

УДК 575.222.7:581.1

ПОРІВНЯЛЬНЕ ОЦІНЮВАННЯ ВМІСТУ ПОЛІФРУКТАНІВ У «БОРОДАТИХ» КОРЕНЯХ І РОСЛИНАХ РОДУ *ARTEMISIA*

В.П. ДУПЛІЙ, К.О. ДРОБОТ, Я.І. РАТУШНЯК, Н.А. МАТВЄЄВА

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

Виконано порівняльне оцінювання вмісту поліфруктанів у трансгенних коренях і нетрансформованих рослинах *Artemisia annua*, *A. tilesii*, *A. dracunculus*, *A. ludoviciana*, *A. absinthium* двома простими методами візуалізації даних. Методом «план експерименту» встановлено варіативність досліджуваного параметра залежно від градацій кожного з чинників експерименту (біологічний вид, генетичний вектор/частина рослини, колекційний зразок). За допомогою точкової діаграми Клівленда оцінено мінливість накопичення фруктанів для кожного з досліджуваних чинників. Найвищий вміст поліфруктанів зафіксовано в коренях і листках контрольних рослин *A. annua* (відповідно 39,4 і 32,5 мг/г сирової речовини), найнижчий — у «бородатих» коренях *A. dracunculus*, отриманих методом генетичної трансформації з використанням дикого штаму агробактерій A4 (6,4 мг/г), і в листках контрольних рослин *A. ludoviciana* (6,5 мг/г). Найбільшу варіативність вмісту фруктанів визначено у зразках *A. annua*, найменшу — в *A. dracunculus*. Широкий діапазон значень вимірюваного параметра зафіксовано в коренях контрольних рослин. Застосовані методи придатні для первинного оцінювання масиву експериментальних даних.

Ключові слова: *Artemisia* spp., поліфруктани, методи візуалізації даних.

Метод *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації, який базується на здатності ґрунтових бактерій *Agrobacterium rhizogenes* родини Rhizobiaceae переносити частину свого геному до клітин рослин, застосовують близько 50 років, це перший розроблений метод перенесення чужорідних генів. Нині його використовують для отримання культур «бородатих» коренів різних видів [7]. Методом генетичної трансформації рослин за допомогою *A. rhizogenes* можна переносити не тільки бактеріальну Т-ДНК онкоплазмиди pRi, а й Т-ДНК бінарних векторів, які несуть цільові гени [8]. Визначено, що трансгенні корені, отримані після генетичної трансформації рослин за допомогою *A. rhizogenes*, накопичують вторинні метаболіти або запасні сполуки, властиві тій чи іншій рослині [4, 6, 12, 20], причому вміст у них таких сполук може бути вищим, ніж у коренях нетрансформованих рослин. Цей факт привертає особливу увагу, оскільки можна отримати «бородаті» корені, що є продуцентами цінних сполук із лікувальними властивостями. До таких сполук належать фруктани — полісахариди, молекули яких побудовані із залишків D-фруктози. Вони синтезуються численними видами рослин, зокрема рослинами роду *Artemisia*, є біологічно активними і застосовуються як дієтичні добавки

при порушеннях вуглеводного обміну, дисбактеріозах, діабеті, серцево-судинних захворюваннях та ін. [13, 16, 18, 19].

У результаті генетичної трансформації зазвичай отримують багато ліній трансгенних коренів, які відрізняються за параметрами росту та накопиченням цільових сполук [14]. Крім того, під час експериментів з вивчення вмісту таких сполук досліджують лінії різних біологічних видів, вплив перенесених векторів та умов генетичної трансформації [1]. Отже, виникає потреба порівняння отриманих коренів за певними ознаками, зокрема за вмістом фруктанів, у складній системі чинників, що впливають на накопичення цих речовин. Таке порівняння здійснюють методами математичної статистики за наявності потрібного обсягу експериментальних даних. Проте перші оцінки можна дати ще під час проведення дослідження, скориставшись простими методами візуалізації даних. У цій роботі ми розглянули можливість та ефективність використання двох із них [9, 11] для порівняльного оцінювання вмісту фруктанів у трансгенних коренях рослин різних видів і контрольних нетрансформованих рослинах та візуалізації отриманих результатів.

Методика

Рослини *Artemisia annua*, *A. tilesii*, *A. dracunculus*, *A. ludoviciana*, *A. absinthium* та їх «бородаті» корені, які ми отримали раніше [1, 10], вирощували на поживному середовищі Мурасиге—Скуга [15] зі зменшеним удвічі вмістом макросолей. Культивування проводили за температури +24 °С та 16-годинного освітлення протягом трьох тижнів. Як контрольні рослини використовували двотижневі проростки (листки та корені). Вміст поліфруктанів у «бородатих» коренях і контрольних рослинах визначали за методикою [2]. Корені гомогенізували з дистильованою водою і залишали на 30 хв для екстрагування. До зразків добавляли 0,1 %-й спиртовий розчин резорцину, нагрівали на водяній бані при температурі 90 °С протягом 10 хв, охолоджували й вимірювали інтенсивність забарвлення за довжини хвилі 540 нм. Концентрацію фруктанів визначали за калібрувальним графіком, побудованим за розчинами фруктози.

Всі вимірювання проводили у трьох повтореннях. Для візуалізації отриманих даних і швидкого порівняння трансгенних ліній та контрольних рослин за вмістом фруктанів застосовували стандартну функцію `plot.design` із програмного оточення для мови програмування R версії 3.3.2 [17] та функцію `ggplot` із бібліотеки `ggplot2` [3, 21] для того ж програмного забезпечення.

Результати та обговорення

Виявлено значні відмінності вмісту фруктанів у контрольних рослинах і трансгенних коренях рослин п'яти видів роду *Artemisia*. Вміст цих сполук в екстрактах з коренів і листків контрольних рослин різних видів полину коливався в широких межах. Зокрема, вміст фруктанів у сирій речовині коренів *Artemisia annua* становив 39,4 мг/г, листків — 32,5 мг/г, *A. tilesii* — відповідно 15,1 та 7,9 мг/г, *A. dracunculus* — до 7,7 та 7,8 мг/г, *A. ludoviciana* — 23,5 та 6,5 мг/г, *A. absinthium* — 13,3 та 8,0 мг/г. Отже, з наведених експериментальних даних видно, що вміст фруктанів коливався в межах 6,5—39,4 мг/г сирої речовини і залежав від виду рослин.

У зразках трансгенних коренів також виявлено значну варіабельність вмісту фруктанів, причому як у різних ліній трансгенних коренів одного виду, так і різних видів. Найбільше від контрольних показників за вмістом фруктанів у коренях і листках відрізнялися трансгенні лінії *A. annua*, де вони коливались у межах 9,8–16,5 мг/г сирової речовини; у «бородатих» коренях *A. tylesii*, *A. dracunculus*, *A. ludoviciana*, *A. absinthium* ці показники змінювались у межах відповідно 13,9–22,8; 6,4–11,0; 19,7–20,0; 8,6–9,7 мг/г сирової речовини.

Усього в роботі протестовано 28 комбінацій таких чинників, як біологічний вид, плазміда, частина контрольної рослини (корені, листки), колекційний зразок «бородатих» коренів або контрольних рослин. Такі комбінації в подальшому називатимемо зразками. Найвищий вміст фруктанів зафіксовано в коренях (39,4 мг/г сирової речовини) і листках (32,5 мг/г сирової речовини) контрольних рослин *A. annua*, найнижчий — у «бородатих» коренях *A. dracunculus*, отриманих методом генетичної трансформації з використанням дикого штаму агробактерій A4 (6,4 мг/г сирової речовини), й листках контрольних рослин *A. ludoviciana* (6,5 мг/г сирової речовини).

Отже, в результаті досліджень встановлено значне варіювання вмісту фруктанів у контрольних рослинах і коренях трансгенних рослин роду полину. У ході експерименту постала необхідність порівняти отримані результати, зокрема оцінити вміст досліджуваних сполук у різних видах рослин і різних лініях «бородатих» коренів, а також визначити залежності вмісту фруктанів від використаного генетичного вектора й досліджуваного зразка. Стандартні статистичні методи потребують перевірки даних на відповідність певним критеріям, що зазвичай веде до збільшення кількості повторень вимірів, проте попередні висновки чи припущення можна зробити навіть за неповного обсягу інформації.

У виконаному нами дослідженні вимірюваний параметр (вміст фруктанів) варіював залежно від кількох чинників (різні види рослин, різні векторні конструкції для трансформації, різні зразки «бородатих» коренів), усього 28 комбінацій, що з урахуванням вимірювання в трьох повтореннях дало 84 значення. В зв'язку з цим для оцінювання й зіставлення такого масиву даних необхідно було застосувати систему графічної візуалізації. Для цього ми скористались методом «план експерименту» («plot design») [5, 11, 17]. Таким методом можна оцінити отримані дані за кожним із чинників окремо, зокрема за видом рослин, згрупувавши дані відповідно до градацій чинника. В усіх групах, наприклад по кожному біологічному виду, знаходяться середні значення, які нанесені на діаграмі в стовпчик (рис. 1). Це дає можливість за довжиною відрізка між найбільшим і найменшим значеннями візуально оцінити ступінь залежності вмісту фруктанів від виду рослин. Для інших чинників використаний генетичний вектор (зразки «бородатих» коренів), побудовано окремі незалежні стовпчики середніх значень. Отже, оскільки для побудови різних стовпчиків використано один і той самий набір даних, можна візуально оцінити, який із чинників більше впливав на досліджуваний параметр.

Як бачимо, мінливості вмісту фруктанів залежно від виду рослини та генетичного вектора/частини рослини подібні. В середньому зразки *A. annua* накопичували поліфруктанів найбільше, *A. dracunculus* — найменше. Найнижчий вміст досліджуваних речовин у «бородатих» коренях

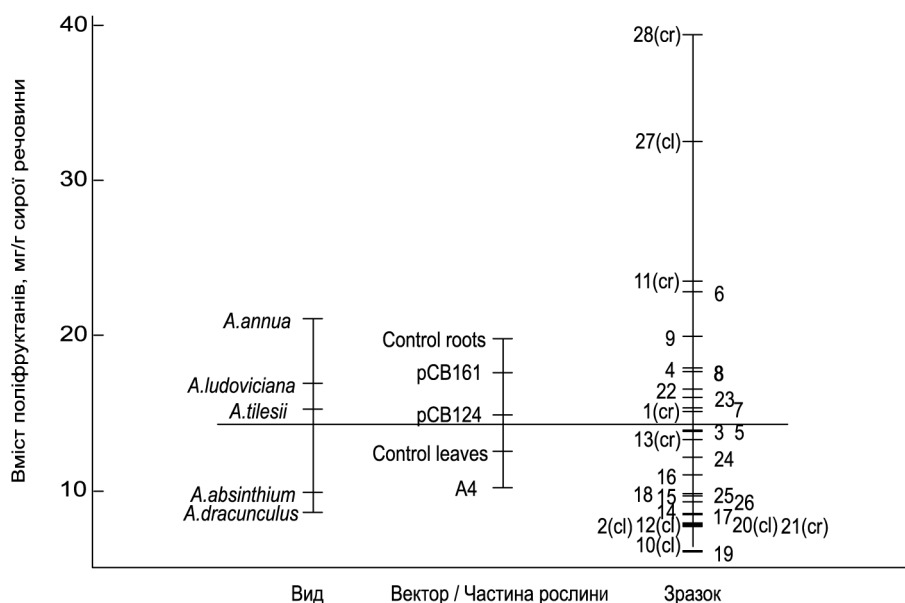


Рис. 1. Середні значення вмісту поліфруктанів у рослинах і «бородатих» коренях роду *Artemisia*, згруповані за біологічними видами, векторами/частинами рослин і зразками; cl, cr — відповідно листки й корені контрольних рослин. Горизонтальну лінію проведено на рівні середнього значення для всієї вибірки

рослин, отриманих методом генетичної трансформації їх із використанням дикого штаму агробактерій А4, найвищий — у коренях контрольних рослин. Крім того, у зразках 28 (корені) та 27 (листки) контрольних рослин *A. annua* вміст фруктанів значно вищий. Столпчик «Зразок» (див. рис. 1) відображає істотну варіабельність за вмістом фруктанів у різних лініях трансгенних коренів і частин контрольних рослин у межах 6,5—39,4 мг/г сирої речовини. Слід зазначити, що окремі зразки «бородатих» коренів справді можуть відрізнятися за низкою параметрів, зокрема за швидкостями росту, накопичення вторинних метаболітів та ін. [22]. Така варіабельність є закономірною й пов'язана з особливостями трансформації ядерної ДНК, оскільки місце вбудовування гена, що переноситься, не є детермінованим. Отже, так званий ефект положення перенесених генів може бути причиною фізіологічних і біохімічних відмінностей різних зразків трансгенних рослин або «бородатих» коренів, отриманих *Agrobacterium*-опосередкованою трансформацією.

Метод «план експерименту» дає можливість порівняти середні значення, але не відображає варіативності відповіді системи за певного значення того чи іншого чинника. Для вирішення цього завдання доцільно скористатись точковою діаграмою Клівленда [9], позначивши отримані експериментальні дані в усіх повтореннях.

Найбільшою варіативністю вмісту фруктанів була у зразках *A. annua*, найменшою — в *A. dracuncululus* (рис. 2, а). Широкий діапазон значень вимірюваного параметра мали корені контрольних рослин (див. рис. 2, б), що відповідає біологічним особливостям рослин досліджуваних видів. Вміст поліфруктанів у кожному зразку відрізнявся не настільки, щоб це значно впливало на розрахунок математичного сподівання (див. рис. 2, в).

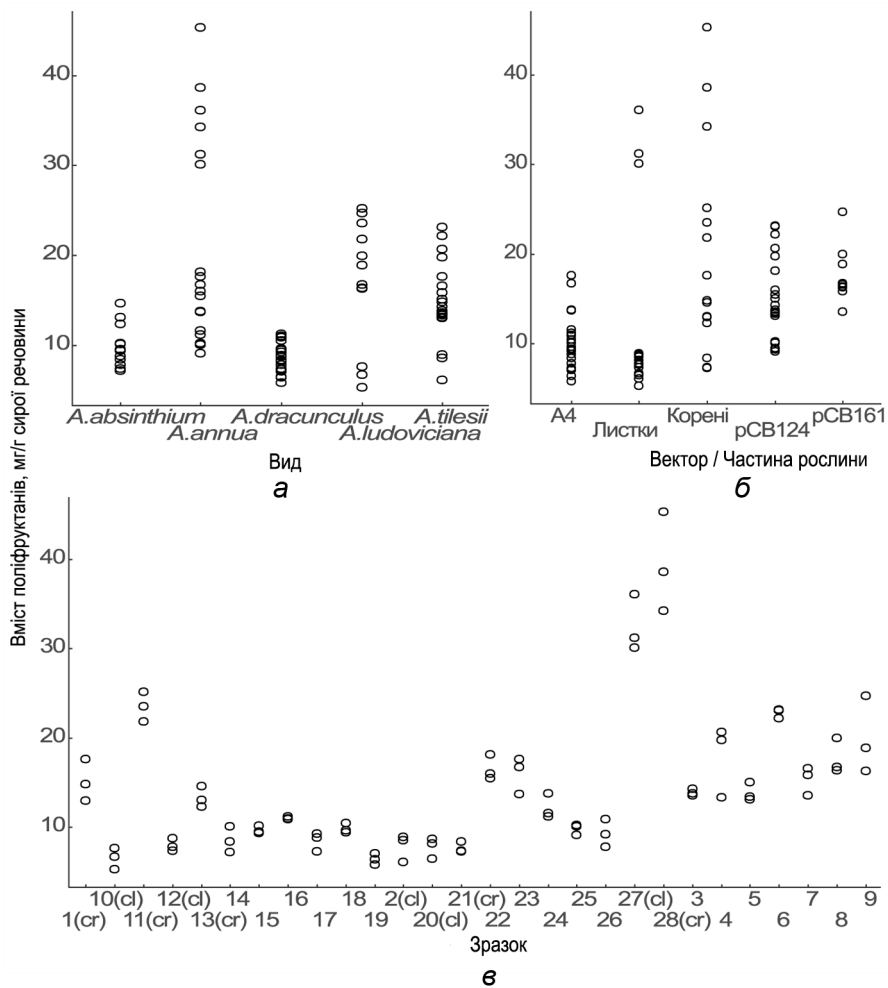


Рис. 2. Варіабельність вмісту поліфруктанів залежно від виду рослини (а); частини рослини або плазміді, використаної для отримання «бородатих» коренів (б); протестовані зразки (в). Кільця відповідають індивідуальним вимірюванням; cl, cr — відповідно листки й корені контрольних рослин

Параметри, виміряні для зразків 27 і 28, більші за всі інші, тому їх високі середні значення для цих зразків швидше не результат статистичної похибки, а, вірогідно, біологічна властивість рослин *A. annua*.

Отже, метод «план експерименту» і точкова діаграма Клівленда дають змогу швидко візуально оцінити вплив різних чинників багатofакторного експерименту на накопичення поліфруктанів у «бородатих» коренях і частинах рослин та варіативність цього параметра за заданого значення того чи іншого чинника. Найвищий вміст фруктанів зафіксовано в коренях (39,4 мг/г сирової речовини) та листках (32,5 мг/г сирової речовини) контрольних рослин *A. annua*, найнижчий — у «бородатих» коренях *A. dracunculus*, отриманих методом генетичної трансформації з використанням дикого штаму агробактерій A4 (6,4 мг/г сирової речовини) та контрольних листках рослин *A. ludoviciana* (6,5 мг/г сирової речовини). Найбільша варіативність вмісту фруктанів у зразках *A. annua*, найменша —

в *A. dracunculus*. Широкий діапазон значень вимірюваного параметра виявлено в коренях контрольних рослин, що відповідає біологічним особливостям рослин досліджуваних видів. Застосовані методи придатні для первинного оцінювання масиву експериментальних даних, що було продемонстровано на прикладі порівняльного оцінювання вмісту поліфруктанів у «бородатих» коренях і тканинах (листках, коренях) рослин роду *Artemisia*.

Публікація містить результати досліджень, проведених при грантовій підтримці Державного фонду фундаментальних досліджень за конкурсним проектом № 73/2-2017.

1. Дробот К.О., Матвеева Н.А., Шаховський А.М. Особливості генетичної трансформації лікарських рослин *Artemisia annua* L. та *Ruta graveolens* L. з використанням *Agrobacterium rhizogenes* // Фактори експерим. еволюції організмів. — 2016. — **19**, № 1. — С. 117—120.
2. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П. Методы биохимического исследования растений. — Л.: Агропромиздат, 1987. — 143 с.
3. Мاستицкий С.Э., Шитиков В.К. Статистический анализ и визуализация данных с помощью R. — 2014. — 401 с. Электронная книга, адрес доступа: <http://r-analytics.blogspot.com>
4. Bulgakov V.P., Shkryl Y.N., Veremeichik G.N. Engineering high yields of secondary metabolites in *Rubia* cell cultures through transformation with rol genes // Methods in Mol. Biol. — 2010. — **643**, N 1. — P. 229—242.
5. Chambers J.M., Hastie T.J. Statistical Models in S. — N.Y.: Wadsworth & Brooks/Cole, 1992. — 608 p.
6. Chashmi N., 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. — **65**, N 5—6. — P. 373—379.
7. Chilton M.D., Drummond M.H., Merio D.J. et al. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: The molecular basis of crown gall tumorigenesis // Proc. Natl. Acad. Sci USA. — 1977. — **11**, N 2. — P. 263—271.
8. Christey M.C. Use of Ri-mediated transformation for production of transgenic plants / In Vitro Cellular & Developmental Biology // Plant. — 2001. — **37**, N 6. — P. 687—700.
9. Cleveland W.S., McGill R. Graphical perception: Theory, experimentation, and application to the development of graphical methods // J. Amer. Stat. Assoc. — 1984. — **79**, N 387. — P. 531—554.
10. Drobot K.O., Shakhovskiy A.M., Matvieieva N.A. Tarragon (*Artemisia dracunculus* L.) «hairy» root culture production // Biotechnol. Acta. — 2016. — **9**, N 2. — P. 55—60.
11. Freeny A.E., Landwehr J.M. Displays for data from large designed experiments, Computer Science and Statistics // Proc. of the 22nd Symp. on the Interface. — N.Y.: Springer Verlag, 1990. — 583 p.
12. Giri A., Narasu M. Transgenic hairy roots: recent trends and applications // Biotechnol. Adv. — 2000. — **18**, N 1. — P. 1—22.
13. Kaur N., Gupta A. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition // J. Biosciences. — 2002. — **27**, N 7. — P. 703—714.
14. Matvieieva N.A., Shakhovskiy A.M., Belokurova V.B., Drobot K.O. *Artemisia tilesii* ledeb hairy roots establishment using *Agrobacterium rhizogenes* — mediated transformation // Preparative Biochem. and Biotechnol. — 2016. — **46**, N 4. — P. 342—345.
15. 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.
16. Ozer D., Akin S., Ozer B. Effect of inulin and lactulose on survival of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium bifidum* BB-02 in acidophilus-bifidus yoghurt // Food Sci. and Technol. Intern. — 2005. — **11**, N 1. — P. 19—24.
17. R Development Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. — Vienna: the R Foundation for Statistical Computing, 2016. — ISBN: 3—900051—07—0. URL:<http://www.R-project.org>.
18. Reis S.A., Conceicao L.L., Rosa D.D. Mechanisms used by inulin-type fructans to improve the lipid profile // Nutr. Hospitalaria. — 2014. — **31**, N 2. — P. 528—534.
19. Roberfroid M.B. Introducing inulin-type fructans // British J. Nutr. — 2005. — **93**, N 1. — P. 13—25.

20. 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. — **29**, N 8. — P. 887—894.
21. Wickham H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis.* — N.Y.: Springer-Verlag, 2016. — 260 p.
22. 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 over-expression of chalcone isomerase gene with the elicitation treatment // *Plant Cell Rep.* — 2009. — **28**, N 8. — P. 1205—1213.

Отримано 04.04.2017

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ ПОЛИФРУКТАНОВ В «БОРОДАТЫХ» КОРНЯХ И РАСТЕНИЯХ РОДА *ARTEMISIA*

В.П. Дуплий, Е.А. Дробот, Я.И. Ратушняк, Н.А. Матвеева

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

Выполнена сравнительная оценка содержания полифруктанов в трансгенных корнях и нетрансформированных растениях *Artemisia annua*, *A. tilesii*, *A. dracunculus*, *A. ludoviciana*, *A. absinthium* двумя простыми методами визуализации данных. Методом «план эксперимента» установлена вариативность исследуемого параметра в зависимости от градаций каждого из факторов эксперимента (биологический вид, генетический вектор/часть растения, коллекционный образец). С помощью точечной диаграммы Кливленда оценена изменчивость накопления фруктанов для каждого из исследуемых факторов. Наивысшее содержание полифруктанов зафиксировано в корнях и листьях контрольных растений *A. annua* (соответственно 39,4 и 32,5 мг/г сырого вещества), наинизшее — в «бородатых» корнях *A. dracunculus*, полученных методом генетической трансформации с использованием дикого штамма агробактерий А4 (6,4 мг/г), и в листьях контрольных растений *A. ludoviciana* (6,5 мг/г). Наибольшая вариативность содержания фруктанов определена в образцах *A. annua*, наименьшая — у *A. dracunculus*. Широкий диапазон значений измеряемого параметра зафиксирован в корнях контрольных растений. Примененные методы пригодны для первичной оценки массива экспериментальных данных.

COMPARATIVE EVALUATION OF FRUCTAN CONTENT IN *ARTEMISIA* SPP. «HAIRY» ROOTS AND PLANTS

V.P. Duplij, K.A. Drobot, Ya.I. Ratushnyak, N.A. Matvieieva

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

It was carried out a comparative assessment of polifruktan content in transgenic roots and control plants *Artemisia annua*, *A. tilesii*, *A. dracunculus*, *A. ludoviciana*, *A. absinthium*. For this purpose two simple methods of data visualization were used. Variability of studied parameter depending on the gradation of each experimental factor (species, genetic vector/part of plant, collection sample) was demonstrated by the plot design method. Volatility of fructan content depended of each of the this factors was shown by Cleveland dot plots. The highest content of fructans was found in control leaves and roots of *A. annua* (39.4 and 32.5 mg/g fresh weight, respectively), the lowest — in the «hairy» roots of *A. dracunculus*, obtained by *Agrobacterium* A4 wild strain transformation (6.4 mg/g) and in the leaves of control *A. ludoviciana* plants (6.5 mg/g). The largest variation of fructan content was measured in samples of *A. annua*, the lowest — in *A. dracunculus*. Wide range of measured parameter was found in the roots of control plants. It was concluded, that applied methods can be used for preliminary evaluation of the array of experimental data.

Key words: *Artemisia* spp., fructans, methods for data visualization.