

*Annotation*

**Yertayeva B., Ligay G.**

***Biotechnological processes in the solution of the problem of stability of potatoes to *Fusarium solani****

*The biotechnological methods allowing in vitro to conduct selection and genetic researches of potatoes on stability to *Fusarium solani* are considered. Data on use of a cultural filtrate of *Fusarium solani* are provided as the selective agent in a nutrient medium at cultivation of suspension culture of potatoes, identification of stability of cultural plants on an infectious background of in vitro.*

**Keywords:** *potatoes, pathogen, *Fusarium solani*, stability*

UDC 633.63:57.085.2

**O.L. KLYACHENKO**, Cand. Sc. (Biology), associate professor

**A.F. LIKHANOV**, Cand. Sc. (Biology), associate professor

**S.A. KRYLOVSKA**, teaching assistant

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine,

E-mail: krylovskaya.sv@mail.ru

**PECULIARITIES OF TRITERPENE SAPONINS AND PHENOLICS COMPOSITION IN LEAVES OF DIFFERENT SUGAR BEET (*BETA VULGARIS* L.) GENOTYPES IN VITRO CULTURE**

*The results of studies on the composition of triterpene saponins and phenolic compounds in sort, di- and triploid hybrids of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) are represented. It was shown that triterpene saponins can be markers of productivity and adaptive capacity of plants.*

**Keywords:** *triterpenoid saponins, phenolic substances, in vitro culture, sugar beet*

**Introduction.** In the rapidly changing climate, irregular rainfalls and prolonged droughts, the study of plant resistance mechanisms to abiotic stresses becomes more urgent.

Significant role in the metabolic processes regulation, as well as the development of adaptive and protective reactions of plants belongs to saponins. The role of triterpene glycosides in plants is various and underinvestigated. They have strong surface-active properties, increase the activity of certain enzymes and have antioxidant function. It is also known about antiviral and fungicidal function of saponins, which generally determines their essential role in general nonspecific resistance system formation in plants [2].

Sugar beet contains saponins of triterpenoid type. Derivatives of oleanolic acid are included into the structure of sugar beet aglycone saponins. Their allocation in tissues of sugar beet vegetative organs is unequal. The largest number of sugar beet saponins concentrated in the outer part of a beet-root, but a relatively large amount of triterpene glycosides is also found in leaves [3]

Taking into account the important role of secondary metabolites in the adaptation responses implementation, the aim of our research was investigation of characteristics of phenolic compounds and triterpene glycosides in tissues of sugar beet vegetative organs in vitro culture and to establish the possible relationship of their synthesis with adaptive capacity and the productivity of different sort and hybrids of the Ukrainian selection.

**Materials and methods.** In investigation diploid sort Yaltushkiivskiy single-seeded 64, diploid hybrids Ukrainskiy MS 70, Uladovo-Verhnyatskiy MS 37, Uladovo-Veselopodolyanskiy MS 84, Atamansha and triploid hybrid Alexandriya were used. Plant regenerants were cultivated on the modified Murashige-Skoog [9] medium supplemented 1 mg/l thiamine, 1 mg/l glutamine, 0.2 mg/l 6-benzylaminopurine, 0.5 mg/l naphthaleneacetic acid, 0.1 mg/l indoleacetic acid, 2 mg/l gibberelic acid [1].

Identification of secondary metabolites in plant regenerants tissues was made by TLC method, using plates with the size 100×150 mm, sorbent – Kiesegel 60 F254 (Merck) were used. For the phenol carbonic acids and flavonoids identification were used the next solvent systems: chloroform - methanol - water (70 : 30 : 4) and chloroform - glacial acetic acid - methanol - water (60 : 32 : 12 :

8). To enhance the fluorescence of substances in ultraviolet light UV (365 nm) plates with chromatograms were treated with 5% EtOH solution of AlCl<sub>3</sub> with following heating (5 min at 105°C). Saponins were detected by the sequential treatment of plates with alcoholic solution of sulfuric acid and vanillin [5]. Chromatogram was held for 7-10 minutes at 110°C until the indicative spots appearance. Photographic materials and digital experimental data processing were made in Axio-Vision 40V Carl Zeiss. Digital data processing was made in the program Image Pro Premier 9.0 (Evaluation version). Analysis of chromatograms was performed in the program Sorbflil TLC.

**Research results.** *In vitro* conditions the accumulation of secondary metabolites in vegetative parts of sugar beet plant regenerants, including phenolcarbonic acids, flavonoids and saponins, which has an important role in the constitutional stability formation, is triggered. General condition of the plant organism and its survival strategy depends on the activity of phenolic compounds and saponins synthesis. TLC in MeOH leaves extract revealed phenol carbonic acid (Fig. 1.A, B). By the nature of fluorescence in the UV (365 nm), color reaction of FeCl<sub>3</sub> solution and R<sub>f</sub> substance the most closely corresponds to chlorogenic acid (R<sub>f</sub> = 0.05).

In the chloroform - methanol - water (70 : 30 : 4) solvent system after the plate treatment with 5% EtOH solution of AlCl<sub>3</sub> we have detected flavonoids and other polyphenolic substances with blue and blue-green fluorescence. It was also marked that *in vitro* conditions the most active synthesis of aromatic compounds was detected in diploid hybrids Uladovo-Verhniatskiy MS 37, Uladovo-Veselopodolyanskiy MS 84 and triploid hybrid Alexandriya (sample № 2, 4, 5) and the lowest content of phenolic compounds was found in leaves of Yaltushkivskiy single-seeded 64 (№ 1).

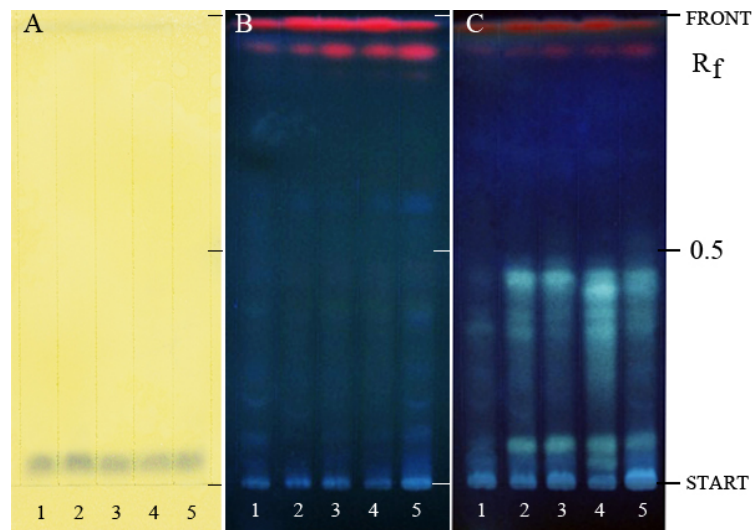


Fig.1. Chromatogram of sugar beet leaves menthol extracts *in vitro* (solvent systems: chloroform - methanol - water – 70 : 30 : 4): A – demonstration of simple phenol compounds with 10% FeCl<sub>3</sub> solution; B – autofluorescence of phenol compounds and chlorophylls (a and b); C – fluorescence of phenols after treatment with EtOH solution of AlCl<sub>3</sub>

During studying of solvent systems better separation of phenolic compounds in sugar beet tissues was in: chloroform - glacial acetic acid - methanol - water in the ratio 60 : 32 : 12 : 8. In these conditions it is possible to divide more than 10 aromatic compounds in the R<sub>f</sub> range from 0.1 to 0.72. After chromatograms treatment with 5% EtOH sulfuric acid solution and 1% vanillin solution in the plate purple-violet adsorbent-coated glass strip appeared, this is character for saponins (Fig. 2.A). In leaves of investigated sugar beet plant regenerants of Ukrainian selection of each selected variety we have detected saponins with R<sub>f</sub> indexes 0.21, 0.32, 0.35. In addition in leaves of plant regenerants of Uladovo-Verhniatskiy MS 37 and Atamansha hybrids we have identified compounds with R<sub>f</sub> = 0.56 and 0.62. In the UV with wavelength 365 nm substance with R<sub>f</sub> = 0.62 and 0.67 had a bright turquoise color luminescence (Fig. 2, B). According to the published data, an organic compound with R<sub>f</sub> = 0.62 can be defined as oleanolic acid - basic derivative substance for the synthesis of sugar beet triterpene saponins [4]. In contrast, a spot with R<sub>f</sub> = 0.56 strongly absorbed UV (365 nm).

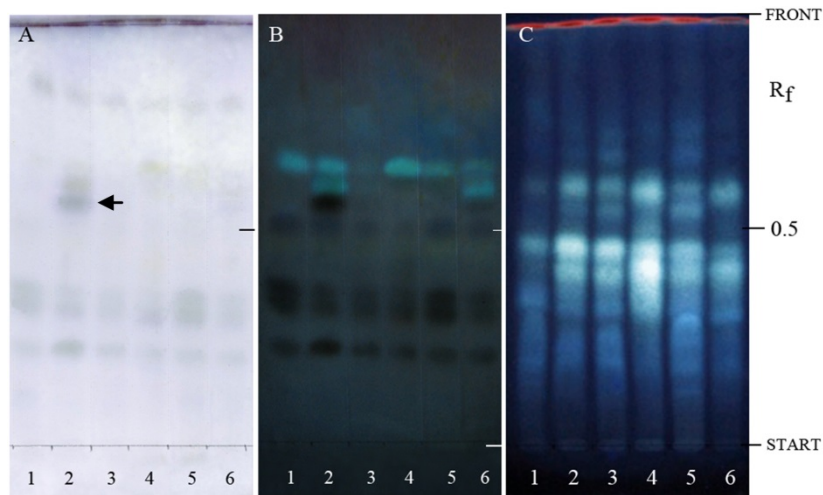


Fig. 2. Chromatogram MeOH of sugar beet leaves extracts cultivated *in vitro* (chloroform - glacial acetic acid - methanol - water – 60 : 32 : 12 : 8): A – saponins identification (revealing agent – 5% EtOH solution of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 1% vanillin solution); B – plate in UV (365 nm); C – fluorescence of phenolic compounds after treatment with EtOH solution of AlCl<sub>3</sub>

It should be noted that the distinguishing feature of hybrids Uladovo-Verhnyatskiy MS 37 and Atamansha is a high crop yield and sugar content of beet-roots, furthermore, the last hybrid has a high resistance to drought. According to densitograms (Fig. 3.a-d) the average content of saponins in leaf extracts of sacchariferous hybrid Uladovo-Verhnyatskiy MS 37 in average was 2-3 times higher than in Yaltushkivskiy single-seeded 64. It also should be noted that the relative content of triterpene saponins with R<sub>f</sub> = 0.32 and R<sub>f</sub> = 0.35 for all of investigated samples was stable and practically independent of the varietal identity.

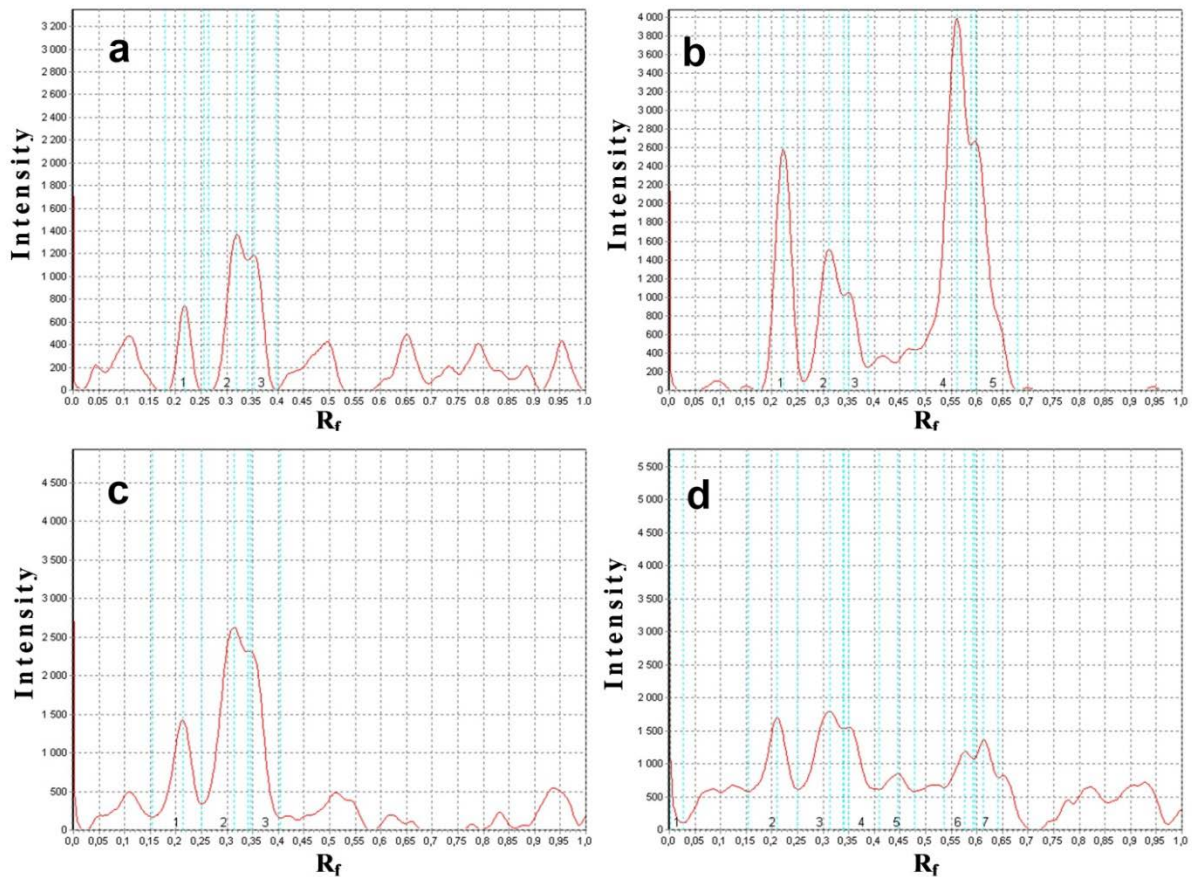


Fig. 3. Densitograms of triterpene saponins in sugar beet leaves, separated by TLC: a) track number 1 (sort Yaltushkivskiy single-seeded 64), b) track number 2 (hybrid Uladovo-Verhnyatskiy MS 37), c) track number 5 (hybrid Alexandriya); d) track number 6 (hybrid Atamansha)

Thus, taking into account absolutely identical composition of nutrient media, the same photo- and thermal regime of cultivated *in vitro* plants, triterpenoid saponins with R<sub>f</sub> = 0.56 and 0.62

can be biochemical markers for Uladovo-Verhniatskiy MS 37 and Atamansha sugar beet varieties (Table 1).

Table 1

**Chromatographic separation of triterpene saponins of sugar beet plant regenerants**

No	Sugar beet variety	R <sub>f</sub>						
1	Yaltushkivskiy single-seeded 64	0.21	0.32	0.35	0.51	-	-	0.67
2	Uladovo-Verhnyatskiy MS 37	0.21	0.32	0.35	0.51	0.56	0.62	0.67
3	Ukrainskiy MS 70	0.21	0.32	0.35	0.51	-	-	-
4	Uladovo-Veselopodolyanskiy MS 84	0.21	0.32	0.35	0.51	-	-	0.67
5	Alexandriya	0.21	0.32	0.35	0.51	-	-	0.67
6	Atamansha	0.21	0.32	0.35	0.51	0.56	0.62	0.67

The average content of saponins in leaf extracts of sacchariferous plant regenerants Uladovo-Verhniatskiy MS 37 and drought-tolerant Atamansha hybrid at the average rate was 2-3 times higher than in etalon sort Yaltushkivskiy single-seeded 64.

**Conclusions.**

1) It was shown that the qualitative and quantitative composition of triterpene saponins and phenolic compounds content in leaves of sugar beet plants cultivated in vitro at the same photo- and thermal regime has varietal specificity, which is due to metabolism peculiarities.

2) Was determined that at the stage of sugar beet plant regenerants formation in vitro culture, triterpene saponosides with R<sub>f</sub> = 0.56 and 0.62 can be an important diagnostic markers in the solvent system: chloroform - glacial acetic acid - methanol - water (60 : 32 : 12 : 8).

3) There is a reason to consider reasonable researches on usage of isolated by us compounds in primary diagnostics and plant regenerants breeding on valuable agronomic character, including potentially high drought tolerance.

**References**

1. Golovko A. Genetic variability of somatic embryogenesis in tissue cultures of sugar beet breeding lines / A. Golovko // Цитология и генетика. – 2001. – Т. 35. – № 6. – С. 10-17.
2. Sparg S.G. Biological activities and distribution of plant saponins / S.G. Sparg, M.E. Light, J. van Staden // J. Ethopharmacol. – 2004. – Vol. 94. – P. 219–243.
3. Брежнева Т.А. Выделение и исследование сапонинов сахарной свеклы: дис. на получение науч. степени канд. фарм. наук : 15.00.02 / Брежнева Татьяна Александровна. – М., 2003. – 215 с.
4. Мироненко Н.В. УФ-спектрофото-метрическое определение тритерпеновых сапонинов – производных олеаноловой кислоты / Н.В. Мироненко, Т.А. Брежнева, В.Ф. Селеменев // Химия растительного сырья. – 2011. – №3. – С. 153 – 157.
5. Химический анализ лекарственных растений: Учеб. пособие для фармацевтических вузов / [Е.Я. Ладыгина, Л.Н. Сафронич, В.Э. Отряшенкова и др.]; под ред. Н.И. Гринкевича, Л.Н. Сафронича – М.: Высш. шк., 1983. – С. 41-56.

**Анотація**

**Кляченко О. Л., Ліханов А. Ф., Криловська С. А.**

**Особливості складу тритерпенових сапонінів та фенольних речовин в листках різних генотипів цукрових буряків (*Beta vulgaris* L.) в культурі in vitro**

В результаті досліджень з вивчення складу тритерпенових сапонінів та фенольних речовин в сорті, ди- та триплоїдних гібридах цукрових буряків (*Beta vulgaris* L.) проаналізований їх кількісний та якісний склад. Обговорюються перспективи використання тритерпенових сапонінів для діагностики продуктивності та адаптивності рослин.

**Ключові слова:** тритерпенові сапоніни, фенольні речовини, культура in vitro, цукрові буряки

*Анотація*

**Кляченко О. Л., Лиханов А. Ф., Крыловская С. А.**

**Особенности состава тритерпеновых сапонинов и фенольных веществ в листьях различных генотипов сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) в культуре *in vitro***

*В результате исследований по изучению состава тритерпеновых сапонинов и фенольных веществ в сорте, ди- и триплоидных гибридах сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) проанализирован их количественный и качественный состав. Обсуждаются перспективы использования тритерпеновых сапонинов в качестве маркеров для диагностики продуктивности и адаптивности растений.*

**Ключевые слова:** тритерпеновые сапонины, фенольные вещества, культура *in vitro*, сахарная свекла

УДК 631.52:606.6:633.63

**Л.М. КОЖЕМЯКИНА**, аспірант

Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН

E-mail: kozhemyakina\_1@ukr.net

**ІДЕНТИФІКАЦІЯ СТРУКТУРНИХ ЧАСТИН ГЕНЕТИЧНИХ КОНСТРУКЦІЙ В ТРАНСГЕННИХ РОСЛИНАХ ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ**

*Наведені результати досліджень по ідентифікації промоторних і термінаторних ділянок генетичних конструкцій та гену стійкості до гліфосату методом полімеразної ланцюгової реакції.*

**Ключові слова:** полімеразна ланцюгова реакція, 35S-промотор, NOS-термінатор, *cp4 EPSPs* ген

**Вступ.** При створенні трансгенних рослин та їх впровадженні в сільське господарство як комерційних культур найбільш важливим є досягнення високого і стабільного рівня експресії перенесених корисних генів. Проблема «замовкання генів» має велике практичне значення в селекційній роботі при отриманні гібридних форм рослин, тому що у генетично модифікованих сільськогосподарських культур всі корисні гени повинні функціонувати стабільно [2]. Зокрема, стабільність генетичних конструкцій в геномі цукрових буряків та їх експресія є мало вивченим питаннями, тому актуальним є з'ясування ефективності прояву трансгенів в рослинах цукрових буряків [5].

*Метою досліджень є ідентифікація промоторних, термінаторних елементів генетичних конструкцій та корисних генів в трансгенних рослинах цукрових буряків за допомогою полімеразної ланцюгової реакції.*

**Матеріали та методи.** В роботі використовували селекційний матеріал цукрових буряків, який містить генетичну конструкцію з геном стійкості до гліфосату, що є діючою речовиною комерційного препарату *Roundup*. Досліджувана генетична конструкція включає послідовність 35S промотору, NOS термінатору та *cp4 EPSPs* гену. Для досліджень було відібрано чотири зразки трансгенних рослин цукрових буряків, а також один контрольний зразок, що не містив трансгену.

Виділення ДНК проводили згідно методики розробленої Дж. Дрейпером та ін. (1991 р.) [1]. Заморожені листки трансгенних рослин цукрових буряків (по 500 мг кожного зразку) розтирали в охолодженій ступці з додаванням лізуючого буферу, що містив катіонний детергент ЦТАБ різних концентрацій для утворення нерозчинного комплексу нуклеїнових кислот. При видаленні білків застосовували обробку розчином: хлороформ-ізоаміловий спирт у співвідношенні 24:1. Осадження та концентрування ДНК проводили додаючи розчин 96% етилового спирту. Отриманий осад розчиняли в 50 мкл ТЕ-буферу.

Для виявлення промоторних ділянок генів генетичних конструкцій в рослинах цукрових буряків використовували метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з подальшим