферину людини, характеризуються стійкістю до фітофторозу. *Доповіді НАН України.* 2020;5:95–102. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2020.05.095>. (Особистий внесок здобувача: проведення дослідження, аналіз експериментальних даних, написання статті).

5. **Бузіашвілі АЮ**, Ємець АІ. Аналіз впливу різних комбінацій регуляторів росту на регенерацію пагонів цінних сортів *Lycopersicon esculentum* Mill. в умовах *in vitro*. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2016;19:88–91. (Особистий внесок здобувача: проведення дослідження, аналіз експериментальних даних, написання статті).
6. **Buziashvili AY**, Yemets AI. *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato with human lactoferrin gene. Abstracts of the I International Conference for Young Scientists, September 21-25, Kyiv. 2015, p. 111.
7. **Buziashvili AY**, Yemets AI. Determination of the most favourable nutrient medium composition for *in vitro* cultivation and direct plantlet regeneration of tomato variety Perlyna. Abstracts of the XV International Conference of Students and Young Scientists «Shevchenkivska vesna: Bioscience Advances», April 18-21 Kyiv. 2017, p. 9.
8. **Бузіашвілі АЮ**, Ємець АІ. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація томата сорту Лагідний для підвищення його стійкості проти фітопатогенів. Збірник тез доповідей III Міжнародної наукової конференції молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія», 16-18 травня Київ. 2017, с. 63
9. **Buziashvili AY**, Yemets AI. Establishment *in vitro* culture and plantlet regeneration of tomato cultivar Perlyna. Abstracts of the International Conference of Young Scientists «Modern problems of Microbiology and Biotechnology», June 20-24 Odesa. 2017, p. 11-17.
10. **Buziashvili AY**, Yemets AI. Obtaining of phytopathogen-resistant tomato and potato plants with human lactoferrin gene. Abstracts of the 4th International Symposium on Euroasian Biodiversity. July 3-6 Kyiv. 2018, p. 12.
11. **Бузіашвілі АЮ**, Ємець АІ. Антибактеріальна активність екстракту трансгенних рослин томату, що експресують ген лактоферину людини. Збірник тез доповідей V Міжнародної наукової конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Фундаментальні та прикладні дослідження в біології та екології», 7-8 листопада Вінниця. 2018, с. 73.
12. Yemets AI, **Buziashvili AY**. Lactoferrin expression as a tool for the enhancement of non-specific plant pathogen resistance. Abstracts of the VI Ukrainian Congress for Cell Biology with International Representation, June 18-21 Yaremche. 2019, p. 124.
13. **Buziashvili AY**, Cherednichenko LM, Kropyvko SV, Yemets AI. Transgenic expression of human lactoferrin in potato plants enhance their resistance to fungal pathogens. Abstracts of the XVIII International Conference of Students and Young Scientists «Shevchenkivska vesna: Bioscience Advances», May 2 Kyiv. 2020, p. 7-11
14. **Buziashvili AY**, Cherednichenko LM, Kropyvko SV, Yemets AI. Expression of human lactoferrin in transgenic tomato lines enhance their resistance to bacterial and fungal phytopathogens. Abstracts of the XIV All-Ukrainian Conference of Young Scientists IMBG, 27-28 May Kyiv. 2020, p. 4.
15. **Бузіашвілі АЮ**, Ємець АІ. Експресія лактоферину людини в трансгенних рослинах томатів та картоплі підвищує їх стійкість до фітопатогенів. Збірник тез доповідей V міжнародної наукової конференції «Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології», 1-2 жовтня Дніпро. 2020, с. 63.

## АНОТАЦІЯ

**Бузіашвілі А.Ю. Отримання генетично модифікованих рослин родини Solanaceae з геном лактоферину людини для підвищення їх стійкості до фітопатогенів.** – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», Київ, 2021.

В дисертаційній роботі показано перспективність застосування генетичної трансформації рослин томатів та картоплі геном лактоферина людини (*hLf*) для підвищення їх стійкості до бактеріальних (*Ralstonia solanacearum*, *Clavibacter michiganensis*) та грибних (*Phytophthora infestans*, *Fusarium sambucinum* – у випадку картоплі) фітопатогенів. Трансформацію томатів сортів Money Maker та Лагідний, картоплі сортів Вернісаж, Світанок Київський, Левада та Зарево проводили *Agrobacterium*-опосередкованим методом за використання штаму *A. tumefaciens* ЕНА105, який ніс плазмідний вектор pBin35Lf, що містив ген *hLf* під контролем 35 S промотора вірусу мозаїки цвітної капусти (CaMV35S), а також ген *nptII*, що забезпечує стійкість до канаміцину. Селекцію трансгенних ліній томатів та картоплі проводили на живильному середовищі в присутності 100 мг/л канаміцину. Інтеграцію гена *hLf* підтверджували за допомогою ПЛР-аналізу із використанням праймерів, специфічних до даного гена. Експресію лактоферина людини в трансгенних лініях підтверджували за допомогою Вестерн блот аналізу із використанням специфічних моноклональних антитіл проти лактоферину. За допомогою біотесту «дифузії в агар» було показано, що зразки трансгенних рослин, які експресували лактоферин, інгібують ріст бактерій та грибів. В результаті біотестів, які проводили шляхом зараження трансгенних рослин томатів та картоплі конідіями *P. infestans*, картоплі – *F. sambucinum*, було встановлено підвищення стійкості трансгенних ліній до фітофторозу з 1 до 7 балів, до фузаріозу – з 2 до 7 балів за 9-бальною шкалою. Результати даної роботи вказують на перспективність трансформації цінних сортів томатів та картоплі геном лактоферину людини для підвищення їх стійкості до фітопатогенів бактеріальної та грибної природи.

**Ключові слова:** *Lycopersicon esculentum*, *Solanum tuberosum*, ген лактоферина людини, трансгенні рослини, *Clavibacter michiganensis*, *Ralstonia solanacearum*, *Phytophthora infestans*, *Fusarium sambucinum*.

## SUMMARY

**Buziashvili A.Yu. Obtaining of genetically modified plants of Solanaceae family with the human lactoferrin gene to enhance their resistance to phytopathogens.** – Manuscript.

Thesis for the degree of Candidate of Biological Sciences on a specialty 03.00.20 – Biotechnology. – Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2021.

The study presents the opportunity of the use of genetic transformation of important crops, tomato and potato, with human lactoferrin gene (*hLf*) to increase their resistance to bacterial (*Ralstonia solanacearum*, *Clavibacter michiganensis*) and fungal (*Phytophthora infestans*, *Fusarium sambucinum*) phytopathogens. Transformation of tomato cultivars Money Maker and Lahidny and potato cultivars Vernisage, Svitanok Kyivskyi, Levada and Zarevo was carried out with the use of *Agrobacterium*-mediated method. For that *A. tumefaciens* strain EHA105 carrying pBin35Lf plasmid vector containing *hLf* gene under control of 35S promotor of cauliflower mosaic virus (CaMV35S), and also *nptII* gene conferring resistance to kanamycin was used. Selection of transgenic tomato and potato lines was carried out on the medium supplemented with 100 mg/l kanamycin. Integration of *hLf* gene was confirmed by PCR analysis with primers specific to this gene. Expression of lactoferrin protein in transgenic lines was confirmed using Western blot analysis with the use of specific monoclonal antibodies against lactoferrin. The inhibition of bacterial and fungal growth after treatment with the samples from transgenic plants was shown with the use of agar diffusion assay. With the use of inoculation of transgenic tomato and potato plants with conidia of *P. infestans*, potato plants – with conidia of *F. sambucinum* the increase of the resistance of transgenic lines to late blight was established from 1 to 7 points, and to dry rot – from 2 to 7 points of 9-point scale. The results of the present work show the advantages of the genetic transformation of the valuable tomato and potato cultivars with human lactoferrin gene to enhance their resistance to bacterial and fungal phytopathogens.

**Key words:** *Lycopersicon esculentum*, *Solanum tuberosum*, human lactoferrin gene, transgenic plants, *Clavibacter michiganensis*, *Ralstonia solanacearum*, *Phytophthora infestans*, *Fusarium sambucinum*.

Підписано до друку 01.03.2021 р. Зам. № 88.  
Формат 60x84 1/16. Папір офсетний. Друк – цифровий.  
Наклад 100 прим. Ум. друк. арк. 0,9.  
Друк ЦП «КОМПРИНТ». Свідоцтво ДК №4131 від 04.08.2011 р.  
м. Київ, вул. Предславинська, 28  
095-941-84-99, 067-209-54-30  
email: komprint@ukr.net