

УДК 575.222.7:581.1

ОТРИМАННЯ «БОРОДАТИХ» КОРЕНІВ РОСЛИН *TRAGOPOGON PORRIFOLIUS* ТА *ALTHAEA OFFICINALIS* З ВИКОРИСТАННЯМ *AGROBACTERIUM RHIZOGENES*

Н.А. МАТВЄЄВА

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України
Україна, Київ 03680, вул. Академіка Заболотного, 148
e-mail: joyna@ukr.net

Мета. Метою роботи було отримання культури «бородатих» коренів рослин *Tragopogon porrifolius* та *Althaea officinalis*. **Методи.** Корені отримували шляхом кокультивування листків із суспензією клітин *Agrobacterium rhizogenes*, які несли вектор pCB161, або клітин *A. rhizogenes* штаму А4. Селекцію трансгенних коренів проводили на середовищі Мурасіге та Скуга зі зменшеним вдвічі вмістом макроелементів. **Результати.** Через 10–14 днів після трансформації спостерігали формування коренів із частотою 92,5 та 59,4% відповідно для рослин *A. officinalis* та *T. porrifolius* при використанні дикого штаму агробактерій та 100 і 37,5% при використанні *A. rhizogenes*, які несли вектор pCB161. У ряді випадків спостерігали зміну вмісту поліфруктанів – як підвищення до 2,6 разів у «бородатих» коренях алтею, так і зменшення до 4,6 разів у культурі коренів козельців. **Висновки.** Рослини *A. officinalis* та *T. porrifolius* відрізнялися як за швидкістю коренеутворення, так і за частотою формування коренів. Максимальна частота отримання «бородатих» коренів становила 100% при трансформуванні *A. officinalis* диким штамом агробактерій А4. Після трансформації змінювався вміст поліфруктанів у частині ліній «бородатих» коренів.

Ключові слова: *Agrobacterium rhizogenes*, *Tragopogon porrifolius*, *Althaea officinalis*.

Вступ. Створення рослин, клітинних та кореневих ліній з новими властивостями є одним із напрямків сучасної біотехнології. Для цього використовують ґрунтові мікроорганізми роду *Agrobacterium* (*Agrobacterium tumefaciens* та *Agrobacterium rhizogenes* родини Rhizobiaceae). Метод оснований на природній здатності агробактерій переносити свій генетичний матеріал до рослинних клітин [1, 2]. Метод агробактеріальної трансформації є досить простим, не вимагає складного обладнання, що робить його чи не найбільш застосованим способом генетичної трансформації рослин. Із використанням бактерій роду *Agrobacterium* отримано трансгенні рослини різних видів, родин, класів.

Результатом трансформації з використанням *A. rhizogenes* є утворення так званих «бородатих» коренів, для яких характерний гормонезалежний ріст. Культура «бородатих» коренів рослин різних видів може слугувати модельним об'єктом у дослідженнях впливу генетичної трансформації на рослини. Крім того, відомо, що перенесення чужорідних генів до рослинного геному приводить до зміни синтезу та накопичення сполук, які притаманні для певного виду рослин. Дослідження свідчать, що *rol*-гени є потенційними активаторами вторинного метаболізму. Це показано, наприклад, на рослинах родин Solanaceae, Araliaceae, Rubiaceae, Vitaceae, Rosaceae [3]. Отже, корені, отримані після

© Н.А. МАТВЄЄВА, 2012

кокультивування експлантів з суспензією *A. rhizogenes*, є перспективними у напрямку вивчення синтезування запасних сполук та вторинних метаболітів, а також як джерело їхнього технологічного отримання. Дослідження у цьому напрямку проводили ще у 80-х роках ХХ століття [4–10], що не втратили актуальності і нині. У цьому плані становить інтерес отримання бородатих коренів рослин, які застосовуються у народній та традиційній медицині. Протягом останніх років опубліковано численні результати експериментальних робіт, спрямованих на отримання з використанням *A. rhizogenes* культури «бородатих» коренів, що синтезують запасні сполуки та вторинні метаболіти, а також оглядові статті.

«Бородаті» корені нині розглядаються як потенційне джерело цінних сполук [11]. Значний інтерес становить використання як об'єктів таких досліджень лікарських рослин. Зокрема, є публікації щодо отримання «бородатих» коренів рослин *Tylophora indica* та продукування ними тилофору [12], культури коренів *Catharanthus roseus*, які синтезували алкалоїди аймаліцин та серпентин [13], «бородатих» коренів *Gynostemma pentaphyllum*, які продукували у великій кількості гіпенозид [14], коренів *Gmelina arborea*, що синтезували глікозид вербаскозид [15], *Linum flavum* із підвищеним вмістом коніферину (до 58 мг/г маси) [16], «бородатих» коренів *Azadirachta indica*, які синтезували біопестицид азадирахтин [17], коренів *Pueraria phaseoloides* з підвищеним вмістом ізофлавоно пуерарину [18].

Рослини *Tragopogon porrifolius* L., *Althaea officinalis* L. синтезують біологічно активні речовини. Так, екстракти з вівсяного кореню мають антиоксидантну, антипроліферативну, гепатопротекторну активність [19–21]. Противірусну, імуностимулюючу, протизапальну активність мають рослини алтею [22–23].

Метою даної роботи було отримання культури «бородатих» коренів рослин двох видів – *T. porrifolius* та *A. officinalis* і визначення в них вмісту запасних сполук, які мають лікувальні властивості – поліфруктанів.

Матеріали і методи

Вихідним матеріалом слугувало насіння рослин *Tragopogon porrifolius* та *Althaea officinalis*. Насіння стерилізували у 20% розчині комерційного препарату «Білізна» протягом 10 хв, промивали тричі по 5 хв стерильною дистильованою водою та культивували на поверхні агаризованого середовища 1/2МС [24] при температурі 24 °С та 16-годинному освітленні (рис. 1 а, в). Як експланти використовували листки 10–14-денних проростків, на яких робили поперечні надрізи.

Для отримання «бородатих» коренів використовували *A. rhizogenes* А4 з векторною конструкцією рСВ161 [25] та дикий штам А4. Бактерії вирощували на середовищі LB [26] з антибіотиками (100 мг/л карбеніциліну, 50 мг/л ріфампіцину) на ротаційному шейкері (200 об./хв) при температурі 28 °С протягом 48 год. Бактеріальні клітини осаджували центрифугуванням (300 г, 10 хв), осад ресуспендували в розчині 10мМ MgSO₄. Листки з попередньо зробленими насічками інкубували в бактеріальній суспензії 30 хв, далі культивували в чашках Петрі на агаризованому середовищі ½ MS протягом двох діб. Після цього експланти переносили на середовище ½ MS, до якого додавали 600 мг/л цефатоксиму. Селективний антибіотик канаміцин у концентрації 25 мг/л додавали через 7 діб після кокультивування з суспензією *A. rhizogenes*, які несли вектор рСВ161. Контролем слугували експланти, які не культивували з агробактеріями та вирощували за таких самих умов. Вміст поліфруктанів визначали за методикою [27]. Проводили три незалежних експерименти. Довірчі інтервали визначали

за використання програми Microsoft Excel.

Результати та обговорення

На контрольних експлантах рослин обох видів (без кокультивування з агробактеріями) ріст коренів був відсутнім.

Використовувані у експериментах рослини двох видів відрізнялися за часом, протягом якого починався ріст коренів після кокультивування з агробактеріями, а також за частотою трансформації. Швидко,

через 10 – 12 діб, починався ріст коренів на експлантах із рослин алтею, причому відмінності у часі появи коренів при використанні дикого штаму агробактерій або бактерій з вектором pSV161 були відсутні. Приріст довжини коренів за 10 днів становив 8–10 мм. Більший термін для початку коренеутворення був необхідний для рослин козельців – 14–20 діб. Корені на експлантах, які кокультивували з *A. rhizogenes* A4, росли значно швидше, ніж корені, утворені після кокультивування з суспензією

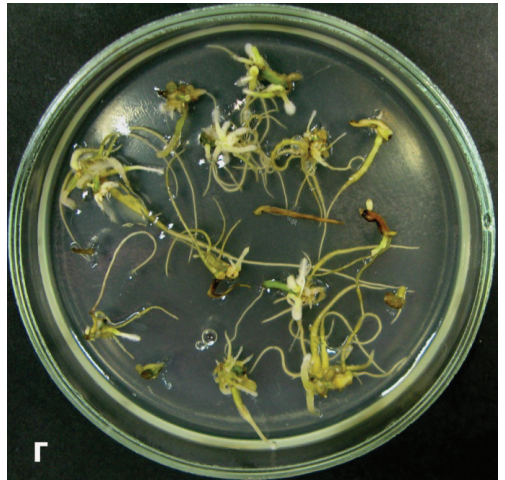
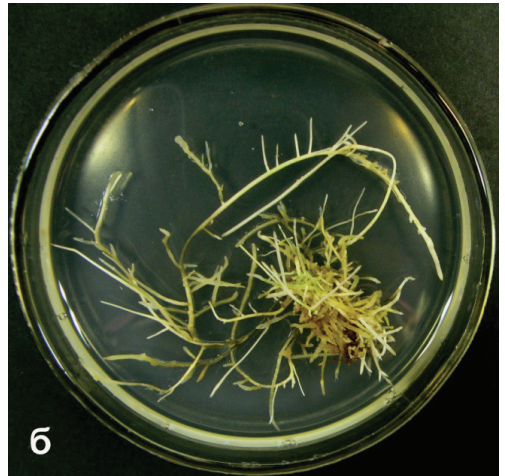
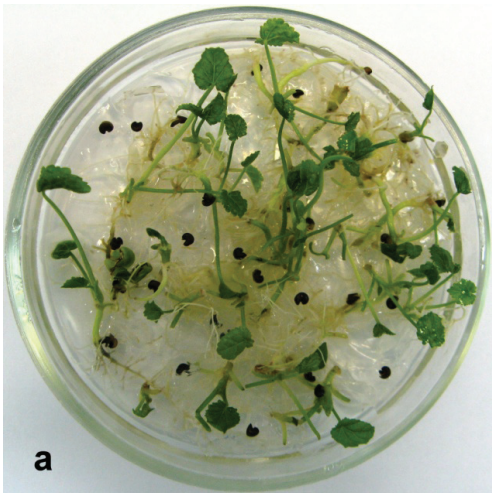


Рис. 1. Вихідні рослини, культивовані *in vitro*, та «бородаті» корені: а, б – *A. officinalis*; в, г – *T. Porrifolius*

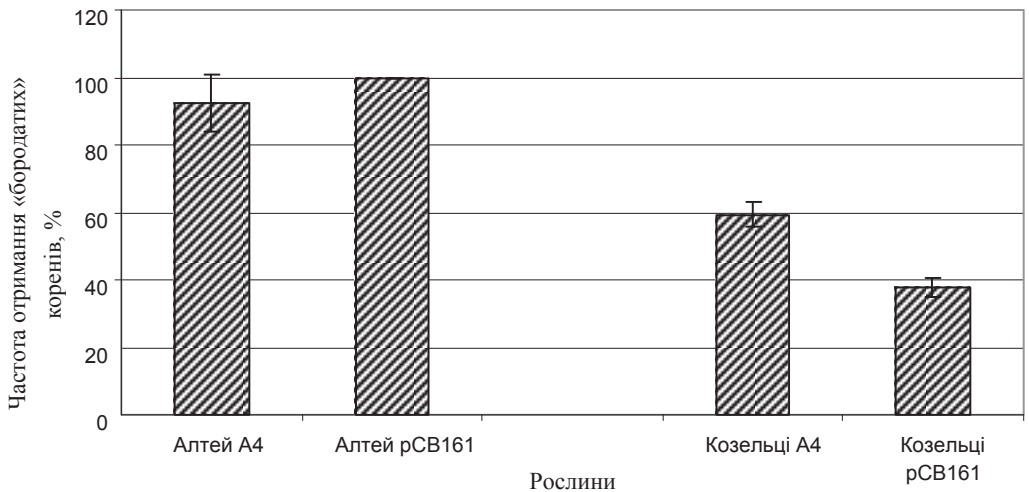


Рис. 2. Частота формування коренів рослин *Tragopogon porrifolius* та *Althaea officinalis* за допомогою *A. rhizogenes* (А4 – дикий штам А4, рСВ161 – агробактерії, які несли вектор рСВ161)

агробактерій, які несли вектор рСВ161 – приріст довжини становив відповідно 5–10 мм та 1–2 мм за 10 діб (рис. 1 б, г).

Частота формування коренів (кількість експлантів, на яких формувалися корені, у відсотках) при використанні *A. rhizogenes* А4 з листків алтею була вищою, ніж з листків козельців, та становила 100% і $59,4 \pm 3,54\%$ відповідно (рис. 2). Так само вищою була частота формування коренів алтею порівняно з козельцями після кокультивування листків з *A. rhizogenes* рСВ161 – $92,5 \pm 8,49\%$ та $37,5 \pm 2,83\%$ відповідно.

Термінальні ділянки коренів довжиною близько 10 мм відділяли від експлантів та переносили на поверхню живильного середовища 1/2МС для нарощування біомаси. Всі отримані корені мали характерний для «бородатих» коренів фенотип – значне розгалуження, відсутність позитивного геотропізму, та росли на середовищі без регуляторів росту, що обумовлено перенесенням у геном рослин ТЛ фрагмента Т-ДНК рRi плазмиди бактерій. Разом із тим корені *T. porrifolius* не мали такої значної

кількості кореневих волосків, як культура коренів алтею.

Відомо, що у «бородатих» коренях може змінюватися синтез запасних сполук порівняно з їхнім синтезом у вихідних рослинах. Результати визначення поліфруктанів (ПФ) у отриманих лініях коренів *A. officinalis* (усього 7 ліній) показали, що лише у двох із них спостерігали підвищення вмісту цих сполук у 1,7 – 2,6 рази (лінії 3 та 5, рис. 3). Для інших ліній відмінності порівняно з контролем були недостовірні.

Вміст ПФ у всіх досліджуваних лініях «бородатих» коренів *T. porrifolius* був значно меншим, ніж у коренях контрольних рослин (у 1,3 – 4,6 рази, рис. 4). Можливо, це пов'язано з низьким темпом росту отриманої культури коренів порівняно з контролем.

Отже, трансформування з використанням *A. rhizogenes* рослин *A. officinalis* та *T. porrifolius* призводило у ряді випадків до зміни вмісту ПФ – як підвищення до 2,6 разів у «бородатих» коренях алтею, так і зменшення до 4,6 разів у культурі коренів козельців.

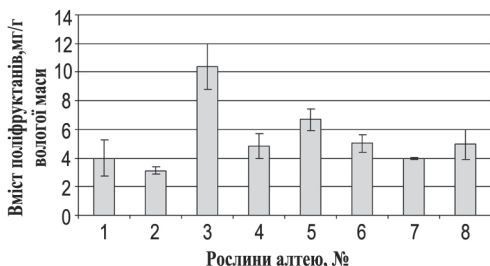


Рис. 3. Вміст поліфруктанів у коренях *A. officinalis*: 1 – корені контрольних рослин; 2 – 4 – корені, отримані після кокультивування з суспензією дикого штаму агробактерій А4; 5 – 8 – корені, отримані після кокультивування з суспензією агробактерій, які несли вектор рСВ161

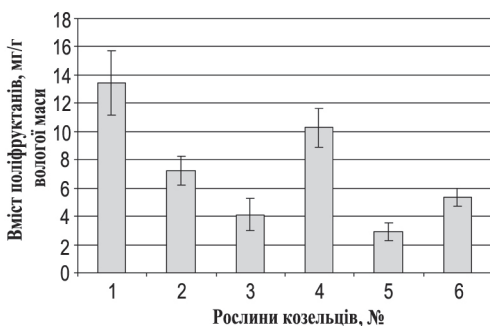


Рис. 4. Вміст поліфруктанів у коренях *T. porrifolius*: 1 – корені контрольних рослин; 2 – 4 – корені, отримані після кокультивування з суспензією агробактерій штаму А4; 5 – 6 – корені, отримані після кокультивування з суспензією агробактерій, які несли вектор рСВ161

Висновки

Отримані результати свідчать про те, що бактерії *A. rhizogenes* як дикого штаму А4, так і бактерії, що несуть чужорідну плазмиду (вектор рСВ161), можуть бути використані для отримання культури «бородатих» коренів рослин *A. officinalis* та *T. porrifolius*. Частота формування коренів на експлантах *A. officinalis* виявилася вищою, ніж рослин *T. porrifolius* – відповідно 92,5 – 100% та 37,5 – 59,4% залежно від використовуваних бактерій.

Вміст поліфруктанів у двох лініях трансгенних коренів *A. officinalis* був вищим, ніж

у контролі, в той час як «бородаті» корені *T. porrifolius* накопичували ці сполуки достовірно менше, ніж корені нетрансформованих рослин.

Перелік літератури

1. Chilton M.D., Drummond M.H., Merlo D.J. et al. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: The molecular basis of crown gall tumorigenesis // Proc.Nat. Acad. Sci. – 1977. – Vol. 11, № 2. – P. 263–271.
2. Matzke A. J., Chilton M. D. Site-specific insertion of genes into T-DNA of the *Agrobacterium* tumor-inducing plasmid: an approach to genetic engineering of higher plant cells // J. Mol. and Appl. Genet. – 1981. – Vol. 1, № 1 – P. 39–49.
3. Bulgakov V.P. Functions of *rol* genes in plant secondary metabolism// Biotechnol Adv. –2008. – Vol. 26, №4. – P. 318–324.
4. Srivastava S., Srivastava A.K. Hairy root culture for mass-production of high-value secondary metabolites // Crit Rev. Biotechnol. – 2007. – Vol. 27, № 1. – P. 29–43.
5. Kuzovkina I.N., Schneider B. Genetically transformed root cultures – generation, properties and application in plant sciences // Progress in Botany. – 2006. – Vol. 67, № 3. – P. 275–314.
6. Guillon S., Trémouillaux-Guiller J., Pati P.K. et al. Hairy root research: recent scenario and exciting prospects // Curr. Opin. Plant Biol. – 2006. – Vol. 9, № 3. – P. 341–346.
7. Christey M.C., Braun R.H. Production of hairy root cultures and transgenic plants by *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation // Methods Mol Biol. – 2005. – Vol. 286, № 1. – P.47–60.
8. Sevyn N., Oksman-Caldentey K.M. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation: root cultures as a source of alkaloids // Planta Med. – 2002. – Vol.68, № 10. – P. 859–868.
9. Mei-Liang Zhou, Xue-Mei Zhu, Ji-Rong Shao et al. Production and metabolic engineering of bioactive substances in plant hairy root culture // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2011. – Vol. 90, № 4. – P. 1229–1239.
10. Giri A., Narasu M. L. Transgenic hairy roots: recent trends and applications // Biotechnology Advances. – 2000. – Vol.18, № 1. – P. 1–22.
11. Hu S.B., Du M. Hairy root and its application in plant genetic engineering // Journal of Integrative Plant Biology. – 2006. – Vol. 48, № 2. – P. 121–127.
12. Chaudhuri K.N., Ghosh B., Tepfer D., Jha S. Genetic transformation of *Tylophora indica* with *Agrobacterium rhizogenes* A4: growth and tylophorine productivity in different transformed

- root clones // Plant Cell Rep. – 2005. – Vol. 24, № 1. – Vol. 25–35.
13. *Batra J., Dutta A., Singh D., Kumar S., Sen J.* Growth and terpenoid indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* hairy root clones in relation to left- and right-termini-linked Ri T-DNA gene integration // Plant Cell Rep. – 2004. – Vol. 23, № 3. – P.148–154.
 14. *Chang C.K., Chang K.S., Lin Y.C., Liu S.Y., Chen C.Y.* Hairy root cultures of *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino: a promising approach for the production of gypenosides as an alternative of ginseng saponins // Biotechnol Lett. – 2005. – Vol. 27, №1. – P.1165–1169.
 15. *Dhakulkar S., Ganapathi T.R., Bhargava S., Bapat V.A.* Induction of hairy roots in *Gmelina arborea* Roxb. and production of verbascoside in hairy roots // Plant Sci. – 2005. – Vol. 169, №5. – P.812–818.
 16. *Lin H.W., Kwok K.H., Doran P.M.* Development of *Linum flavum* hairy root cultures for production of coniferin // Biotechnol Lett. – 2003. – Vol. 25, №7. – P.521–525.
 17. *Satdive R.K., Fulzele D.P., Eapen S.* Enhanced production of azadirachtin by hairy root culture of *Azadirachta indica* A. Juss by elicitation and media optimization // Journal of Biotech. – 2007. – Vol. 28, № 2. – P. 281–289.
 18. *Shi H.P., Kintzios S.* Genetic transformation of *Pueraria phaseoloides* with *Agrobacterium rhizogenes* and puerarin production in hairy roots // Plant Cell Rep. – 2003. – Vol. 21, №11. – P.1103–1107.
 19. *Tenkerian C. A.* Anticancer and Antioxidant Effects of *Tragopogon porrifolius* extract // A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science in Molecular Biology, 2011. – 54 p.
 20. *Zidorn C., Lohwasser U., Pschorr S. et al.* Bibenzyls and dihydroisocoumarins from white salsify (*Tragopogon porrifolius* subsp. *porrifolius*) // Phytochemistry. – 2005. – Vol. 66, № 14. – P. 1691–1697.
 21. *Sareedenchai V., Ganzera M., Ellmerer E.P. et al.* Phenolic compounds from *Tragopogon porrifolius* L. // Biochemical Systematics and Ecology. – 2009. – Vol. 37, № 3. – P. 234–236.
 22. *Alihah S. M., Akhtar Naveed, Akram M. et al.* Pharmacological activity of *Althaea officinalis* L. // J. of Medicinal Plants Research. – 2011. – Vol. 5, № 24. – P. 5662–5666.
 23. *Gudej J.* Flavonoids, phenolic acids and coumarins from the roots of *Althaea officinalis* // Planta Med. – 1991. – Vol. 57 – P. 284–285.
 24. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture // Phys. Plant. – 1962. – Vol. 15, № 3. – P.473–497.
 25. *Luchakivskaya Yu., Kishchenko O., Gerasymenko I., Olevinskaya Z., Simonenko Yu., Spivak M., Kuchuk M.* High-level expression of human interferon alpha-2b in transgenic carrot (*Daucus carota* L.) plants // Plant Cell Rep. – 2011. – Vol. 30, № 3. – P. 407–415.
 26. *Маниатис Т., Фрич Е.Ф., Сэмбрук Дж.* Молекулярное клонирование – М.: Мир, 1984. – 480 с.
 27. *Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П. и др.* Методы биохимического исследования растений. – Л.: Агропромиздат, 1987. – С.143.

Представлено О.М. Тищенко
Надійшла 30.05.2012

ПОЛУЧЕНИЕ «БОРОДАТЫХ» КОРНЕЙ РАСТЕНИЙ TRAGOPOGON PORRIFOLIUS И ALTHAEA OFFICINALIS С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ AGROBACTERIUM RHIZOGENES

Н.А. Матвеева

Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины

Украина, Киев 03680, ул. Академика Заболотного, 148

e-mail: joyna@ukr.net

Цель. Целью работы было получение культуры «бородатых» корней растений *Tragopogon porrifolius* и *Althaea officinalis*. **Методы.** Корни получали путем кокультивирования листьев с суспензией клеток *Agrobacterium rhizogenes*, которые несли вектор pCB161 или штамма A4. Культивирование «бородатых» корней проводили на среде Мурасиге и Скуга с уменьшенным вдвое содержанием макроэлементов. **Результаты.** Через 10–14 дней после трансформации наблюдали формирование корней с частотой 92,5 и 59,4% соответственно для растений *A. officinalis* и *T. porrifolius* при использовании дикого штамма агробактерий, а также 100 и 37,5% при использовании *A. rhizogenes*, которые несли вектор pCB161. В ряде случаев наблюдали изменение содержания полифруктанов – как повышение до 2,6 раза в «бородатых» корнях алтея, так и уменьшение до 4,6 раза в культуре корней козлобородника. **Выводы.** *A. officinalis* и *T. porrifolius* отличались как по скорости корнеобразования, так и по частоте формирова-

ния корней. Максимальная частота получения «бородатых» корней составила 100% при трансформировании *A. officinalis* диким штаммом агробактерий. После трансформации изменялось содержание полифруктанов у части линий «бородатых» корней.

Ключевые слова: *Agrobacterium rhizogenes*, *Tragopogon porrifolius*, *Althaea officinalis*.

GENERATION OF *TRAGOPOGON*
PORRIFOLIUS AND *ALTHAEA OFFICINALIS*
«HAIRY» ROOTS USING *AGROBACTERIUM*
RHIZOGENES

N.A. Matvieieva

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering,
National Academy of Sciences of Ukraine
Ukraine, Kyiv 03680, st. Akademika
Zabolotnogo, 148
e-mail: joyna@ukr.net

Aim. Aim of this work was to generate cultures of *Tragopogon porrifolius* та *Althaea officinalis* «hairy» roots. **Methods.** Roots were generated by co-culturing of leaves with cell suspension of *Agrobacterium rhizogenes* carrying pCB161

vector or with *A. rhizogenes* cells of A4 strain. Selection of transgenic roots was performed on Murashige and Skoog medium with twice reduced content of macrosalts. **Results.** In 10-14 days after transformation when wild strain of *A. rhizogenes* was used there was observed root formation with frequencies for *A. officinalis* and *T. porrifolius* 92.5 and 59.4%, respectively. In case of using *A. rhizogenes* carrying pCB161 vector root formation incidence for these plants was 100 and 37.5%, respectively. In number of cases there were observed changes in polyfructane content: both increase up to 2.6 times in «hairy» *Althaea* roots and decrease down to 4.6 times in *T. porrifolius* tissue culture. **Conclusions.** *A. officinalis* and *T. Porrifolius* plants differed from each other by the rate of root formation and its incidence. Maximal incidence of «hairy» root generation made up 100% upon transformation with wild strain of *A. rhizogenes*. Some of «hairy» root lines following transformation demonstrated changed polyfructane content.

Key words: *Agrobacterium rhizogenes*, *Tragopogon porrifolius*, *Althaea officinalis*.