

УДК 577.13:581.1

## ОСОБЛИВОСТІ НАКОПИЧЕННЯ ПОЛІФРУКТАНІВ У ТРАНСГЕННИХ РОСЛИНАХ ЦИКОРІЮ *CICHORIUM* *INTYBUS* L.

Н.А. МАТВЄЄВА, О.Ю. КВАСКО

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України  
 Україна, 03680, Київ 143, вул. Заболотного, 148  
 e-mail: joyna56@gmail.com

Досліджено відмінності у накопиченні поліфруктанів у коренях та листках трансгенних рослин цикорію *Cichorium intybus* L., отриманих після використання *Agrobacterium rhizogenes* та *A. tumefaciens* з цільовими генами *ifn-α2b* та *esxA*. Порівняно з нетрансформованими рослинами вміст поліфруктанів у трансгенних рослинах був вищим у 3,9 – 26,3 разів (корені) та у 5,3 – 13,3 разів (листки) залежно від цільового гена.

Ключові слова: *Cichorium intybus*, *Agrobacterium rhizogenes*, *A. tumefaciens*, фруктани, генетична трансформація, гени туберкульозних антигенів *ESAT6* та *Ag85B*, ген інтерферону *ifn-α2b*.

**Вступ.** Генетична трансформація рослин, зокрема, агробактеріальна, може розглядатися як комплексний стрес, оскільки при трансформуванні діють такі чинники як поранення рослин, проникнення бактерій, вбудовування бактеріальної ДНК до геному рослини та у подальшому культивування в умовах *in vitro*. Дія цих чинників викликає відповідь рослинного організму у вигляді стресової та адаптивної реакції, яка призводить до змін активності ферментів [1–5], синтезу та накопичення запасних сполук і вторинних метаболітів [6, 7] тощо.

Сполуками, що беруть участь у пристосуванні рослин до дії стресових чинників, є фруктани – кетоцукри, продукти фруктозилювання сахарози. Фруктани є природними метаболітами бактерій, грибів, рослин. Вони виконують функції осморегулятора та антифриза. Інулін (C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>)<sub>n</sub> — високомолекулярний фруктан, в якому молекули D-фруктози з'єднані між собою 2,1-глюкозидними зв'язками та мають термінальну молекулу глюкози [8]. Ця сполука синтезується у рослин класу дводольних, таких як *Cichorium intybus*, *Inula helenium*, *Taraxacum officinalis*, *Helianthus tuberosus*. Синтез фруктанів, їхня полімеризація та гідроліз до фруктози в рослинних клітинах є одним із механізмів пристосування рослин до дії стресових чинників [9–13]. Участь фруктанів у стійкості рослин до абіотичних стресів було досліджено шляхом створення трансгенних рослин, які синтезували ці сполуки [14].

Оскільки генетична трансформація, тобто перенесення та вбудовування чужорідних генів до рослинного геному, є стресовим чинником, становить інтерес дослідити, чи змінюється концентрація запасних кетоцукрів, що беруть участь у реакціях пристосування рослин до дії абіотичних чинників [15], у рослин з трансформованим геномом у порівнянні з вихідними, нетрансформованими

рослинами. Нами було проведено порівняння вмісту поліфруктанів у рослинах цикорію *Cichorium intybus* L., отриманих після трансформації за допомогою *Agrobacterium rhizogenes* або *A. tumefaciens* з різними цільовими генами (*ifn-α2b* та *esxA*), та в контрольних рослинах.

### Матеріали та методи

Трансгенні рослини цикорію отримували шляхом трансформації рослин сорту Пала росса за допомогою *Agrobacterium rhizogenes* A4 (вектор pCB161, цільовий ген інтерферону- $\alpha 2b$ ) [16] та *A. tumefaciens* (вектори pCB124 з геном *ifn-α2b* та pCB063 з геном *esxA* туберкульозного антигена ESAT6) [17, 18] та культивували в умовах *in vitro* на середовищі 1/2МС (середовище Мурасіге та Скуга [19] зі зменшеним вдвічі вмістом макроелементів) при температурі 24 °С та 16-годинному світловому періоді.

Сумарний вміст поліфруктанів визначали через 15 або 45 діб культивування за методикою [20]. Для цього корені або листки висушували при 95 °С протягом 10 хв та досушували при кімнатній температурі до постійної маси. До 100 мг сухого матеріалу додавали 5 мл дистильованої води, 5 мл 0,1 % спиртового розчину резорцину та

5 мл 80 % соляної кислоти, нагрівали на водяній бані 20 хв. Розчини охолоджували та вимірювали інтенсивність забарвлення на фотоелектроколориметрі КФК-2 із зеленим світлофільтром (540 нм). Концентрацію визначали за калібрувальною прямою (калібрування по фруктозі). Виміри проводили у трьох повторностях. Статистичну обробку результатів проводили відповідно [21].

### Результати та обговорення

Через 2 тижні культивування на агаризованому середовищі 1/2МС вміст досліджуваних сполук у «бородатих» коренях цикорію з геном *ifn-α2b*, отриманих після трансформації *A. rhizogenes*, коливався від 41,5±4,5 до 64,4±17,7 мг/г сухої маси (рис. 1, а). При тривалішому культивуванні (45 діб) вміст значно збільшувався та сягав 334,7±36,35 – 388,3±23,2 мг/г (рис. 1, б), причому вирощування рослин на середовищі ½ МС з додаванням 25 мг/л канаміцину (трансформуючий вектор мав ген *nptII*, що зумовлює стійкість рослин до цього антибіотику) достовірно не впливало на синтез кетоцукрів (рис. 1, б, II).

Вміст поліфруктанів у коренях, трансформованих *A. rhizogenes*, у перерахунку на 1 г сухої маси коренів виявився вищим,

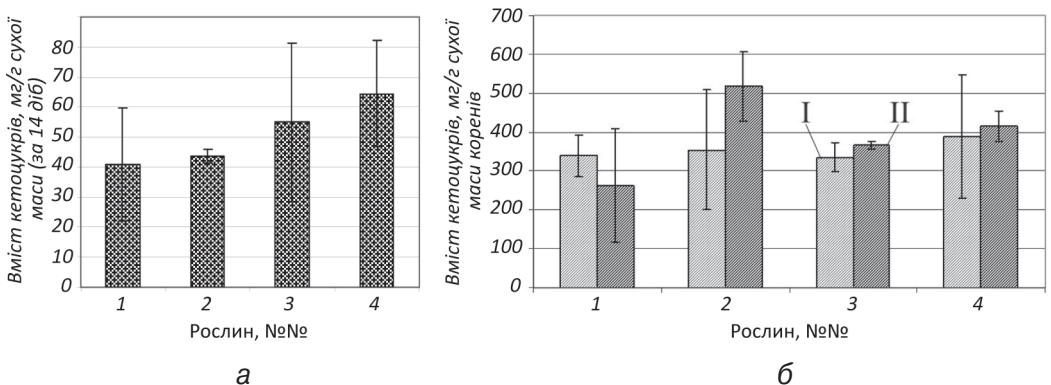
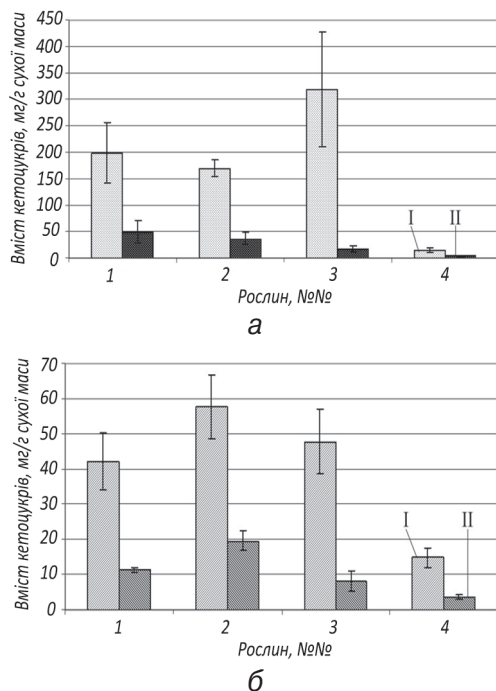


Рис. 1. Вміст поліфруктанів у «бородатих» коренях цикорію, трансформованих *A. rhizogenes* з вектором pCB161 через 14 (а) та 45 діб (б) культивування на середовищі ½ МС (I) та ½ МС з 25 мг/л канаміцину (II)

ніж у коренях частини рослин, отриманих шляхом *A. tumefaciens*-опосередкованої трансформації (вектор pCB124, ген *ifn-α2b*). Так, якщо через 45 діб у досліджуваних ліній «бородатих» коренів вміст максимально сягав  $388,3 \pm 23,2$  мг/г сухої маси (середовище  $\frac{1}{2}$  МС), у коренях рослин, трансформованих *A. tumefaciens* з векторами pCB124 та pCB063, максимальний вміст становив відповідно  $319, 2 \pm 107,0$  та  $57,56 \pm 19,5$  мг/г сухої маси (рис. 2, а та 2, б, I, рослини №1–3), а в коренях контрольних рослин – лише  $14,75 \pm 3,4$  мг/г сухої маси (там же, рослини №4). Такі результати, з одного боку, можуть свідчити про те, що генетична трансформація явилася для досліджуваних рослин стресовим чинником, відповіддю на який стало підвищення вмісту запасних полісахаридів. Разом із тим, суттєве підвищення вмісту запасних полісахаридів (кетоцукрів) у рослин, трансформованих *A. rhizogenes* (до 26 разів) у порівнянні з контролем, можливо, зумовлено не тільки трансформаційним стресом, але й особливостями, які досить часто набувають трансгенні корені, що отримані за допомогою саме *A. rhizogenes*. Відомо, що корені, отримані після трансформації рослин за допомогою цих бактерій, накопичують вторинні метаболіти або запасні сполуки, які властиві для тої чи іншої рослини [22–25], причому в трансформованих коренях вміст таких сполук може бути вищий за вміст в коренях рослин дикої типу. Так, концентрація полісахаридів у трансгенних коренях *Echinacea purpurea* була вищою, ніж у вихідних рослин [26]. Концентрація вітаноліду в трансгенних коренях *Withania somnifera* була більш ніж у 2 рази вищою, ніж у не-трансформованих [27]. Шляхом *A. rhizogenes*-опосередкованої трансформації отримано корені *Glycyrrhiza uralensis* з підвищеним синтезом флавоноїдів [28].

Оскільки фруктани накопичуються саме в коренях рослин цикорію, цілком законо-



**Рис. 2.** Вміст поліфруктанів в коренях (I) та листках (II) рослин цикорію, трансформованих *A. tumefaciens* з вектором pCB124 (а) та pCB063 (б): 1–3 – трансгенні рослини, 4 – контрольні рослини

мірними є результати, що свідчать про значно менший вміст цих сполук у листках, ніж у коренях. Так, у pCB124-трансгенних рослин вміст поліфруктанів у коренях у 1,9 – 6,4 рази був вищим, ніж у листках, у pCB063-рослин – у 2,9 – 5,3 рази вищим, у контрольних рослин – у 4,0 рази вищим.

У коренях усіх аналізованих трансгенних ліній цикорію (трансформованих як *A. rhizogenes*, так і *A. tumefaciens*), що мали різні цільові гени, вміст запасних кетоцукрів перевищував кількість цих сполук у контролі у 26,3; 21,7 та 3,9 разів відповідно у рослин, трансформованих векторами pCB161, pCB124, pCB 063, причому був значно вищим у рослин, що мали ген *ifn-α2b*. Вміст у листках досліджуваних ліній трансгенних рослин також був вищим, ніж вміст у контрольних рослинах – у 5,3 – 13,3 рази.

## Висновки

Очевидно, що генетична трансформація впливає на синтез запасних полісахаридів у рослинах цикорію з модифікованим геномом, призводячи до збільшення накопичення поліфруктанів як у коренях, так і в листках рослин порівняно з нетрансформованими рослинами. Зміни у концентрації поліфруктанів спостерігали як у рослин, отриманих після трансформації *A. tumefaciens*, так і у *A. rhizogenes*-трансформованих рослин. Вірогідно, що таке явище є реакцією рослинного організму на біотичний стрес – генетичну трансформацію за допомогою агробактерій. Застосуванням методу агробактеріальної трансформації можна створити рослини цикорію зі значно вищим вмістом запасних поліфруктанів.

## Перелік літератури

1. Gaspar T., Franck T., Bisbis B. et al. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures // Plant Growth Regulation. – 2002. – Vol.37, № 3. – P. 263–285.
2. Cassels A.C. and Curry R.F. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers// Plant Cell Tissue Organ. Cult. – 2001. – Vol. 64, № 2–3. – P.145–167.
3. Chandru H.K., Kim E., Kuk Y. et al. Kinetics of wound-induced activation of antioxidative enzymes in *Oryza sativa*: differential activation at different growth stages // Plant Sci. – 2003. – Vol. 164, № 6. – P. 935–941.
4. Lamb C., Dixon R.A. The oxidative burst in plant disease resistance // Ann. Rev. of Plant Physiol. and Plant Mol. Biol. – 1997. – Vol.48, № 1. – P. 251–275.
5. Еникеев А.Г., Копытина Т.В., Семенова Л.А. и др. Агробактериальная трансформация как комплексный биотический стрессирующий фактор // Журнал стресс-физиологии и биохимии. – 2008. – Т.4, № 1. – С. 11- 19.
6. Кунах В.А. Геномная изменчивость и накопление индолиновых алкалоидов в культуре клеток рауфольфии змеиной, *Raufofia serpentine* Benth.// Биополимеры и клетка. – 1994. – Т.10, № 1. – С.3–30.
7. Булгаков В.П., Журавлев Ю.Н. Культуры трансформированных клеток растений как новый источник продуктов вторичного метаболизма // Успехи современной биологии. – 1992. – Т. 112, вып. 3. – С. 342–349.
8. Van den Ende W., Michiels A., De Roover J., Van Laere A. Fructan biosynthetic and breakdown enzymes in dicots evolved from different invertases. Expression of functional genes throughout chicory development // Sci. World J. – 2002. – Vol.11, № 2. – P. 1273–1287.
9. De Roover J., Vandenbranden K., Van Laere A., Van den Ende W. Drought induces fructan synthesis and 1-SST (sucrose:sucrose fructosyltransferase) in roots and leaves of chicory seedlings (*Cichorium intybus* L.) // Planta. – 2000. – Vol. 210, № 5. – P. 808–814.
10. Gonzalez B., Boucaud J., Salette J., Langlois J. Fructan and cryoprotection in ryegrass (*Lolium perenne* L.) // New Phytol. – 1990. – Vol. 115, № 2. – P. 319–323.
11. Portesa M. T., de Cássia R., Figueiredo-Ribeiro L., de Carvalho M.A.M. Low temperature and defoliation affect fructan-metabolizing enzymes in different regions of the rhizophores of *Vernonia herbacea* // J. of Plant Physiol. – 2008. – Vol.165, № 15. – P. 1572–1581.
12. Hinch D.K., Zuther E., Hellwege E.M., Heyer A. Specific effects of fructo- and glucooligosaccharides in the preservation of liposomes during drying // Glycobiol. – 2002. – Vol.12, № 2. – P.103–110.
13. Pollock C. J., Cairns A. J., Collis B. E., Walk R. P. Direct effects of low temperature upon components of fructan metabolism in leaves of *Lolium temulentum* // J. of Plant Physiol. – 1989. – Vol.134, № 1. – 203–208.
14. Pilon-Smits E.A.H., Ebskamp M.J.M., Paul M.J. et al. Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress // Plant Physiol. – 1995. – Vol.107, № 1. – P.125–130.
15. Livingston D. P., Hinch D. K., Heyer A. G. Fructan and its relationship to abiotic stress tolerance in plants // Cell. Mol. Life Sci. – 2009. – Vol. 66, № 13. – P. 2007–2023.
16. Матвеева Н.А., Кваско Е.Ю., Шаховский А.М., Герасименко И.М. Культура бородатых корней цикория с геном интерферона человека // Український біохімічний журнал. – 2010. – Т. 82, № 4, (Додаток 2). – С.278.
17. Матвеева Н.А., Шаховський А.М., Герасименко І.М. та ін. Перенесення гена біосинтезу інтерферону- $\alpha 2b$  в рослини цикорію (*Cichorium intybus* L.) методом агробактеріальної трансформації

- ції // Біополімери і клітина. – 2009. – Т. 25, № 2. – С. 120–125.
18. Матвеева Н.А., Василенко М.Ю., Шаховский А.М. и др. Эффективная агробактериальная трансформация растений цикория (*Cichorium intybus* L.) вектором с геном туберкулезного антигена ESAT6 // Цитология и генетика. – 2011.- Т. 45, № 1. – С. 11–17.
  19. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture // Phys. Plant. – 1962. – 15, N. 3. – P.473–497.
  20. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П. и др. Методы биохимического исследования растений. – Л.: Агропромиздат, 1987. – С.143.
  21. Лакин Г.Ф. Биометрия – М.: Высш. школа. – 1990. – 352 с.
  22. Giri A., Lakshmi Narasu M. Transgenic hairy roots: recent trends and applications // Biotechnol. Adv. – 2000. – Vol. 18, № 1. – P. 1–22.
  23. Chashmi N.A., Sharifi M., Karimi F., Rahnama H. Differential production of tropane alkaloids in hairy roots and in vitro cultured two accessions of *Atropa belladonna* L. under nitrate treatments // Z. Naturforsch. – 2010. – Vol. 65, № 5–6. – P. 373–379.
  24. Bulgakov V.P., Shkryl Y.N., Veremeichik G.N. Engineering high yields of secondary metabolites in *Rubia* cell cultures through transformation with *rol* genes // Meth. Mol. Biol. – 2010. – Vol. 643, № 1. – P. 229–242.
  25. Wang C.T., Liu H., Gao X.S., Zhang H.X. Overexpression of G10H and ORCA3 in the hairy roots of *Catharanthus roseus* improves catharanthine production // Plant Cell Rep. – 2010. – Vol. 29, № 8. – P. 887–894.
  26. Wang B., Zhang G., Zhu L., Chen L., Zhang Y. Genetic transformation of *Echinacea purpurea* with *Agrobacterium rhizogenes* and bioactive ingredient analysis in transformed cultures // Colloids Surf. B Biointerfaces. – 2006. – Vol. 53, № 1. – P.101–104.
  27. Murthy H.N., Dijkstra C., Anthony P. et al. Establishment of *Withania somnifera* hairy root cultures for the production of withanolide A // J. Integr. Plant Biol. – 2008. – Vol. 50, № 8. – P.975–981.
  28. Zhang H.C., Liu J.M., Lu H.Y., Gao S.L. Enhanced flavonoid production in hairy root cultures of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch by combining the overexpression of chalcone isomerase gene with the elicitation treatment // Plant Cell Rep. – 2009. – Vol.28, № 8. – P. 1205–1213.

Представлено В.А. Кунахом  
Надійшла 09.02.2011

ОСОБЕННОСТИ НАКОПЛЕНИЯ  
ПОЛИФРУКТАНОВ В ТРАНСГЕННЫХ  
РАСТЕНИЯХ ЦИКОРИЯ *CICHORIUM  
INTYBUS* L.

Н.А.Матвеева, Е.Ю.Кваско

Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины  
Украина, 03680, Киев 143, ул. Заболотного, 148  
e-mail: joyna56@gmail.com

Изучены отличия в накоплении полифруктанов в корнях и листьях трансгенных растений цикория *Cichorium intybus* L., полученных после использования для трансформации *Agrobacterium rhizogenes* и *A. tumefaciens* с целевыми генами *ifn-α2b* и *esxA*. По сравнению с нетрансформированными растениями содержание полифруктанов в трансгенных растениях было выше в 3, 9–26,3 раза в корнях и в 5,3–13,3 раза в листьях в зависимости от перенесенного целевого гена.

**Ключевые слова:** *Cichorium intybus*, *Agrobacterium rhizogenes*, *A. tumefaciens*, фруктаны, генетическая трансформация, гены туберкулезных антигенов ESAT6 и Ag85B, ген интерферона *ifn-α2b*.

FEATURES OF POLYFRUCTANES  
ACCUMULATION IN TRANSGENIC PLANTS  
OF CHICORY *CICHORIUM INTYBUS* L.

Н.А.Матвеева, О.Ю.Кваско

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of National Academy of Sciences of Ukraine  
03680, Ukraine, Kyiv, Zabolotnogo str., 148  
E-mail: joyna56@gmail.com

Differences in polyfructanes accumulation in roots and leaves of chicory *Cichorium intybus* L. transgenic plants, received after *Agrobacterium rhizogenes*- and *A. tumefaciens*-mediated transformation with target genes *ifn-α2b* and *esxA* have been investigated. In comparison with not transformed plants the polyfructanes maintenance in transgenic plants was 3,9–26,3 times higher in roots and 5,3–13,3 times higher in leaves depending on the transferred target gene.

**Key words:** *Cichorium intybus*, *Agrobacterium rhizogenes*, *A. tumefaciens*, fructans, genetic transformation, genes of tuberculosis antigens ESAT6 and Ag85B, *ifn-α2b* gene.