

УДК 575.222.7:581.1

## ВПЛИВ *AGROBACTERIUM RHIZOGENES*-ОПОСЕРЕДКОВАНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ НА ВМІСТ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ СПОЛУК У ТРАНСГЕННИХ КОРЕНЯХ *ARTEMISIA VULGARIS* L.

К.О. ДРОБОТ<sup>1</sup>, А.М. ОСТАПЧУК<sup>2</sup>, В.П. ДУПЛІЙ<sup>1</sup>, Н.А. МАТВЄЄВА<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Інститут клітинної біології та генетичної інженерії Національної академії наук України

03680 Київ, вул. Академіка Заболотного, 148

<sup>2</sup>Інститут мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного Національної академії наук України

03680 Київ, вул. Академіка Заболотного, 154

e-mail: katyadrobot@gmail.com

Визначено вміст артемізиніну й фруктанів у культурі трансгенних коренів *Artemisia vulgaris* L. та антиоксидантну активність (АОА) екстрактів цих коренів. Трансформацію здійснено диким штамом *Agrobacterium rhizogenes* A4 й агробактеріями, що несли ген інтерферону- $\alpha 2b$  людини (*ifn- $\alpha 2b$* ). Лінії трансгенних коренів *A. vulgaris* значно відрізнялися за вмістом біологічно активних сполук: артемізиніну (0,237—1,020 та 0,687 мг/г сухої речовини відповідно у трансгенних лініях і контролі) та фруктанів (32—136 та 264 мг/г сухої речовини відповідно у трансгенних лініях і контролі), проте не відрізнялися за рівнем АОА, яка коливалася в межах 55—74 % у трансгенних лініях за 66 % у контролі. Ці дані підтвердили, що методом *A. rhizogenes*-опосередкованої трансформації можна отримати трансгенні корені *A. vulgaris* із підвищеним вмістом артемізиніну — сполуки з антималярійними властивостями.

**Ключові слова:** *Artemisia vulgaris* L., культура трансгенних коренів, артемізинін, фруктани, антиоксидантна активність.

Біотехнологія — один із найперспективніших напрямів сучасної науки, головною метою якого є поліпшення якості природної сировини для забезпечення потреб людини. Сучасна біотехнологія рослин охоплює цілу низку напрямів, серед яких: мікроклональне розмноження рослин, збереження генофонду рідкісних видів, пришвидшення селекційного процесу, генетична модифікація рослин з метою отримання поліпшених генотипів. Біотехнологічні рослини, зокрема лікарські, є джерелом біологічно активних сполук рослинного походження. Застосування цих рослин у генетичній інженерії може бути економічно вигідним, оскільки вони природно синтезують сполуки з лікувальними й профілактичними властивостями, а методами генетичної трансформації вміст цих сполук можна підвищити.

Полин звичайний *Artemisia vulgaris* L. (Asteraceae) — багаторічна рослина, яка росте по всій території України. Препарати полину звичайного є біологічно активними, заспокійливо діють на нервову систему, виявляють легку снодійну та потогінну дію, збуджують апетит, регулюють діяльність травного каналу [11]. Рослини роду *Artemisia* продукують ар-

темізинін — цінну сполуку з антималярійними властивостями, за дослідження якого у 2015 р. було присуджено Нобелівську премію в галузі медицини та фізіології. За останні роки значно збільшилось число робіт, присвячених дослідженню вмісту артемізиніну в різних видах полину, а також робляться спроби інтенсифікації його біосинтезу. Незважаючи на підвищений інтерес до *A. vulgaris* як рослини з антималярійними властивостями, нині відсутні дослідження інших біологічно активних сполук (БАС) у трансгенних коренях рослин цього виду. Разом з тим рослини родини Asteraceae, до яких належить і *A. vulgaris*, відомі своєю здатністю синтезувати й накопичувати фруктозовмісні цукри. Фруктани рослинного походження виявляють імуномодулюючу, протипухлинну, пребіотичну, гепатопротекторну та протизапальну активності [15, 16, 21]. Такий широкий спектр дії робить їх цінним рослинним метаболітом з погляду біотехнології та медицини. Зручною біотехнологічною системою для синтезу і накопичення БАС, зокрема фруктанів, можуть бути трансгенні корені рослин родини Asteraceae, які отримують шляхом *Agrobacterium rhizogenes*-опосередкованої трансформації.

Відомо, що *Agrobacterium*-опосередкована трансформація є комплексним стресовим чинником у зв'язку з пораненням експлантатів, їх контактом із фітопатогеном і перенесенням чужорідного гена до геному рослини-реципієнта. У відповідь на це може змінюватись і антиоксидантний статус рослини. Стресовий стан супроводжується накопиченням активних форм кисню, при цьому знешкоджувальними агентами виступають антиоксидантні ферменти [6, 19]. Наприклад, у трансгенних рослинах тютюну підвищувалась активність пероксидази порівняно з нетрансгенними рослинами [17], а в клітинах *Rubia cordifolia*, *Panax ginseng* та *Arabidopsis thaliana* з геном *rolB*, що експресується, підвищувався рівень експресії генів пероксидази, супероксиддисмутази і каталази, що свідчило про зміну антиоксидантного статусу рослини в результаті генетичної трансформації [8].

Отже, генетична трансформація може призвести до змін синтезу БАС у клітинах рослин. Разом з тим досі не досліджено особливості впливу *A. rhizogenes*-опосередкованої трансформації на вміст комплексу БАС, зокрема артемізиніну, фруктанів, а також рівня АОА у трансгенних коренях *A. vulgaris*. Виходячи з цього, метою нашої роботи було визначення впливу генетичної трансформації на накопичення низки БАС у різних лініях бородатих коренів *A. vulgaris*, отриманих шляхом *A. rhizogenes*-опосередкованої трансформації з використанням векторів pCB124 і pCB161, що несли ген інтерферону- $\alpha 2b$  людини (*ifn- $\alpha 2b$* ), а також дикого штаму *A. rhizogenes* A4.

## Методика

Культура трансгенних коренів отримана нами раніше [1] шляхом *A. rhizogenes*-опосередкованої трансформації з використанням векторів pCB 124 [18] і pCB 161 [13], що несли ген інтерферону- $\alpha 2b$  людини (*ifn- $\alpha 2b$* ) та ген неоміцинфосфотрансферази II (*nptII*), а також дикого штаму *A. rhizogenes* A4. Корені культивували в умовах *in vitro* на поживному середовищі Мурасиге—Скуга [20] зі зменшеним удвічі вмістом макросолей протягом 30 діб за температури  $24 \pm 2$  °C.

Екстракти готували з подрібнених ліофілізованих коренів, до яких додавали дистильовану воду і залишали на 1 год за кімнатної температури. Після цього зразки використовували для визначення вмісту фрук-

танів (проба Селіванова [3]) та антиоксидантної активності методом DPPH [7]. Оптичну густину зразків вимірювали за допомогою спектрофотометра Eppendorf BioPhotometer Plus за довжини хвилі 550 нм. Для визначення вмісту артемізиніну ліофілізовані корені подрібнювали, додавали етиловий ефір оцтової кислоти у співвідношенні 1 : 40, екстрагували протягом 20 хв, фільтрували з використанням вакуумного насоса. Отриманий розчин випарювали на центрифужному ротаційному випарувачі Speed Savant AES 2010 (Labconco, USA) до повного видалення розчинника. Осад розчиняли в 2 мл ацетонітрилу. Хроматографічні дослідження проводили з використанням високоефективного рідинного хроматографа Agilent 1200 (Agilent Technologies, США) з розділенням зразків на SB-C18 (2,1 мм, 30 мм, 5 мкм) з мобільною фазою ацетонітрил/метанол/вода (50/20/30 V/V).

Всі вимірювання проводили у трьох повтореннях. До даних, виражених у відсотках, застосовували арксинусне перетворення [22]. Для дисперсійного аналізу [12] і порівняння середніх значень у вибірках за критерієм Стьюдента [4] використовували інтерпретатор мови програмування R [14] версії 3.0.2.

### Результати та обговорення

Дослідженнями виявлено, що в трансгенних коренях *A. vulgaris* синтезувалися артемізинін, фруктани і сполуки з антиоксидантними властивостями. Різні лінії бородатих коренів *A. vulgaris* відрізнялися за рівнем накопичення артемізиніну. В деяких випадках вміст сполуки підвищувався максимально до 1,020 мг/г сухої речовини (для порівняння: в контролі він становив 0,687 мг/г сухої речовини). Визначено також, що можливе і зменшення вмісту артемізиніну, зокрема у лінії рСВ 124 № 2 до 0,237 мг/г сухої речовини. Вміст артемізиніну не залежав від використання дикого штаму А4 або агробактерій, що містили вектори рСВ 161 і рСВ 124. Отже, вірогідно, зміни вмісту артемізиніну індуковані саме процесом генетичної трансформації, а не інтеграції в геном генів (*ifn-α2b*, *nptII*). Це узгоджується з результатами досліджень, в яких продемонстровано зміни фізіологічного й біохімічного статусів трансгенних коренів, впливу на клітинний метаболізм і рівень синтезу БАС [5, 10].

Аналіз вмісту поліфруктанів у різних лініях трансгенних коренів *A. vulgaris* свідчить про значну варіабельність за цим показником (рис. 1). Слід підкреслити, що в усіх досліджених лініях ці сполуки накопичувалися у значно менших кількостях, ніж у коренях контрольних нетрансформованих рослин. Вірогідно, це може бути пов'язано зі значною швидкістю росту культури «бородатих» коренів, що здатне призвести до зменшення накопичення фруктанів. Вміст цих сполук коливався у межах  $32,04 \pm 4,15 \dots 136,13 \pm 9,44$  мг/г сухої речовини у трансгенних лініях *A. vulgaris* (за  $263,88 \pm 5,72$  мг/г сухої речовини в контролі) і так само, як і вміст артемізиніну, не залежав від використаного для трансформації вектора. Слід зазначити, що вектори, використані при генетичній трансформації, не несли специфічних генів [9], які впливають на рівень синтезу фруктанів. Отже, у виконаних нами дослідженнях не можна було очікувати значних змін метаболізму й істотного підвищення рівня цих сполук. Разом з тим наші дані підтвердили, що генетична трансформація без використання специфічних генів, що кодують синтез фруктанів, здатна змінювати рівень накопичення цих сполук. Зокрема, зміни в

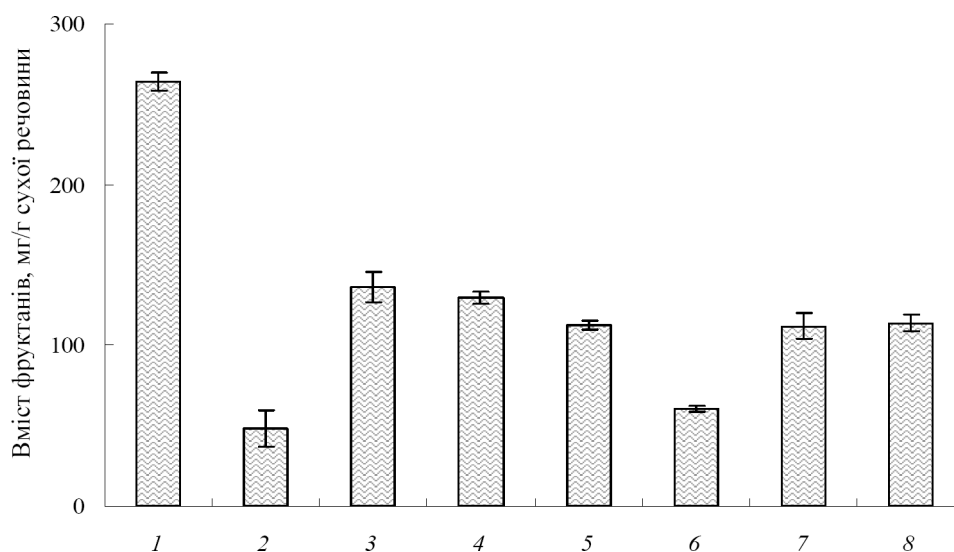


Рис. 1. Вміст фруктанів у трансгенних коренях *A. vulgaris* L. Тут і на рис. 2:

1 — контроль; 2–5 — трансгенні корені, отримані з використанням *A. rhizogenes* (pCB 161); 6, 7 — трансгенні корені, отримані за допомогою штаму *A. rhizogenes* A4; 8 — трансгенні корені, отримані з використанням *A. rhizogenes* (pCB 124)

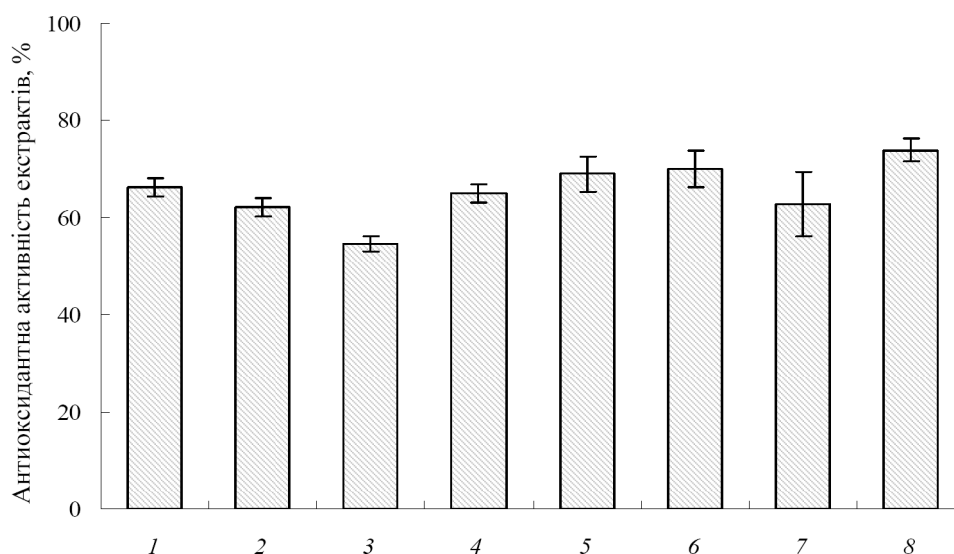


Рис. 2. Антиоксидантна активність екстрактів із трансгенних коренів *A. vulgaris* L.

накопиченні фруктанів у культурах трансгенних коренів *Cichorium intybus* L., *Lactuca sativa* L., *Tragopogon porrifolius* L., *Althaea officinalis* L., *Linaria maroccana* L. ми визначили раніше [2].

Рівень АОА в контролі становив 66,2 %, у лініях трансгенних коренів коливався в межах 54,65–73,95 % і не залежав від використаного вектора (рис. 2). Різниця середніх значень АОА в екстрактах із трансформованих і нетрансформованих коренів *A. vulgaris* знаходилась у межах статистичної похибки. Серед екстрактів різних трансгенних ліній *A. vul-*

*garis* вірогідної різниці між значеннями АОА також не виявлено. Отже, *A. rhizogenes*-опосередкована трансформація не призводила до вірогідних змін антиоксидантної активності.

Таким чином, лінії трансгенних коренів *A. vulgaris* значно відрізнялися за вмістом БАС артемізиніну і фруктанів, проте не відрізнялися за рівнем АОА. Збільшення вмісту артемізиніну і зменшення вмісту фруктанів не залежало від використаних агробактерій — дикого штаму А4 чи *A. rhizogenes* з векторами рСВ 161 і рСВ 124. Виявлені відмінності не були індуковані наявністю генів *ifn-α2b*, *nptII*, а стали результатом самого процесу генетичної трансформації з використанням агробактерій. Отримані нами дані підтвердили, що методом *A. rhizogenes*-опосередкованої трансформації можна отримати трансгенні корені *A. vulgaris* з підвищеним вмістом артемізиніну — сполуки з антималярійними властивостями.

1. Дробот К.О., Шаховський А.М., Матвеева Н.А. Отримання культури «бородатих» коренів рослин полину звичайного з використанням *Agrobacterium rhizogenes* з геном *ifn-α2b* людини // Фактори експериментальної еволюції організмів. — К.: Логос, 2015. — 17. — С. 145—147.
2. Матвеева Н.А., Дробот К.О. Накопичення фруктозовмісних вуглеводів в культурі трансгенних коренів лікарських рослин // Физиология растений и генетика. — 2015. — 47, № 1. — С. 74—79.
3. Рево А.Я. Качественные микрохимические реакции: Практикум по орг. химии. — М.: Высш. шк., 1971. — 208 с.
4. Ромакін В.В. Комп'ютерний аналіз даних: Навч. посіб. — Миколаїв: Вид-во Миколаїв. держ. гуманіт. ун-ту ім. Петра Могили, 2006. — 144 с.
5. Batra J., Dutta A., Singh D. Growth and terpenoid indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* hairy root clones in relation to left — and right-terminilinked Ri T-DNA gene integration // Plant Cell Rep. — 2004. — 23, N 3. — P. 148—154.
6. Bowler C., Montagu M.V., Inze D. Superoxide dismutases and stress tolerance // Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol. — 1992. — 43, N 1. — P. 83—116.
7. Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity // Lebensmittel Wissenschaft und Technol. — 1995. — 28, N 1. — P. 25—30.
8. Bulgakov V.P., Gorpenchenko T.Y., Veremeichik G.N. et al. The *rolB* gene suppresses reactive oxygen species in transformed plant cells through the sustained activation of antioxidant defense // Plant Physiol. — 2012. — 158, N 3. — P. 1371—1381.
9. Cairns A.J. Fructan biosynthesis in transgenic plants // J. Exp. Bot. — 2003. — 54, N 382. — P. 549—567.
10. Chaudhuri K.N., Ghosh B., Tepfer D., Jha S. Spontaneous plant regeneration in transformed roots and calli from *Tylophora indica*: changes in morphological phenotype and tylophorine accumulation associated with transformation by *Agrobacterium rhizogenes* // Plant Cell Rep. — 2006. — 25, N 10. — P. 1059—1066.
11. Erichsen-Brown C. Medicinal and Other Uses of North American Plants: A Historical Survey with Special Reference to the Eastern Indian Tribes. — N.Y.: Dover Publications Inc., 1979. — 513 p.
12. Fisher R.A. The correlation between relatives on the supposition of Mendelian inheritance // Philosophical Transactions Royal Society Edinburgh. — 1918. — 52, N 1. — P. 399—433.
13. Gerasymenko I.M., Sakhno L.O., Mazur M.G., Sheludko Y.V. Multiplex PCR assay for detection of human interferon alpha-2b gene in transgenic plants // Cytol. and Genet. — 2012. — 46, N 4. — P. 197—201.
14. Ihaka R., Gentleman R.R. A language for data analysis and graphics // J. Computational Graphical Statistics. — 1996. — 5, N 3. — P. 299—314.
15. Kaur N., Gupta A.K. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition // J. Biosci. — 2002. — 27, N 7. — P. 703—714.
16. Kelly G. Inulin-type prebiotics: a review // Alternative Med. Rev. — 2008. — 13, N 4. — P. 315—329.
17. Lagrimini L.M., Bradford S., Rothstein S. Peroxidase-induced wilting in transgenic tobacco plants // Plant Cell. — 1990. — 2, N 1. — P. 7—18.
18. Luchakivskaya Yu., Kishchenko O., Gerasymenko I. et al. High-level expression of human interferon alpha-2b in transgenic carrot (*Daucus carota* L.) plants // Plant Cell Rep. — 2011. — 30, N 3. — P. 407—415.

19. Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance // Trends Plant Sci. — 2002. — 7, N 9. — P. 405—410.
20. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures // J. Plant Physiol. — 1962. — 15, N 3. — P. 473—497.
21. Roberfroid M.B. Introducing inulin-type fructans // British J. Nutr. — 2005. — 93, N 1. — P. 13—25.
22. Sokal R.R., Rohlf J.F. Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research. 2nd ed. — San Francisco: W.H. Freeman and Company, 1981. — 859 p.

Отримано 17.03.2016

ВЛИЯНИЕ *AGROBACTERIUM RHIZOGENES*-ОПОСРЕДОВАННОЙ  
ТРАНСФОРМАЦИИ НА СОДЕРЖАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ  
СОЕДИНЕНИЙ В ТРАНСГЕННЫХ КОРНЯХ *ARTEMISIA VULGARIS* L.

Е.А. Дробот<sup>1</sup>, А.Н. Остапчук<sup>2</sup>, В.П. Дуплий<sup>1</sup>, Н.А. Матвеева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт клеточной биологии и генетической инженерии Национальной академии наук Украины, Киев

<sup>2</sup>Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного Национальной академии наук Украины, Киев

Определено содержание артемизинина и фруктанов в культуре трансгенных корней *Artemisia vulgaris* L. и антиоксидантную активность (АОА) экстрактов этих корней. Трансформация осуществлена диким штаммом *Agrobacterium rhizogenes* A4 и агробактериями, которые несли ген интерферона- $\alpha 2b$  человека (*ifn- $\alpha 2b$* ). Линии трансгенных корней *A. vulgaris* значительно отличались по содержанию биологически активных соединений: артемизинина (0,237—1,020 и 0,687 мг/г сухого вещества соответственно в трансгенных линиях и контроле) и фруктанов (32—136 и 264 мг/г сухого вещества соответственно в трансгенных линиях и контроле), однако не отличались по уровню АОА, которая колебалась в пределах 55—74 % в трансгенных линиях при 66 % в контроле. Эти данные подтвердили, что методом *A. rhizogenes*-опосредованной трансформации можно получить трансгенные корни *A. vulgaris* с повышенным содержанием артемизинина — соединения с антималярийными свойствами.

EFFECT OF *AGROBACTERIUM RHIZOGENES*-MEDIATED TRANSFORMATION ON  
THE BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS CONTENT IN *ARTEMISIA VULGARIS* L.  
TRANSGENIC ROOTS

K.O. Drobot<sup>1</sup>, A.M. Ostapchuk<sup>2</sup>, V.P. Duplij<sup>1</sup>, N.A. Matvieieva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine  
148 Zabolotnogo St., Kyiv, 03680, Ukraine

<sup>2</sup>D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine  
154 Zabolotnogo St., Kyiv, 03680, Ukraine

Antioxidant activity, polyfructan and artemisinin content in the hairy root culture of *Artemisia vulgaris* L. were determined. Transgenic roots were obtained earlier using genetic transformation by *Agrobacterium rhizogenes* carrying *ifn- $\alpha 2b$*  gene (pCB124 and pCB161 vectors) as well as *A. rhizogenes* A4 wild strain. Genetic transformation resulted in changes in artemisinin (0,237—1,02 and 0,687 mg/g dry weight in transformed and control roots respectively) and fructan (32—136 and 264 mg/g dry weight in transformed and control roots respectively) content. The genetic transformation didn't affect antioxidant activity of extracts (55—74 % in transgenic root extracts and 66 % in control). Such changes in biological active compounds content in transgenic root lines didn't depend on the vector used. This results suggest the possibility of *Agrobacterium rhizogenes* using for obtaining *Artemisia vulgaris* L. hairy root culture with higher artemisinin content.

*Key words:* *Artemisia vulgaris* L., hairy root culture, artemisinin, fructans, antioxidant activity.