

СИНТЕЗ ІНУЛІНУ В «БОРОДАТИХ КОРЕНЯХ» ЦИКОРІЮ, ТРАНСФОРМОВАНОГО ЗА ДОПОМОГОЮ *Agrobacterium rhizogenes*

Н. А. Матвеева
О. М. Кіщенко
А. М. Шаховський
М. В. Кучук

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії
НАН України, Київ

E-mail: joyna56@gmail.com

Показано можливість швидкого одержання культури «бородатих коренів» цикорію *Cichorium intybus* L. var *foliosum* Hegi з генами туберкульозних антигенів ESAT6 та Ag85B *Mycobacterium tuberculosis* або геном інтерферону $\alpha 2b$ людини після генетичної трансформації за допомогою *Agrobacterium rhizogenes*. Отримані «бородаті корені» мали типовий фенотип та росли на живильному середовищі без регуляторів росту. Частота генетичної трансформації становила 42,3% при трансформуванні конструкцією pCB161 з геном *ifn- $\alpha 2b$* та 5,9% з використанням вектора pCB158 зі злиною послідовністю *esxA::fbpB^{ATMD}* генів туберкульозних антигенів. ПЛР- та ЗТ-ПЛР-аналізи підтвердили присутність і транскрипцію селективного *nptII* та цільових *fbpB^{ATMD}*, *ifn- $\alpha 2b$* генів у трансформованих коренях. Згідно з результатами ПЛР усі проаналізовані кореневі лінії цикорію містили перенесений T_L-фрагмент Т-ДНК плазмиди pRi A4. Трансгенні корені, так само як і нетрансформовані, накопичували інулін — запасний полісахарид, синтез якого є характерним для рослин цикорію. Вміст інуліну в одній з отриманих трансгенних корневих ліній був у 1,7 раза вищий, ніж у контролі, й перевищував 20% сухої маси.

Ключові слова: інулін, *Cichorium intybus*, *Agrobacterium rhizogenes*, генетична трансформація, гени туберкульозних антигенів ESAT6 та Ag85B, ген інтерферону *ifn- $\alpha 2b$* .

Цикорій *Cichorium intybus* L. росте в помірному і тропічному кліматі Євразії та на півночі Африки. Кореневі й листові форми цикорію культивують і застосовують у сільському господарстві для виробництва заміни кави та отримання інуліну [1]. Листові сорти, що відомі у Бельгії, Франції, США, використовують як салатні рослини, окрім того вони мають лікарські властивості (нормалізація обміну кальцію та ліпідів [2, 3], лікування діабету [4], дисбактеріозів [5] тощо [6]).

Запасною сполукою, що синтезується в цикорії й зумовлює наявність лікувальних властивостей, є інулін — полісахарид, який має термінальну молекулу глюкози та ланцюг із фруктозних залишків. Інулін виробляють із цикорію бельгійські компанії Beneo-Orafti та Cosucra, голландська компанія Sensus, а також Shandong Baolingbao Biotechnology Co. Ltd., Guangzhou Zeyu Biotechnology Co. Ltd, Shanghai Winway Biotech Co. Ltd — з Китаю [7, 8]. Застосовують його у медицині та промисловості. У росли-

нах цикорію інулін знайдено в листках, але переважна кількість його накопичується в коренях [1]. У культурі *in vitro* в рослинах цикорію теж відбувається синтез інуліну [9]. Одним зі способів отримання інуліну може бути культура коренів, що продукує цей полісахарид. Корені, які мають здатність до росту в середовищі без регуляторів росту, можна одержати генетичною трансформацією за допомогою *Agrobacterium rhizogenes* [10]. Разом з тим практичний інтерес становить отримання «бородатих коренів» цикорію, які крім інуліну (природного продукту) синтезують ще й інші сполуки, зокрема інтерферон та бактеріальні антигени.

Трансформація за допомогою *A. rhizogenes* є досить зручним способом зміни рослинного геному, адже бактерія може переносити не тільки власну Т-ДНК онкоплазмиди pRi, але й Т-ДНК бінарних векторів із селективними та цільовими генами [11, 12]. Корені, отримані після трансформації рослин за допомогою *A. rhizogenes*, накопичують вторинні метаболіти або запасні сполуки,

які властиві для тієї чи іншої рослини [13–16], причому в трансформованих коренях вміст таких сполук може бути вищий порівняно з рослинами дикого типу. Так, концентрація полісахаридів у трансгенних коренях *Echinacea purpurea* була вищою, ніж у вихідних рослин [17]. Концентрація вітаноліду (седативної, снодійної та антисептичної речовини) в трансгенних коренях *Withania somnifera* була більш ніж у 2 рази вищою порівняно з нетрансформованими [18]. *A. rhizogenes*-опосередкованою трансформацією одержано корені *Glycyrrhiza uralensis* з підвищеним синтезом флавоноїдів [19]. Трансформовані рослини (корені та регенеровані з трансгенних коренів рослини) є потенційними продуцентами різних речовин [13], включаючи алкалоїди [20], вторинні метаболіти [21], фармацевтичні сполуки [22], моноклональні антитіла [23], а також можуть використовуватися для фітореMediaції [24]. Доцільно було б отримати трансгенні корені цикорію, що мають гени інтерферону й туберкульозних антигенів, і порівняти ефективність синтезу природного метаболіту цикорію — інуліну — в трансгенних та нетрансформованих коренях. Коло досліджень з генетичної трансформації цикорію є досить обмеженим. Так, *A. rhizogenes* використовували для одержання рослин цикорію зі зміненим ритмом цвітіння [10, 25], *A. tumefaciens* — рослин, стійких до хлорсульфурону [26]. Окрім того, генетичною трансформацією створено рослини цикорію, які синтезують не лише інулін, але й фруктан типу неоінуліну [27]. З використанням *A. tumefaciens* нами створено трансформовані рослини цикорію з генами антигена ESAT6 *Mycobacterium tuberculosis* [28] та інтерферону $\alpha 2b$ людини [29].

Метою роботи було отримання *A. rhizogenes*-опосередкованою трансформацією «бородатих коренів» цикорію, що містять гени туберкульозних антигенів ESAT6 (*esxA*), Ag85B (*fbpB^{ΔTMD}*) або людського лейкоцитарного інтерферону *ifn-α2b*, та дослідження вмісту інуліну в трансформованих коренях.

Матеріали і методи

Вихідним матеріалом були сім'ядолі 10-денних проростків цикорію *C. intybus* L. сорту «Пала росса», які відділяли від рослин та надрізали скальпелем. Трансформацію проводили за допомогою агропінового штаму *A. rhizogenes* A4 з векторними конструкціями pCB158 [30] і pCB161 [31]. Вектори

мали відповідно цільові гени: зливу послідовність *esxA::fbpB^{ΔTMD}* під контролем коренеспецифічного промотору *MII* цукрового буряку та *ifn-α2b* — промотору гена 35S-протеїну з геном вірусу мозаїки цвітної капусти. Вектор pCB161 містив кальретікуліновий сигнал [32] перед кодувальною частиною гена *ifn-α2b* для перенаправлення протеїну в ендоплазматичний ретикулум і далі в апопласт. Обидва вектори містили селективний ген неоміцинофосфотрансферази II (*nptII*) під контролем промотора гена нопалінсинтетази, наявність якого давала можливість здійснювати відбір трансгенних коренів за ознакою стійкості до канаміцину.

Бактеріальну суспензію вирощували і сім'ядолі рослин цикорію трансформували за методикою, наведеною в статті [29].

Після кокультивування з бактеріальною суспензією експланти переносили на 3 доби на середовище 1/2 МС (Murasige — Скуга [33] зі зменшеним удвічі вмістом макроелементів), потім — на селективне середовище 1/2 МС, що містило 25 мг/л канаміцину («Київмедпрепарат», Україна), оскільки раніше [29] таку концентрацію було визначено як селективну, та 600 мг/л цефатоксиму («Дарниця», Україна) для елімінації агробактерій. Субкультивування отриманих трансгенних ліній здійснювали кожні 3 тижні шляхом перенесення кінчиків коренів на середовище 1/2 МС з канаміцином та цефатоксिमом.

Рослину ДНК виділяли методом ЦТАБ згідно з [34]. ПЛР геномної ДНК проводили на ампліфікаторі Mastercycler personal 5332 (Eppendorf). Реакційна суміш складалася з однократного ПЛР-буфера із сульфатом амонію, 0,2 мкМ праймерів, 200 мкМ дезоксинуклеозидтрифосфатів, 0,5 од. *Taq*-полімерази, 10–50 нг ДНК. Загальний об'єм реакційної суміші становив 20 мкл. Використовували праймери, специфічні до генів *nptII*, *fbpB^{ΔTMD}*, *ifn-α2b*, *rolB* (таблиця).

Умови ампліфікації: первинна денатурація — 94 °С, 3 хв, 30 циклів ампліфікації (94 °С, 30 с — 62 °С, 30 с — 72 °С, 30 с), заключний синтез — 72 °С, 3 хв (*nptII*, *esxA*, *ifn-α2b*). Для детекції *rolB* у циклах ампліфікації тривалість синтезу — 40 с (72 °С).

Для доказу транскрибування перенесених генів у трансформованих кореневих ліній проводили полімеразну ланцюгову реакцію, поєднану зі зворотною транскрипцією (ЗТ–ПЛР). Сумарну РНК виділяли за методикою [35]. Препарати сумарної РНК, оброблені ДНКазою I (вільною від РНКаз), використовували як матрицю для синтезу

Праймери, що були використані для ПЛР-аналізу присутності генів *nptII*, *fbpB^{ΔTMD}*, *rolB*, *ifn-α2b*

Ген	Праймери	Розмір ампліфікованого фрагмента, п.н.
<i>nptII</i>	5'-cctgaatgaactccaggacgaggca-3' 5'-gctctagatccagagtcgctcagaag-3'	622
<i>fbpB^{ΔTMD}</i>	5'-tctacagcgactggtacagc-3' 5'-tcaggttgctgctacgaacg-3'	484
<i>rolB</i>	5'-atggatcccaattgctattccttccacga-3' 5'-ttaggcttcttcttcaggtttactgcagc-3'	780
<i>ifn-α2b</i>	5'-ttgatgctcctggcacag-3', 5'-ttctgctctgacaacctc-3'	396

першого ланцюга κДНК (зворотних транскриптів). Синтез κДНК здійснювали, застосовуючи набір реактивів Fermentas, за інструкцією фірми-виробника. 5 мкл реакційної суміші слугували матрицею для ПЛР зі специфічними праймерами до відповідного трансгена (таблиця). Аби впевнитися, що проба РНК не містила залишків ДНК, яка може бути матрицею для ПЛР, як негативний контроль застосовували 5 мкл реакційної суміші без ревертази. Сумарну ДНК з агробактерій, яку використовували як позитивний контроль в ПЛР, екстрагували за методикою [36].

Вміст інуліну визначали за методикою, що ґрунтується на здатності кетосахарів забарвлюватися резорцином у кислому середовищі [37]. Корені висушували при 100 °С протягом 10 хв та досушували за кімнатної температури до постійної маси. До 100 мг сухого матеріалу додавали по 5 мл дистильованої води, 0,1% спиртового розчину резорцину та концентрованої соляної кислоти, нагрівали на водяній бані 20 хв. Після цього розчини охолоджували і вимірювали інтенсивність забарвлення на ФЕК (КФК-2) із зеленим світлофільтром (540 нм). Концентрацію інуліну визначали за калібрувальною прямою (калібрування за фруктозою).

Результати та обговорення

Застосування методу «листових дисків», за якого експлантами для трансформації слугують частини або цілі листки зі зробленими на них надрізами, є зручним способом генетичної трансформації багатьох рослин за допомогою бактерій роду *Agrobacterium* (*A. tumefaciens* та *A. rhizogenes*). Наявність такого методу трансформації дає змогу в досить короткий термін отримати трансформовані рослини та корені і не потребує додаткового обладнання [38]. Як експланти для трансформування бактерією *A. rhizogenes* ми

використовували сім'ядолі проростків цикорію.

Через 10–12 діб на середовищі 1/2 МС з канаміцином та цефатоксимом на сім'ядольних експлантах спостерігали ріст коренів. Корені завдовжки близько 10 мм відділялися від листків і переносили на селективне середовище, що не містило регуляторів росту. Одержані корені характеризувалися швидким ростом, значним галузненням та відсутністю позитивного геотропізму (рис. 1).

Відомо, що частота трансформації залежить від низки чинників, зокрема застосованої конструкції [39]. У наших експериментах частота отримання «бородатих коренів» у разі використання агробактерій з різними конструкціями (за однакових умов трансформації) була різною. Так, для конструкції рСВ161 корені формувалися на 24 експлантах з 59, а за трансформування агробактерією з конструкцією рСВ158 ріст коренів відбувався тільки на одному із 17. Отже, частота отримання «бородатих коренів» (відносна кількість експлантів з коренями до загальної кількості експлантів у відсотках) для рСВ161 становила 42,3%, а для рСВ158 — 5,9%.

T_L-фрагмент T-ДНК плазмиди рRi агропінового типу містить гени *rolA*, *B*, *C*, *D*, які задіяні в процесі коренеутворення і відповідають за фенотип «бородатих коренів» [40, 41]. Для підтвердження факту перенесення T_L-фрагмента T-ДНК плазмиди рRi до коренів цикорію проводили ампліфікацію сумарної ДНК з використанням праймерів, специфічних до гена *rolB*. У результаті ампліфікації фрагмент ДНК розміром 780 п. н. знайдено в усіх аналізованих зразках, трансформованих як конструкцією рСВ161 (8 ліній), так і рСВ158 (1 лінія) (рис. 2, а). Таким чином, в усіх аналізованих лініях дійсно відбулося перенесення T_L-фрагмента T-ДНК плазмиди рRi, що й зумовило утворення гормонезалежних коренів типового фенотипу.

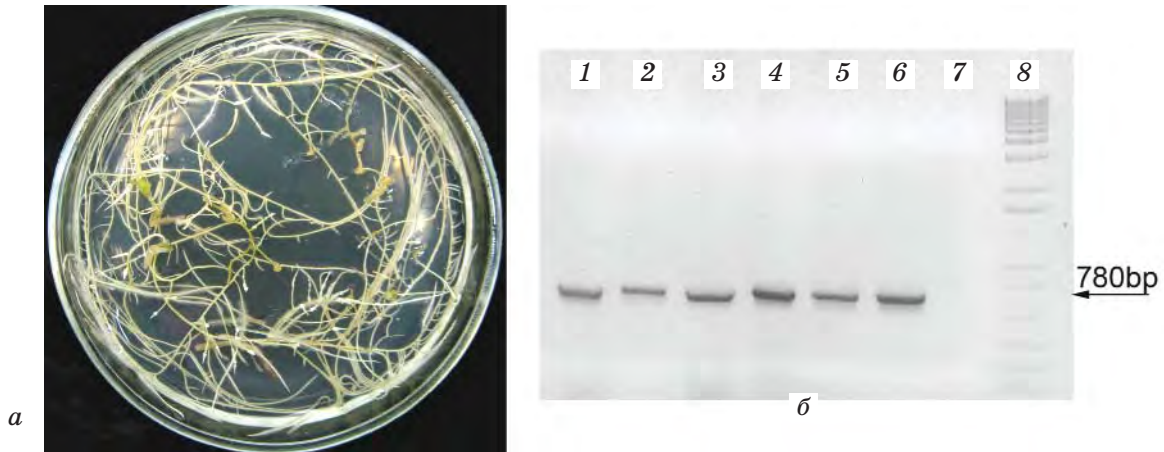


Рис. 1. Ріст «бородатих коренів» цикорію на середовищі без регуляторів росту (а) та електрофореграма результатів ампліфікації ДНК «бородатих коренів» цикорію з використанням праймерів до гена *rolB* (б): 1 — позитивний контроль, сумарна ДНК *A. rhizogenes*; 2–6 — сумарна ДНК «бородатих коренів»; 7 — ДНК вихідної нетрансформованої рослини; 8 — маркер (GibcoBRL)

ПЛР-аналіз тотальної ДНК коренів, отриманих після трансформації *A. rhizogenes* з вектором рСВ161, виявив присутність як селективного (*nptII*), так і цільового (*ifn-α2b*) генів (рис. 2, а). Аналіз коренів, одержаних після трансформації вектором рСВ 158, також показав наявність селективного та цільового генів (рис. 2, б).

Для коренів, трансформованих вектором рСВ161, було проведено вибірково ПЛР-аналіз зворотних транскриптів селективного та цільового генів. Показано, що в усіх чотирьох аналізованих лініях відбувалася транскрипція цих генів (рис. 3). Таким чином, в аналізованих лініях не зафіксовано так званого явища мовчання генів, яке ми раніше спостерігали під час трансформації рослин салату і цикорію конструкціями з

генами туберкульозних антигенів *esxA*, *fbpB^{ΔTMD}* та інтерферону [31, 32].

Використання *A. rhizogenes* та створення «бородатих коренів» дає змогу отримувати сполуки, що синтезуються рослинами в природних умовах. Таким трансформованим кореням притаманний швидкий ріст, а отже й накопичення біомаси [42]. Крім того, технологія їх культивування *in vitro* є маловитратною, адже трансформовані корені ростуть на «мінімальному» середовищі (без регуляторів росту, зі зменшенням вмістом макро- та мікроелементів), не потребують освітлення. Такі особливості привертають увагу до культури «бородатих коренів» як продуцентів низки сполук, у тому числі тих, що мають лікарські властивості.

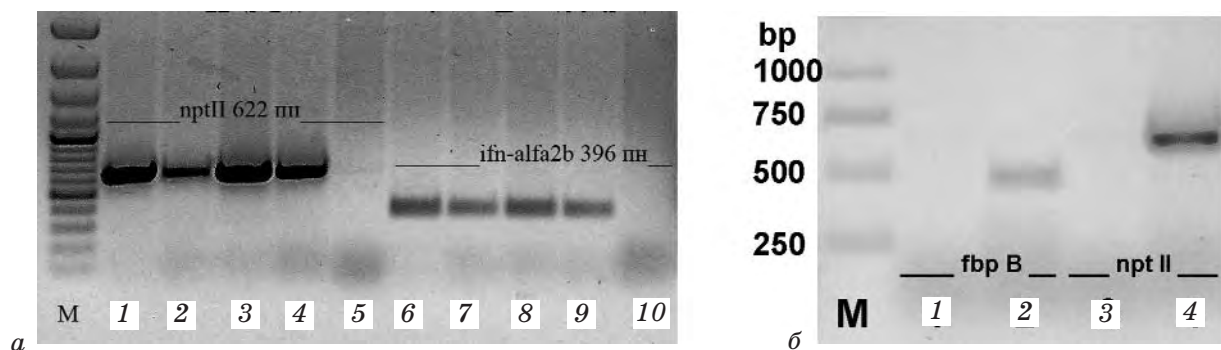


Рис. 2. ПЛР-аналіз тотальної ДНК «бородатих коренів» цикорію на наявність генів *ifn-α2b* (а), *fbpB^{ΔTMD}* (б), *nptII* (а, б):

а: М — маркер; 1–4, 6–9 — ДНК трансгенних коренів; 5, 10 — ДНК контрольної рослини;
б: М — маркер; 1, 3 — ДНК контрольної рослини; 2, 4 — ДНК трансгенного кореня

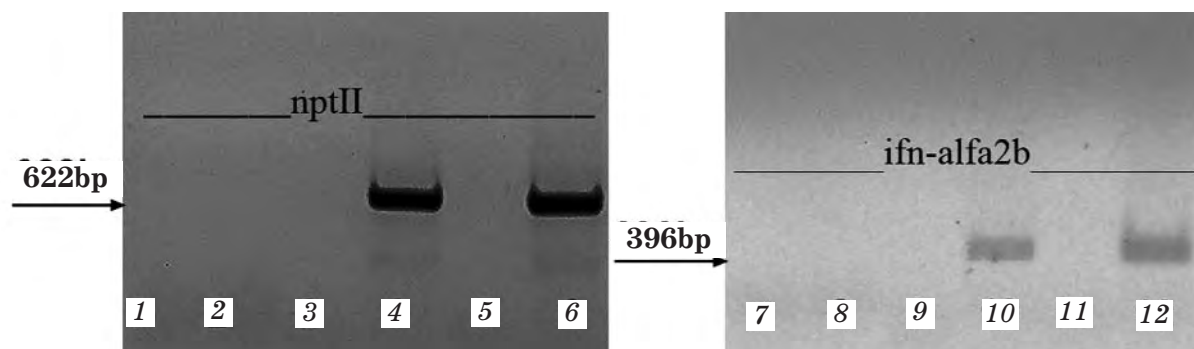


Рис. 3. ПЛР-аналіз зворотних транскриптів генів *nptII* (1–6) та *ifn-α2b* (7–12): парні треки — синтез зворотних транскриптів у присутності ревертази, непарні — ЗТ-ПЛР без ревертази; 1, 2, 7, 8 — корені контрольної рослини, 3–6, 9–12 — трансгенні корені цикорію

Отримані нами трансгенні корені цикорію, як і нетрансформовані, накопичували інулін. Концентрація інуліну в контрольних коренях коливалася від 54 до 171, а в трансформованих (рСВ161) — від 72 до 218 мг/г сухої маси (рис. 4). Для більшості з аналізованих ліній трансгенних коренів вміст інуліну достовірно не відрізнявся від вмісту в коренях контрольних рослин. Однак в одній з ліній (2) вміст інуліну виявився в 1,7 раза вищим, ніж у середньому в контролі. Після агробактеріальної трансформації було відібрано лінію трансгенних коренів цикорію, вміст інуліну в яких у перерахунку на 1 г сухої маси значно вищий, ніж у контрольних нетрансформованих рослин, і становить понад 20% від сухої маси коренів.

Таким чином, показана можливість використання *A. rhizogenes* для отримання культури трансгенних коренів цикорію з генами туберкульозних антигенів та інтерфе-

рону, які ростуть на живильному середовищі без регуляторів росту. Трансформовані корені цикорію одержано з достатньо високою частотою — 42,3% у разі трансформування конструкцією рСВ161 з геном *ifn-α2b* та 5,9% з використанням вектора рСВ158 зі зливою послідовністю *esxA::fbpB^{ΔTMD}* генів туберкульозних антигенів.

В усіх аналізованих лініях коренів цикорію згідно з результатами ПЛР-аналізу відбулося перенесення T_L-фрагмента Т-ДНК плазмиди рRi, що зумовило утворення гормонезалежних коренів типового фенотипу. Методом ПЛР та ЗТ — ПЛР підтверджено наявність перенесених генів і їх транскрибування. Трансгенні корені, так само як і нетрансформовані, накопичували інулін — запасний полісахарид, синтезування якого є характерним для рослин цикорію, причому в одній з ліній вміст інуліну був в 1,7 раза більший, ніж у контролі, і перевищував 20% сухої маси.

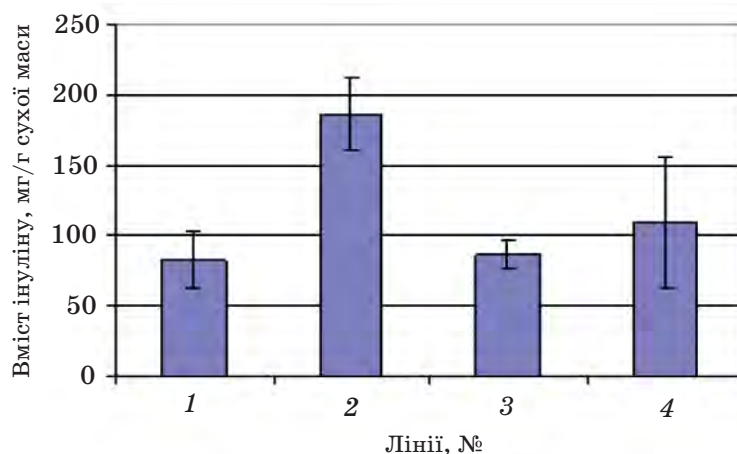


Рис. 4. Вміст інуліну в трансгенних лініях «бородатих коренів» (1–3) та коренях контрольних рослин (4)

ЛІТЕРАТУРА

1. Baert J. R. A., Bockstaele E. L. Cultivation and breeding of chicory root for inulin production // *Industr. Crops Prod.* — 1992. — V. 1, N 2–4. — P. 229–234.
2. 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 // *Am. J. Clin. Nutr.* — 2005. — V. 82, N 2. — P. 471–476.
3. Delzenne N. M., Kok N. Effects of fructans-type prebiotics on lipid metabolism // *Ibid.* — 2001. — V. 73, N 1–2. — P. 456–458.
4. Kaur N., Gupta A. K. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition // *J. Biosci.* — 2002. — V. 27, N 7. — P. 703–714.
5. Kelly G. Inulin-type prebiotics — a review: part 1 // *Altern. Med. Rev.* — 2008. — V. 13, N 4. — P. 315–329.
6. Heibatollah S., Reza N. M., Izadpanah G., Sohailla S. Hepatoprotective effect of *Cichorium intybus* on CCl₄-induced liver damage in rats // *Afr. J. Biochem. Res.* — 2008. — V. 2, N 6. — P. 141–144.
7. <http://www.made-in-china.com/showroom/baolingbaolinda#page4>.
8. <http://www.tradenvv.com/vc-inulin/>.
9. Ranjitha Kumari B. D., Velayutham P., Anitha S. A. Comparative Study on inulin and esculin content of in vitro and in vivo plants of chicory (*Cichorium intybus* L. cv. Lucknow Local) // *Adv. Biol. Res.* — 2007. — V. 1, N 1–2. — P. 22–25.
10. Sun L. Y., Touraud G., Charbonnier C., Tepfer D. Modification of phenotype in Belgian endive (*Cichorium intybus*) through genetic transformation by *Agrobacterium rhizogenes*: conversion from biennial to annual flowering // *Transg. Res.* — 1991. — V. 1, N 1. — P. 14–22.
11. Horsch R. B., Fry J. E., Hoffmann N. L. et al. A simple and general method for transferring genes into plants // *Science.* — 1985. — V. 227, N 4691. — P. 1229–1231.
12. Christey M. C. Use of Ri-mediated transformation for production of transgenic plants // *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* — 2001. — V. 37, N 6. — P. 687–700.
13. Giri A., Lakshmi Narasu M. Transgenic hairy roots: recent trends and applications // *Biotech. Adv.* — 2000. — V. 18, N 1. — P. 1–22.
14. 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. — V. 65, N 5–6. — P. 373–379.
15. 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. — V. 643, N 1. — P. 229–242.
16. 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. — V. 29, N 8. — P. 887–894.
17. Wang B., Zhang G., Zhu L. et al. Genetic transformation of *Echinacea purpurea* with *Agrobacterium rhizogenes* and bioactive ingredient analysis in transformed cultures // *Coll. Surf. B Biointerfaces.* — 2006. — V. 53, N 1. — P. 101–104.
18. 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. — V. 50, N 8. — P. 975–981.
19. 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. — V. 28, N 8. — P. 1205–1213.
20. Sevon N., Oksman-Caldentey K. M. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation: root cultures as a source of alkaloids // *Planta Med.* — 2002. — V. 68, N 10. — P. 859–868.
21. Choi Sung Mee, Son Sung Ho, Yun Seung Rho et al. Pilot-scale culture of adventitious roots of ginseng in a bioreactor system // *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* — 2000. — V. 62, N 3. — P. 187–193.
22. Shanks J., Morgan J. Plant 'hairy root' culture // *Curr. Opin. Biotechnol.* — 1999. — V. 10, N 2. — P. 151–155.
23. Wongsamuth R., Doran P. M. Hairy root as an experimental system for production of antibodies / Doran P. M. ed. *Hairy roots, culture and applications.* — Amsterdam, Harwood, 1997. — P. 89–97.
24. Nedelkoska T. V., Doran P. M. Hyperaccumulation of cadmium by hairy roots of *Thlapsia*

- caerulescens* // Biotech. Bioeng. — 2000. — V. 67, N 5. — P. 607–615.
25. Harsh Pal Bais, Venkatesh R. T., Chandrashekar A., Ravishankar G. A. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of Witloof chicory — *In vitro* shoot regeneration and induction of flowering // Cur. Sci. — 2001. — V. 80, N 1. — P. 83–87.
 26. Vermeulen A., Vaucheret H., Pautot V., Chupeau Y. *Agrobacterium* mediated transfer of a mutant *Arabidopsis* acetolactate synthase gene confers resistance to chlorsulfuron in chicory (*Cichorium intybus* L.) // Plant Cell Rep. — 1992. — V. 11, N 5–6. — P. 243–247.
 27. Vijn I., van Dijken A., Sprenger N. et al. Fructan of the inulin neoseris is synthesized in transgenic chicory plants (*Cichorium intybus* L.) harbouring onion (*Allium cepa* L.) fructan:fructan 6G-fructosyltransferase // Plant J. — 1997. — V. 11, N 3. — P. 387–398.
 28. Матвеева Н. А., Василенко М. Ю., Шаховский А. М. и др. Эффективная акробактериальная трансформация растений цикория (*Cichorium intybus* L.) вектором с геном туберкулезного антигена ESAT6 // Цитология та генетика. — 2011. — Т. 45, № 1. — С. 11–17.
 29. 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 // Біополімери і клітина. — 2009. — Т. 25, № 2. — С. 120–125.
 30. Матвеева Н. А., Кіщенко О. М., Шаховський А. М., Кучук М. В. Перенесення в рослини ряски *Lemna minor* L. генів туберкульозних антигенів ESAT6 та AG85В шляхом *Agrobacterium rhizogenes*-опосередкованої трансформації // Біотехнологія. — 2011. — Т. 4, № 2. — С. 46–53.
 31. Матвеева Н. А., Кваско Е. Ю., Шаховський А. М., Герасименко І. М. Культура бородатих корней цикория с геном интерферона человека // Укр. біохім. журн. — 2010. — Т. 82, № 4, дод. 2. — С. 278.
 32. Borisjuk N., Borisjuk L., Logendra S. et al. Production of recombinant proteins in plant root exudates // Nat. Biotechnol. — 1999. — V. 17, N 5. — P. 466–469.
 33. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture // Phys. Plant. — 1962. — V. 15, N 3. — P. 473–497.
 34. Дрейнер Дж., Скотт Р. Выделение нуклеиновых кислот из клеток растений / Генная инженерия растений. — М.: Мир, 1991. — С. 241–245.
 35. Logemann J., Schell J., Willmitzer L. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues // Anal. Biochem. — 1987. — V. 163, N 1. — P. 16–20.
 36. Армитидж Ф., Уолден Р., Дрейнер Дж. Выделение тотальных препаратов нуклеиновых кислот из *A. tumefaciens* / Генная инженерия растений. — М.: Мир, 1991. — С. 76–78.
 37. Ермаков А. И., Арасимович В. В., Ярош Н. П. и др. Методы биохимического исследования растений. — Л.: Агропромиздат, 1987. — С. 143.
 38. Curtis I. S., Davey M. R., Power J. B. Leaf disk transformation // Meth. Mol. Biol. — 1995. — V. 44, N 1. — P. 59–70.
 39. Abid M., Palms B., Derycke R. et al. Transformation of chicory and expression of the bacterial *uidA* and *nptII* genes in the transgenic regenerants // J. Exp. Bot. — 1995. — V. 46, N 3. — P. 337–346.
 40. Nilsson O., Olsson O. Getting to the Root: The role of the *Agrobacterium rhizogenes* *rol* genes in the formation of hairy roots // Physiol. Plant. — 1997. — V. 100, N 3. — P. 463–473.
 41. Michael T., Spena A. The plant oncogenes *rol* A, B, and C from *Agrobacterium rhizogenes*: effects on morphology, development, and hormone metabolism // Meth. Mol. Biol. — 1995. — V. 44, N 1. — P. 207–222.
 42. Tepfer D. The biology of genetic transformation of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*. / A. Puhler, ed., Molecular genetics of the bacteria plant interaction. — Berlin: Springer Verlag, 1983. — P. 248–258.

**СИНТЕЗ ИНУЛИНА
«БОРОДАТЫМИ КОРНЯМИ» ЦИКОРИЯ,
ТРАНСФОРМИРОВАННОГО
С ПОМОЩЬЮ *Agrobacterium rhizogenes***

Н. А. Матвеева
Е. М. Кищенко
А. М. Шаховский
Н. В. Кучук

Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев

E-mail: joyna56@gmail.com

Показана возможность быстрого получения культуры «бородатых корней» цикория *Cichorium intybus* L. var *foliosum* Hegi с генами туберкулезных антигенов ESAT6 и Ag85B *Mycobacterium tuberculosis* или геном интерферона $\alpha 2b$ человека после генетической трансформации с помощью *Agrobacterium rhizogenes*. Полученные «бородатые корни» имели типичный фенотип и росли на питательной среде без регуляторов роста. Частота генетической трансформации составила 42,3% при трансформации конструкцией pCB161 с геном *ifn- $\alpha 2b$* и 5,9% с использованием вектора pCB158 со слитой последовательностью *esxA::fbpB^{ΔTMD}* генов туберкулезных антигенов. ПЦР- и ОТ-ПЦР-анализы подтвердили присутствие и транскрипцию селективного *nptII* и целевых генов *fbpB^{ΔTMD}*, *ifn- $\alpha 2b$* в трансформированных корнях. Согласно с результатами ПЦР все проанализированные корневые линии цикория содержали перенесенный T_L-фрагмент T-ДНК плазмиды pRi A4. Трансгенные корни, так же как и нетрансформированные, накапливали инулин — запасной полисахарид, синтез которого характерен для растений цикория. Содержание инулина в одной из полученных трансгенных корневых линий был в 1,7 раза выше, чем в контроле, и превышал 20% сухой массы.

Ключевые слова: инулин, *Cichorium intybus*, *Agrobacterium rhizogenes*, генетическая трансформация, гены туберкулезных антигенов ESAT6 и Ag85B, ген интерферона *ifn- $\alpha 2b$* .

**INULIN SYNTHESIS
IN CHICORY HAIRY ROOTS
TRANSFORMED
WITH *Agrobacterium rhizogenes***

N. A. Matvieieva
O. M. Kishchenko
A. M. Shakhovsky
M. V. Kuchuk

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: joyna56@gmail.com

A fast reproducible transformation procedure employing *Agrobacterium rhizogenes* with genes of tuberculosis antigens ESAT6 and Ag85B from *Mycobacterium tuberculosis* or human interferon $\alpha 2b$ was developed for *Cichorium intybus* L. var *foliosum* Hegi. Obtained hairy roots have typical phenotype and were able to growth on hormone-free nutrient medium. Frequency of genetic transformation was 42.3% for construction pCB161 with *ifn- $\alpha 2b$* gene and 5.9% when vector pCB158 harbouring fused sequence of *esxA::fbpB^{ΔTMD}* genes coding for tuberculosis antigens was used. PCR and RT-PCR analysis have shown the presence and transcription of both selective *nptII* and target *fbpB^{ΔTMD}*, *ifn- $\alpha 2b$* genes in transformed hairy root lines. According to PCR data, all the analysed chicory root lines transferred T_L-fragment T-DNA plasmid pRi A4. Transgenic roots like untransformed ones accumulated inulin natural chicory, reserve polysaccharide, which synthesis is typical for chicory plants. The content of inulin in one of the obtained transgenic root lines was in 1.7 times more than in the control root line and was over 20% of dry weight.

Key words: inulin, *Cichorium intybus*, *Agrobacterium rhizogenes*, genetic transformation, genes of tuberculosis antigens ESAT6 and Ag85B or human interferon $\alpha 2b$.