

УДК 575.222.7:581.1

## НАКОПИЧЕННЯ ФРУКТОЗОВМІСНИХ ВУГЛЕВОДІВ У КУЛЬТУРІ ТРАНСГЕННИХ КОРЕНІВ ЛІКАРСЬКИХ РОСЛИН

Н.А. МАТВЄЄВА, К.О. ДРОБОТ

*Інститут клітинної біології та генетичної інженерії Національної академії наук  
України  
03680 Київ, вул. Академіка Заболотного, 148  
e-mail: joyna56@gmail.com*

Визначено вміст фруктозовмісних вуглеводів у культурі трансгенних коренів лікарських рослин *Cichorium intybus* L., *Althaea officinalis* L., *Lactuca sativa* L., *Tragopogon porrifolius* L., *Linaria maroccana* L. Показано, що генетична трансформація у багатьох випадках (52,7 % ліній) призводила до підвищення вмісту фруктанів у 2,8—4,2 раза порівняно з контролем. У найбільших кількостях вони накопичувались у трансгенних коренях *T. porrifolius* та *C. intybus* — відповідно  $14,41 \pm 0,13$  та  $14,33 \pm 0,09$  мг/г сирової речовини.

*Ключові слова:* *Tragopogon porrifolius* L., *Linaria maroccana* L., *Cichorium intybus* L., *Althaea officinalis* L., *Lactuca sativa* L., фруктани, культура трансгенних коренів, лікарські рослини.

Культуру трансгенних («бородатих») коренів отримують шляхом *Agrobacterium rhizogenes*-опосередкованої трансформації. Такі корені здатні ізолювати рослини на безгормональному середовищі, можуть бути перспективним джерелом цінних біологічно активних сполук [18]. Використання культури трансгенних коренів для продукування таких сполук має низку переваг порівняно із суспензійною культурою. Серед цих переваг — більша генетична стабільність, можливість масового культивування в контрольованих умовах біореакторів за відносно невеликої кількості початкового рослинного матеріалу, економічна вигідність (відсутність потреби використання регуляторів росту, простота культивування, великий вихід біомаси, можливість культивування без освітлення, додаткового обігріву, без використання дорогих сполук у поживному середовищі) [5, 6, 12]. Крім того, вирощування «бородатих» коренів у біореакторах є екологічно безпечним і не суперечить правилам роботи з трансгенними рослинами [12].

До сполук, які можуть синтезуватися у клітинах «бородатих» коренів, належать фруктозовмісні вуглеводи (фруктани). Вони мають лікувальні властивості й застосовуються як дієтична добавка при порушеннях обміну речовин [4], дисбактеріозах [16], у комплексній терапії онкозахворювань [17]. Фруктани, зокрема інουλін, є заміниками глюкози і мають гіпоглікемічні властивості [10]. Крім того, їх використовують як сорбенти для виведення токсичних сполук з організму [11].

Для розробки технологічного способу отримання фруктанів з рослинного матеріалу потрібно обрати оптимальний об'єкт, тобто корені з

максимальною швидкістю росту та найвищим питомим вмістом фруктанів. Для отримання культури «бородатих» коренів рослин різних видів, у тому числі рослин, які належать до родини Compositae, ми використовували *A. rhizogenes*. Ці рослини у природних умовах синтезують значні кількості біологічно активних фруктанів [7].

Метою цієї роботи було визначення впливу генетичної трансформації на накопичення фруктанів та порівняння їх вмісту в трансгенних коренях лікарських рослин *Cichorium intybus* L., *Althaea officinalis* L., *Lactuca sativa* L., *Tragopogon porrifolius* L., *Linaria maroccana* L.

### Методика

Культуру трансгенних коренів ми отримали раніше *A. rhizogenes*-опосередкованою трансформацією векторами з геном інтерферону- $\alpha 2b$  людини (*ifn- $\alpha 2b$* ), генами туберкульозних антигенів ESAT6 і Ag85B (зшита послідовність *esxA:fbpB<sup>ATMD</sup>*), а також диким штамом *A. rhizogenes* A4 [3, 14]. Корені культивували в умовах *in vitro* на поживному середовищі МС зі зменшеним удвічі вмістом макросолей протягом 30 діб за температури  $24 \pm 2$  °C. Вміст фруктанів визначали за реакцією Селіванова [2]. Оптичну густину зразків вимірювали на спектрофотометрі Erppendorf за довжини хвилі 550 нм. Всі вимірювання проводили у трьох повторностях. Статистичну оцінку отриманих результатів здійснювали шляхом розрахунку довірчих інтервалів ( $P \leq 0,05$ ).

### Результати та обговорення

Вміст фруктанів у коренях контрольних рослин досліджуваних видів відрізнявся. У коренях нетрансформованих рослин *L. maroccana* він був найвищим і становив  $5,72 \pm 0,14$  мг/г сирової речовини. Дещо менші їх кількості —  $5,09 \pm 0,12$  та  $5,10 \pm 0,11$  мг/г сирової речовини — накопичува-

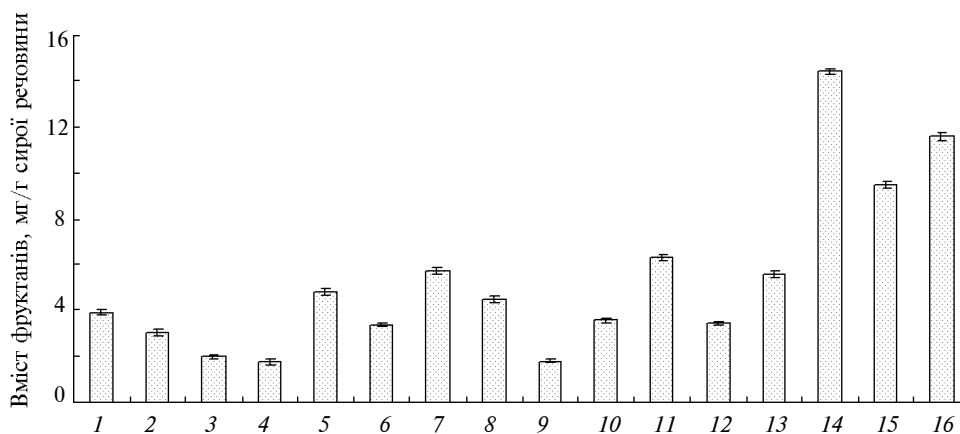


Рис. 1. Вміст фруктанів у трансгенних коренях лікарських рослин *A. officinalis* (*A.o.*), *L. maroccana* (*L.m.*) та *T. porrifolius* (*T.p.*):

1 — *A.o.*, контроль; 2 — *A.o.*, *ifn- $\alpha 2b$*  № 1; 3 — *A.o.*, *ifn- $\alpha 2b$*  № 2; 4 — *A.o.*, *ifn- $\alpha 2b$*  № 3; 5 — *A.o.*, *ifn- $\alpha 2b$*  № 4; 6 — *A.o.*, *ifn- $\alpha 2b$*  № 5; 7 — *L.m.*, контроль; 8 — *L.m.*, A4 № 1; 9 — *L.m.*, A4 № 2; 10 — *L.m.*, A4 № 3; 11 — *L.m.*, A4 № 4; 12 — *T.p.*, контроль; 13 — *T.p.*, A4 № 1; 14 — *T.p.*, A4 № 2; 15 — *T.p.*, A4 № 3; 16 — *T.p.*, *ifn- $\alpha 2b$*  № 1; *ifn- $\alpha 2b$*  — трансгенні корені з геном інтерферону- $\alpha 2b$  людини; A4 — трансгенні корені, отримані за допомогою дикого штаму *A. rhizogenes*

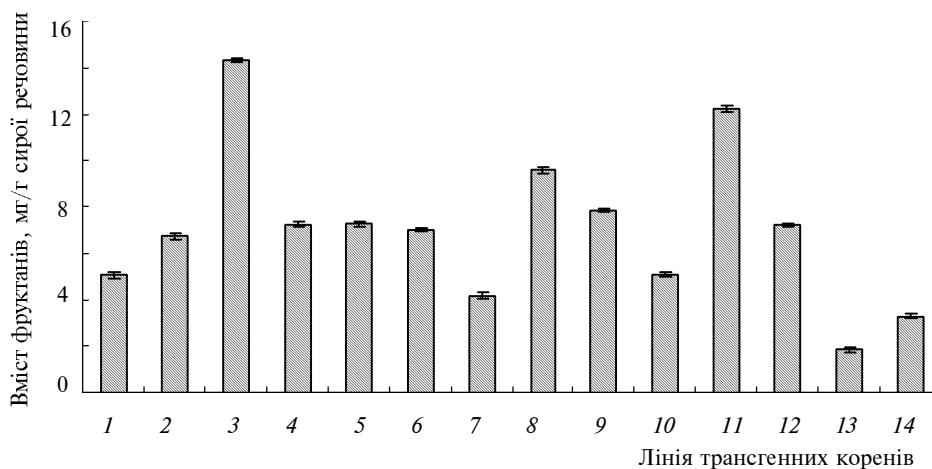


Рис. 2. Вміст фруктанів у трансгенних коренях лікарських рослин *C. intybus* (*C.i.*) та *L. sativa* (*L.s.*):

1 — *C.i.*, контроль; 2 — *C.i.*, *ifn-α2b* № 1; 3 — *C.i.*, *ifn-α2b* № 2; 4 — *C.i.*, *ifn-α2b* № 3; 5 — *C.i.*, *ifn-α2b* № 4; 6 — *C.i.*, *ifn-α2b* № 5; 7 — *C.i.*, *esxA:fbpB<sup>ATMD</sup>* № 1; 8 — *C.i.*, *esxA:fbpB<sup>ATMD</sup>* № 2; 9 — *C.i.*, A4 № 1; 10 — *L.s.*, контроль; 11 — *L.s.*, *ifn-α2b* № 1; 12 *L.s.* — *ifn-α2b* № 2; 13 — *L.s.*, *ifn-α2b* № 3; 14 — *L.s.*, *ifn-α2b* № 4; *ifn-α2b* — трансгенні корені з геном інтерферону-α2b людини; A4 — трансгенні корені, отримані за допомогою дикого штаму *A. rhizogenes*; *esxA:fbpB<sup>ATMD</sup>* — трансгенні корені з геном туберкульозних антигенів ESAT6 і Ag85B

лись у коренях рослин *C. intybus* та *L. sativa* відповідно. В коренях рослин *A. officinalis* і *T. porrifolius* вміст фруктанів був найнижчим —  $3,82 \pm 0,12$  та  $3,42 \pm 0,08$  мг/г сирової речовини (рис. 1, 2).

Вміст фруктанів у трансгенних коренях рослин досліджуваних видів відрізнявся, причому як підвищувався, так і знижувався у різних ліній (окремні трансформаційні події). Так, у трансгенних коренях *A. officinalis* (ген *ifn-α2b*) ліній № 1—3 і 5 він виявився в 1,29—2,19 раза нижчим, ніж у контролі, і становив  $1,77 \pm 0,10$ ... $3,35 \pm 0,09$  мг/г сирової речовини. Водночас у коренях *A. officinalis* лінії № 5 вміст фруктанів був вищим порівняно з контролем в 1,24 раза (див. рис. 1). У трансгенних коренях *L. maroccana* (A4) ліній № 1—3 він був нижчим в 1,29—3,23 раза, ніж у контролі, тоді як у лінії № 4 — вищим в 1,10 раза і становив  $6,31 \pm 0,14$  мг/г сирової речовини. Разом з тим у всіх досліджених ліній *T. porrifolius* (як A4, так і з геном *ifn-α2b*) вміст фруктанів підвищувався значно — в 1,62—4,20 (A4) та у 3,37 раза (*ifn-α2b*) порівняно з контролем (див. рис. 1, 2).

Найвищий вміст фруктанів ( $14,41 \pm 0,13$  та  $14,33 \pm 0,09$  мг/г сирової речовини) виявлено у трансгенних коренях *T. porrifolius* (A4, лінія № 2) та *C. intybus* (*ifn-α2b*, лінія № 2) відповідно. Трансгенні корені *A. officinalis* і *L. maroccana* накопичували їх значно менше — відповідно до  $4,81 \pm 0,12$  і  $6,31 \pm 0,14$  мг/г сирової речовини.

Відомо, що у результаті генетичної трансформації фізіологічні та біохімічні характеристики рослин можуть змінюватись, причому як прогнозовано (у разі перенесення гена, що відповідає за змінювану ознаку), так і непрогнозовано (у випадку перенесення гена, що відповідає за іншу ознаку). Так, у трансгенних рослин тютюну із геном хлоропластної Cu/Zn-СОД спостерігали прогнозоване підвищення активності цього ферменту і, як наслідок, збільшення стійкості до оксидативного стресу, спричиненого впливом низьких температур [8]. Рослини тютюну із геном *VTE1* (токоферолциклаза — один із ферментів біосин-

тезу токоферолу) з *Arabidopsis*, що культивувались в умовах посухи, вирізнялись вищим вмістом токоферолу й низьким рівнем ПОЛ, а також нижчим вмістом пероксиду водню порівняно з рослинами дикого типу в умовах посухи [13]. Трансгенні рослини, які несли гени, що кодують ферменти синтезу осмотично активних речовин, наприклад гліцинбетаїну [19] або проліну [24], мали підвищений вміст цих сполук порівняно з рослинами дикого типу й були стійкішими до дії абіотичних стресів. Після перенесення в геном рослин цикорію генів фруктозилтрансферази (*6-SFT*) з цибулі [23] та ячменю [22] значно активувався синтез інуліну (запасного фруктану цикорію).

Разом з тим у рослин після генетичної трансформації можливі непрогнозовані (неочікувані) фізіолого-біохімічні зміни. Так, у рослин ріпаку із геном фітоенсинтетази підвищувався вміст  $\alpha$ - та  $\beta$ -каротину [21]; кукурудза із геном *Vt*-токсину містила у стеблі підвищену кількість лігніну порівняно з контролем [20]; рослини рису з геном синтезу гліцину сої вирізнялись підвищеним вмістом білка та вітаміну  $B_6$  [15]. Виявлено пришвидшення росту (скорочення періоду проростання насіння з 6—8 до 3—4 діб) та накопичення маси сухої речовини (на 80—100 %) рослинами тютюну з геном гемоглобіну *Vitreoscilla (VHb)* [9]. У рослин тютюну з геном леггемоглобіну *A* сої знижувались рівні накопичення маси сухої речовини (на 50 %) та пероксидного окиснення ліпідів (на 19 %) і відповідно підвищувалась антиоксидантна активність порівняно з контролем [1].

Ми встановили, що генетична трансформація рослин різних видів із використанням векторів з генами інтерферону людини та туберкульозних антигенів ESAT6 і Ag85B, які теоретично не мали б впливати на фізіолого-біохімічні особливості рослин, призводила до змін у накопиченні запасних вуглеводів (фруктанів). Загалом у 64 % досліджених трансгенних ліній коренів вміст фруктанів перевищував вміст цих сполук у контролі, у 4 — був на рівні контролю, у 32 % — нижчим, ніж у коренях контрольних рослин. У 100 % ліній коренів *T. porrifolius*, 87,5 ліній *C. intybus*, 50 % ліній *L. sativa* вміст фруктанів зростав порівняно з контролем. У трансгенних коренях *T. porrifolius* він був вищим до 4,2 раза, *L. sativa* — до 2,4, *C. intybus* — до 2,8 раза порівняно з вмістом у коренях контрольних рослин. Лише у «бородатих» коренях *L. maroccana* вміст фруктанів або не відрізнявся від контролю, або був нижчим, ніж у коренях контрольних рослин.

Отже, визначено видові відмінності в накопиченні фруктанів у коренях рослин *Cichorium intybus* L., *Althaea officinalis* L., *Lactuca sativa* L., *Tragopogon porrifolius* L., *Linaria maroccana* L. та зміни їх вмісту в «бородатих» коренях, отриманих після генетичної трансформації. Серед контрольних нетрансформованих рослин найвищий вміст фруктанів ( $5,72 \pm 0,14$  мг/г сирої речовини) зафіксовано в коренях рослин *L. maroccana*. Трансгенні корені рослин усіх досліджених видів, отримані з використанням як дикого штаму *A. rhizogenes* A4, так і *A. rhizogenes*, що несли вектор із генами туберкульозних антигенів, у 52,8 % випадків (окрім *L. maroccana*) накопичували в 2,8—4,2 раза (залежно від лінії) більше фруктанів порівняно з контролем. Найвищий їх вміст ( $14,41 \pm 0,13$  та  $14,33 \pm 0,09$  мг/г сирої речовини) був у трансгенних коренях *T. porrifolius*, отриманих після трансформації диким штамом агробактерій, A4 та *C. intybus*, трансформованих агробактеріями з вектором,

що ніс ген *ifn-α2b*. Доведено, що трансгенні корені цих лікарських рослин можуть бути перспективним джерелом для отримання біологічно активних фруктозозмісних вуглеводів.

1. Дмитрюкова М.Ю., Баймиев А.Х., Рахманкулова З.Ф. Влияние экспрессии гена леггемоглобина сои на антиоксидантную систему трансгенных растений табака // Вест. Одес. гос. ун-та. — 2010. — **12**, № 118. — С. 4–8.
2. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П. Методы биохимического исследования растений. — Л. — Агропромиздат, 1987. — 143 с.
3. Матвеева Н.А., Шаховский А.М., Кучук Н.В. Особенности трансгенных растений салата с геном интерферона-α2b, полученных путем *Agrobacterium rhizogenes*-опосредованной трансформации // Cytol. and Genet. — 2012. — **46**, N 3. — P. 27–32.
4. Abrams S.A., Griffin I.J., Hawthorne K.M. et al. A combination of prebiotic short- and long-chain inulin-type fructans enhances calcium absorption and bone mineralization in young adolescents // Amer. J. Clin. Nutr. — 2005. — **82**, N 2. — P. 4761–4763.
5. Baiza A.M., Quiroz-Moreno A., Ruiz J.A., Loyola-Vargas V.M. Genetic stability of hairy root cultures of *Datura stramonium* // Plant Cell Tissue. — 1999. — **59**, N 1. — P. 9–17.
6. Choi S.M., Son S.H., Yun S.R. et al. Pilot scale culture of adventitious roots of ginseng in a bioreactor system // Ibid. — 2000. — **62**, N 3. — P. 187–193.
7. Figueiredo-Ribeiro R.C.L., Isejima E.M., Dias-Tagliacozzo G.M. The physiological significance of fructan accumulation in *Asteraceae* from the cerrado // Ciencia Cult. — 1991. — **43**, N 3. — P. 443–446.
8. Gupta A.S., Webb R.P., Holaday A.S., Allen R.D. Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress induction of ascorbate peroxidase in superoxide dismutase-overexpressing plants // Plant Physiol. — 1993. — **103**, N 4. — P. 1067–1073.
9. Holmberg N., Lilius G., Bailey J.E., Bułow L. Transgenic tobacco expressing *Vitreoscilla* hemoglobin exhibits enhanced growth and altered metabolite production // Natl. Biotechnol. — 1997. — **15**, N 3. — P. 244–247.
10. Kaur N., Gupta A.K. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition // J. Biosciences. — 2002. — **27**, N 7. — P. 703–714.
11. Kelly G. Inulin-type prebiotics — a review: part 1 // Altern. Med. Rev. — 2008. — **13**, N 4. — P. 315–329.
12. Kim Y., Wyslouzil B.E., Weathers P.J. Secondary metabolism of hairy root cultures in bioreactors // In vitro Cell. Dev. Biol. Plant. — 2002. — **38**, N 1. — P. 1–10.
13. Liu X., Hua X., Guo J. et al. Enhanced tolerance to drought stress in transgenic tobacco plants overexpressing *VTE1* for increased tocopherol production from *Arabidopsis thaliana* // Biotechnol Lett. — 2008. — **30**, N 7. — P. 1275–1280.
14. Matvieieva N.A., Kishchenko O.M., Shakhovskiy A.M. et al. Regeneration of transgenic plants from *Cichorium intybus* L. var. *foliosum* Hegi hairy roots // Cytol. and Genet. — 2011. — **45**, N 5. — P. 11–16.
15. Momma K., Hashimoto W., Ozawa S. Quality and safety evaluation of genetically engineered rice with soybean glycinin: analyses of the grain composition and digestibility of glycinin in transgenic rice // Biosci., Biotechnol. Biochem. — 1999. — **63**, N 2. — P. 314–318.
16. Özer D., Akin S., Özer B. Effect of inulin and lactulose on survival of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium bifidum* BB-02 in acidophilus bifidus yoghurt // Food Sci. Technol. Int. — 2005. — **11**, N 1. — P. 19–24.
17. Pool-Zobel B.L. Inulin-type fructans and reduction in colon cancer risk: review of experimental and human data // British J. Nutr. — 2005. — **93**, N 1. — P. 73–90.
18. Roychowdhury D., Majumder A., Jha S. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation in medicinal plants: Prospects and challenges // Biotechnology for Medicinal Plants. — Berlin; Heidelberg: Springer Verlag, 2013. — P. 29–68.
19. Sakamoto A., Murata N. The role of glycine betaine in the protection of plants from stress: clues from transgenic plants // Plant Cell Environ. — 2002. — **25**, N 2. — P. 163–171.
20. Saxena D., Stotzky G. Bt corn has a higher lignin content than non-Bt corn // Amer. J. Bot. — 2001. — **88**, N 9. — P. 1704–1706.
21. Shewmaker C.K., Sheehy J.A., Daley M. Seed-specific overexpression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects // Plant J. — 1999. — **20**, N 4. — P. 401–412.
22. Sprenger N., Schellenbaum L., van Dun K. et al. Fructan synthesis in transgenic tobacco and chicory plants expressing barley sucrose:fructan 6-fructosyltransferase // FEBS Lett. — 1997. — **400**, N 3. — P. 335–358.

## НАКОПЛЕНИЕ ФРУКТОЗОСОДЕРЖАЩИХ УГЛЕВОДОВ В КУЛЬТУРЕ

23. *Vijn I., van Dijken A., Sprenger N. et al.* Fructan of the inulin neoseries is synthesized in transgenic chicory plants (*Cichorium intybus* L.) harboring onion (*Allium cepa* L.) fructan:fructan 6G-fructosyltransferase // *Plant J.* — 1997. — **11**, N 3. — P. 387—398.
24. *Yamada M., Morishita H., Urano K.* Effects of free proline accumulation in petunias under drought stress // *J. Exp. Bot.* — 2005. — **56**, N 417. — P. 1975—1981.

Отримано 06.11.2014

## НАКОПЛЕНИЕ ФРУКТОЗОСОДЕРЖАЩИХ УГЛЕВОДОВ В КУЛЬТУРЕ ТРАНСГЕННЫХ КОРНЕЙ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

*Н.А. Матвеева, Е.А. Дробот*

Институт клеточной биологии и генетической инженерии Национальной академии наук Украины, Киев

Определено содержание фруктозосодержащих углеводов в культуре трансгенных корней лекарственных растений *Cichorium intybus* L., *Althaea officinalis* L., *Lactuca sativa* L., *Tragopogon porrifolius* L., *Linaria maroccana* L. Показано, что генетическая трансформация во многих случаях (52,8 % линий) приводила к повышению содержания фруктанов в 2,8—4,2 раза по сравнению с контролем. Наибольшее их количество накапливалось в трансгенных корнях *T. porrifolius* и *C. intybus* — соответственно  $14,41 \pm 0,13$  и  $14,33 \pm 0,09$  мг/г сырого вещества.

## THE ACCUMULATION OF FRUCTANS IN THE HAIRY ROOT CULTURE OF MEDICINAL PLANTS

*N.A. Matvieieva, K.O. Drobot*

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine  
148 Acad. Zabolotnogo St., Kyiv, 03680, Ukraine

The fructans content in the hairy root culture of *Cichorium intybus* L., *Althaea officinalis* L., *Lactuca sativa* L., *Tragopogon porrifolius* L., *Linaria maroccana* L. was determined. The genetic transformation caused the increase of fructan content in 2,8—4,2 time as compared to control in 52,8 % lines. The higher fructan content was accumulated in the transgenic roots of *T. porrifolius* and *C. intybus* — up to  $14,41 \pm 0,13$  and  $14,33 \pm 0,09$  mg/g fresh weight.

*Key words:* *Tragopogon porrifolius* L., *Linaria maroccana* L., *Cichorium intybus* L., *Althaea officinalis* L., *Lactuca sativa* L., fructans, hairy root culture, medicinal plants.