

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/372447312>

# Quantitative determination of inulin content in hairy roots of common chicory *Cichorium intybus* L / Количественное определение содержания инулина в волосовидных корнях цикория обыкновенного...

Article in *Journal of Siberian Federal University Biology* · July 2023

CITATIONS

0

READS

60

4 authors, including:



**Shvets D.Yu**

Bashkir State Medical University

11 PUBLICATIONS 8 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



**Musin Khalit**

Ufa Scientific Center of the Russian Academy of Science

32 PUBLICATIONS 27 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



**Bulat R. Kuluev**

Ufa Scientific Center of the Russian Academy of Science

250 PUBLICATIONS 764 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Cross-pollination of Brassicaceae [View project](#)



Plant hairy roots [View project](#)

EDN: RBDTRY

УДК 575.222.7:581.1

## Quantitative Determination of Inulin Content in Hairy Roots of Common Chicory *Cichorium intybus* L.

Elvina A. Baimukhametova<sup>\*a</sup>, Darya Yu. Shvets<sup>a, b</sup>,  
Khalit G. Musin<sup>a</sup> and Bulat R. Kuluev<sup>a, c</sup>

<sup>a</sup> *Institute of Biochemistry and Genetics, IBG UFRC RAS  
Ufa, Russian Federation*

<sup>b</sup> *Bashkir State Medical University  
Ufa, Russian Federation*

<sup>c</sup> *Ufa University of Science and Technology  
Ufa, Russian Federation*

Received 18.05.2022, received in revised form 26.10.2022, accepted 03.04.2023

**Abstract.** Chicory (*Cichorium intybus* L.) is a perennial herbaceous plant, a promising source of inulin in functional nutrition. Inulin is a polysaccharide consisting of fructofuranose residues. Its traditional production is associated with a number of difficulties, such as the need for thorough cleaning of the roots and dependence on climatic conditions, but these can be overcome by means of biotechnology. As biotechnological production of inulin is currently non-existent in Russia, obtaining cultures of chicory hairy roots capable of producing inulin is of paramount value. It can provide an opportunity for launching biotechnological production of inulin in Russia in the future. In this study, twelve lines of hairy root culture of *C. intybus* ‘Kofeek’ and wild type plants were obtained and the content of inulin in them was quantified. For this purpose, leaf explants obtained from *in vitro* plants were subjected to transformation with the A4 strain *Agrobacterium rhizogenes* containing the binary vector pCambia 1301. The content of inulin was determined by the spectrophotometric method. The inulin content in hairy root culture of wild type chicory plants and chicory ‘Kofeek’ averaged  $1.46 \pm 0.46$  % and  $1.34 \pm 0.34$  %, respectively, while the native roots of wild chicory contained  $13.13 \pm 1.9$  % inulin, and ‘Kofeek’  $11.55 \pm 2.32$  %. The results indicate that the content of inulin in hairy roots is significantly lower than in native ones. Obtaining inulin from hairy roots under conditions of industrial cultivation in bioreactors may have a number of advantages, such as independence of weather conditions, no need for preliminary cleaning of the roots, and the possibility of year-round cultivation, which may partially compensate for the low

© Siberian Federal University. All rights reserved

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).

\* Corresponding author E-mail address: elvina.baimukhametova@yandex.ru

ORCID: 0000-0003-3147-915X (Baimukhametova E.); 0000-0003-4292-4562 (Shvets D.); 0000-0001-7336-2027 (Musin K.); 0000-0002-1564-164X (Kuluev B.)

content of inulin. However, further research aimed at increasing inulin content in hairy root culture is of immense importance.

**Keywords:** hairy roots, *Agrobacterium rhizogenes*, *Agrobacterium*-mediated transformation.

**Acknowledgements.** This research was performed as part of the state assignment № 122030200143–8.

Citation: Baimukhametova E. A., Shvets D. Yu., Musin K. G., Kuluev B. R. Quantitative determination of inulin content in hairy roots of common chicory *Cichorium intybus* L. J. Sib. Fed. Univ. Biol., 2023, 16(2), 218–231. EDN: RBDTRY



## Количественное определение содержания инулина в волосовидных корнях цикория обыкновенного *Cichorium intybus* L.

Э.А. Баймухаметова<sup>а</sup>, Д.Ю. Швеца<sup>а, б</sup>,  
Х.Г. Мусин<sup>а</sup>, Б.Р. Кулуев<sup>а, в</sup>

<sup>а</sup>Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН  
Российская Федерация, Уфа

<sup>б</sup>Башкирский государственный медицинский университет  
Российская Федерация, Уфа

<sup>в</sup>Уфимский университет науки и технологий  
Российская Федерация, Уфа

**Аннотация.** *Cichorium intybus* L. – многолетнее травянистое растение, представляющее интерес в качестве источника инулина. Инулин – полисахарид, состоящий из остатков фруктозы в форме фуранозы, являющийся перспективным компонентом функционального питания. Производство инулина традиционным способом сопряжено с рядом трудностей, таких как необходимость тщательной очистки корней и зависимость от климатических условий, но их можно преодолеть с помощью биотехнологии. Поскольку в России на данный момент промышленное биотехнологическое производство инулина отсутствует, представляет интерес получение культур волосовидных корней *C. intybus*, способных продуцировать инулин, что в перспективе может привести к созданию в России биотехнологического производства. Целью данного исследования было получение волосовидных корней *C. intybus* и анализ количественного содержания в них инулина. Двенадцать линий волосовидных корней диких растений *C. intybus* и сорта Кофеек были получены путем агробактериальной трансформации штаммом A4 *Agrobacterium rhizogenes* с бинарным вектором pCambia 1301 листовых эксплантов растений, культивируемых в условиях *in vitro*. Содержание инулина определяли спектрофотометрическим методом. Содержание инулина в волосовидных корнях от диких растений *C. intybus* и сорта Кофеек в среднем составило  $1,46 \pm 0,46$  % и  $1,34 \pm 0,34$  % от сырой

массы соответственно, в то время как в нативных корнях диких растений *C. intybus* содержалось  $13,13 \pm 1,9$  % инулина, а сорта Кофеек –  $11,55 \pm 2,32$  %. Полученные результаты свидетельствуют о том, что содержание инулина в волосовидных корнях существенно ниже, чем в нативных. Получение инулина из волосовидных корней в условиях промышленного культивирования в биореакторах может иметь ряд преимуществ, таких как независимость от природных условий, отсутствие необходимости предварительной очистки корней, а также возможность круглогодичного культивирования, что в перспективе может частично компенсировать низкое содержание инулина. Однако требуется проведение дальнейших исследований, направленных на повышение содержания инулина в культуре волосовидных корней цикория.

**Ключевые слова:** волосовидные корни, *Agrobacterium rhizogenes*, агробактериальная трансформация.

**Благодарности.** Работа выполнена в рамках государственного задания № 122030200143–8.

Цитирование: Баймухаметова Э. А. Количественное определение содержания инулина в волосовидных корнях цикория обыкновенного *Cichorium intybus* L. / Э. А. Баймухаметова, Д. Ю. Швец, Х. Г. Мусин, Б. Р. Кулуев // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология, 2023. 16(2). С. 218–231. EDN: RBDTRY

## Введение

Цикорий обыкновенный (*Cichorium intybus* L.) – травянистое растение из семейства Астровые (*Asteraceae*), широко возделываемое во многих странах мира. *C. intybus* является важным источником биологически активных веществ – корни содержат в большом количестве различные кислоты (кофейную, хлорогеновую, аскорбиновую, цикориевую – до 30 % на сухую массу), а также флавоноиды, алкалоиды, оксикумарины, терпеноиды (Petropoulos et al., 2017; Malik, Rehman, 2021), однако основным компонентом, ради которого культивируют *C. intybus*, является инулин, содержание которого в корнях этого растения может достигать до 20 % на сырую массу (Perović et al., 2021).

Инулин представляет собой водорастворимый запасной полисахарид, принадлежащий к группе фруктанов и применяемый как в медицине, так и в современной системе здорового питания. Ряд исследований показал участие инулина в поддержании нормальной микрофлоры кишечника, нормализации обмена веществ

(Hughes et al., 2022), включая снижение уровня глюкозы в крови (Rao et al., 2019) и увеличение усвояемости различных минералов (Costa et al., 2020), а также в снижении риска развития желудочно-кишечных заболеваний, таких как язвенный колит, болезнь Крона (Akram et al., 2019), рак толстой кишки (Wan et al., 2020; Perović et al., 2021). Бифидогенное, антиканцерогенное, иммуномодулирующее действия инулина, подтвержденные результатами клинических испытаний, делают его перспективным компонентом функционального питания (Kaur, 2019).

Несмотря на то что потребность в инулине в России составляет 15–20 тыс. т в год, его промышленное производство в нашей стране отсутствует; на отечественном рынке присутствует исключительно импортный инулин (Будько, 2019). Однако ежегодный рост заинтересованности в культуре *C. intybus* говорит о необходимости и перспективности организации производства инулина из этого растения в России. При промышленном производстве *C. intybus*

предпочтение отдают полевому возделыванию, однако у такого способа есть свои минусы: сезонность, необходимость борьбы с сорняками, вредителями и инфекционными заболеваниями, зависимость от погодных условий. В этой связи интересной представляется возможность биотехнологического производства инулина из культур клеток и тканей *C. intybus* в биореакторах, что позволит обойти большинство вышеперечисленных проблем.

Перспективной технологией получения ценных вторичных метаболитов является использование так называемой культуры волосовидных (бородатых) корней, получаемых с помощью бактерий вида *Agrobacterium rhizogenes* (Rency et al., 2019). *A. rhizogenes* характеризуется способностью переносить сегмент своей ДНК, называющийся Т-ДНК, из *Ri*-плазмиды в случайный участок в геноме растений, при этом встроенный фрагмент будет стабильно наследоваться (Canaday et al., 1992; Gelvin, 2021). Результатом трансформации в таком случае являются волосовидные корни, отличающиеся от нативных корней рядом физиологических характеристик – способностью к неограниченному росту на безгормональных средах, плагиотропизмом, сильным ветвлением, а главное – способностью продуцировать те же метаболиты, что и нативные корни, иногда даже в больших количествах (Gantait, Mukherjee, 2021; Pedreño, Almagro, 2020). Именно эти характеристики делают возможным культивирование изолированных культур волосовидных корней в специальных ферментерах или биореакторах. Стоит отметить, что количество накапливаемых в волосовидных корнях вторичных метаболитов часто зависит от места встраивания Т-ДНК в геном растения (Demirci et al., 2020), поэтому каждый полученный корень следует расценивать как отдельную линию, так как каждый из них образуется из единичной трансформированной клетки. Ранее

были получены волосовидные корни *C. intybus*, синтезирующие ген интерферона  $\alpha 2b$  человека *ifn- $\alpha 2b$* , ген теломеразы человека *hTert*, также ген *Mycobacterium tuberculosis esxA::fbpB<sup>ATMD</sup>* (Матвеева и др., 2011; Matvieieva et al., 2015). Fathi с соавторами (2019) проводили исследования по индукции корнеобразования у *C. intybus* при удалении из питательной среды различных макронутриентов.

Целью настоящего исследования было создание волосовидных корней *C. intybus* и анализ количественного содержания в них инулина.

## Материалы и методы

Волосовидные корни *C. intybus* получали путем агробактериальной трансформации листовых эксплантов, полученных от растений, культивируемых в условиях *in vitro*. Для получения культуры *in vitro* семена диких растений *C. intybus* (собранные в июле-августе 2020 г. в г. Уфе) и сорта Кофеек («Аэлита», Россия) стерилизовали в 70 %-ном растворе этилового спирта (1 мин) и 2 %-ном растворе гипохлорита натрия (10 мин) («Химреактивснаб», Россия). Затем семена 5–6 раз промывали стерильной дистиллированной водой и высаживали по 10 штук на чашку Петри с агаризованной средой Мурасиге-Скуга (МС).

Листья полученных 30-дневных растений нарезали на экспланты размером 1x1 см и использовали для дальнейшей трансформации бактериями вида *A. rhizogenes* штамма A4, несущими бинарный вектор pCambia 1301, которые предварительно наращивали в жидкой среде LB (Lysogeny Broth) с добавлением селективных антибиотиков рифампицина 100 мг/л («Фармасинтез», Россия) и канамицина 100 мг/л («Sigma», США). Агробактерии осаждали центрифугированием, осадок ресуспендировали в 5 мл среды minA

( $K_2HPO_4$ –1,37;  $KH_2PO_4$ –0,45;  $(NH_4)_2SO_4$ –0,1; цитрат натрия – 0,05;  $MgSO_4 \times 7H_2O$  – 0,025; сахара – 0,2 (w/w%); pH 5,4) с добавлением 25 мкМ ацетосирингона («Sigma», США). Суспензию агробактерий наращивали на орбитальном шейкере Innova 40 («New Brunswick Scientific», Германия) в течение двух часов ( $OD_{600}$ –0,6–0,8), после чего проводили инокуляцию листовых эксплантов *C. intybus* агробактериями в 10 мл жидкой питательной среды MC с добавлением 500 мкл суспензии в течение 30 минут. Экспланты, предварительно подсушенные на фильтровальной бумаге, затем помещали на агаризованную среду MC на совместное культивирование в течение 2 суток при температуре 23 °C, после чего их переносили на среду MC с цефотаксимом (250 мг/л) («Биохимик», Россия) для элиминации агробактерий. Спустя 18 суток после трансформации образовавшиеся корни отсоединяли от материнского экспланта и пересаживали на отдельную чашку Петри. Из них отбирали корни, способные к быстрому плагиотропному росту на твердых питательных средах, которые не темнели и не имели визуальных морфологических патологий. Каждый корень рассматривали как отдельную линию. Для оценки ростовых параметров каждую линию корней пересаживали в три отдельные чашки Петри, используя их как повторности, и выращивали в течение 30 суток на твердой среде, каждые 5 суток измеряя длину главного корня.

Из полученных 12 линий, которые обозначили L1-L12 (L1, L2, L3, L5, L8, L9 – от диких растений *C. intybus*, L4, L6, L7, L10, L11, L12 – от растений *C. intybus* сорта Кофеек), выделяли тотальную ДНК с использованием цетилтриметиламмония бромид (ЦТАБ). Для подтверждения успешности трансформации проводили ПЦР-анализ на наличие генов *HPT* (ген устойчивости к антибиотику

гигромицину) и *uidA* (ген β-глюкуронидазы) с использованием пар праймеров HPT1F CTACACAGCCATCGGTCCAGA и HPT1R ATCGTTATGTTTATCGGCACTTTG, GUS 1F TGTGGAATTGATCAGCGTTGGTG и GUS 1R AGCCGACAGCAGCAGTTTCATC (ЗАО «Евроген», Россия).

Затем для оценки особенностей роста культур волосовидных корней проводили измерение сырой массы корней в течение 30 суток культивирования. Для этого линии корней сажали на жидкую питательную среду MC в трех повторностях и культивировали в орбитальном шейкере Innova 40 («New Brunswick Scientific», Германия) при 25 °C, 100 об/мин. Измерение сырой массы корней проводили в стерильных условиях ламинарного бокса «Ламинар С-1,2» («LamSystems», Россия) каждые 5 суток.

В дальнейшем биомассу волосовидных корней *C. intybus*, полученную при культивировании, использовали для количественного определения содержания инулина. Для сравнения содержание инулина определяли также в нативных корнях *C. intybus* сорта Кофеек и диких растений *C. intybus*, выращенных в вегетационных сосудах с универсальным грунтом в течение 150 суток в условиях теплицы.

Содержание инулина в волосовидных и нативных корнях определяли спектрофотометрическим методом по разнице в содержании фруктозидов и фруктазанов (Яницкая, Митрофанова, 2012). Для этого гомогенизировали 150–200 мг сырой массы корней *C. intybus* в 1 мл 96 %-ного этилового спирта или дистиллированной воды и нагревали при 90 °C 30 минут в термостате Термит («ДНК-Технология», Россия). Затем проводили осаждение на центрифуге MiniSpin («Eppendorf», Германия) при 10 тыс. об/мин 15 мин, к 100 мкл супернатанта добавляли



100 мкл воды и 10 мкл 10 % PbAc («Химреактивснаб», Россия). Полученную смесь ресуспендировали в ротационном смесителе RM-1L («ELMI», Латвия) в течение 10 мин, добавляли 10 мкл 5 %  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  («Химреактивснаб», Россия), встряхивали в течение 5 мин, доводили объем до 1 мл водой или спиртом, соответственно, и центрифугировали при 10 тыс. об/мин 15 мин. Затем отбирали 200 мкл водного и спиртового экстракта в пробирки для дальнейшего определения инулина. В каждую пробирку добавляли 180 мкл воды, 20 мкл резорцина (1 %) («ЛенРеактив», Россия) и 600 мкл HCl конц. («Химреактивснаб», Россия) и инкубировали смесь при 80 °C, 20 мин. В качестве раствора сравнения использовали смесь без добавления экстракта. Оптическую плотность анализируемого образца измеряли на спектрофотометре EnSpire 2300 Multilabel Reader («PerkinElmer», США) при длине волны 480 нм. Для построения калибровочной кривой использовали растворы стандарта инулина («Sigma», США) 0,016, 0,08, 0,4, 2 мг/мл. Используя один и тот же экстракт,

проводили 3 независимых измерения, вычисляли среднее и ошибку измерения.

Результаты всех исследований представлены в виде гистограмм и таблиц со средними значениями выборки. Барами обозначали стандартную ошибку среднего ( $M \pm SE$ ). Нормальность распределения проверяли одновыборочным критерием Колмогорова-Смирнова. Достоверность различий оценивали при помощи U-критерия Манна-Уитни ( $p < 0,05$ ), а также с помощью дисперсионного анализа, сопровождаемого post-hoc вычислением критерия Фишера для наименьших значимых различий (LSD) ( $p < 0,05$ ).

### Результаты

На листовых эксплантах *C. intybus* волосовидные корни начинали появляться через 14 суток после инокуляции агробактериями (рис. 1). Корни размером 1–1,5 см переносили на твердую среду MC без добавления фитогормонов. Через 7 суток изолированного культивирования наблюдали интенсивный плагиотропный рост корней с образованием боковых ответвлений, что косвенно указы-

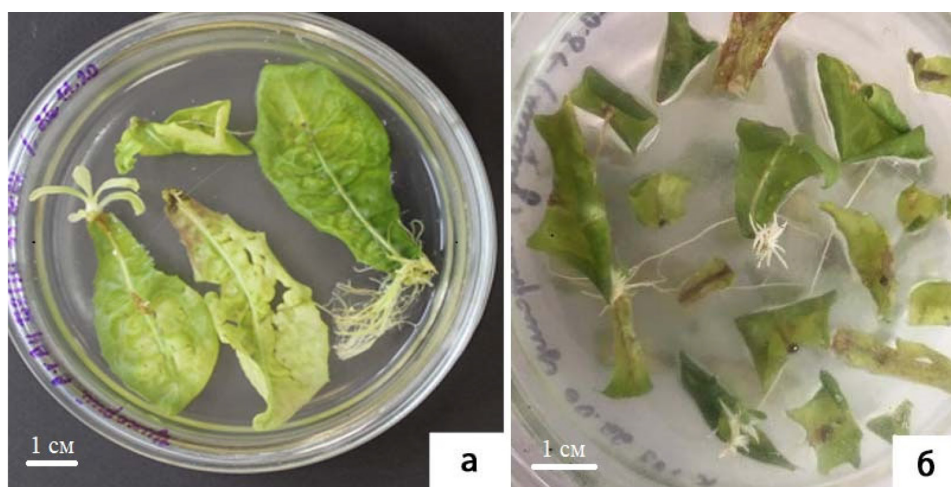


Рис. 1. Получение волосовидных корней *C. intybus*: а – листовые экспланты диких растений *C. intybus*; б – листовые экспланты *C. intybus* сорта Кофеек

Fig. 1. Obtaining hairy roots of *C. intybus*: а – leaf explants of wild chicory; б – leaf explants of chicory 'Kofeek'

вало на трансгенность полученных корней (рис. 2). Таким образом, полученные волосовидные корни диких растений *C. intybus* и сорта Кофеек после трансформации в течение 7 суток адаптировались к росту в изолированных условиях.

Эффективность трансформации эксплантов *C. intybus* составила 60 %. Оценка ростовых параметров корней, появившихся на разных эксплантах, позволила отобрать

12 наиболее интенсивно растущих линий L1-L12 для дальнейшего их культивирования (рис. 2). Отобранные корни имели характерный для волосовидных корней фенотип. Результаты измерения длины главного корня при росте на твердой среде в течение 30 суток показали, что все исследованные линии корней характеризуются экспоненциальным ростом. Наибольший прирост длины главного корня наблюдался у линии L3, наименьший –

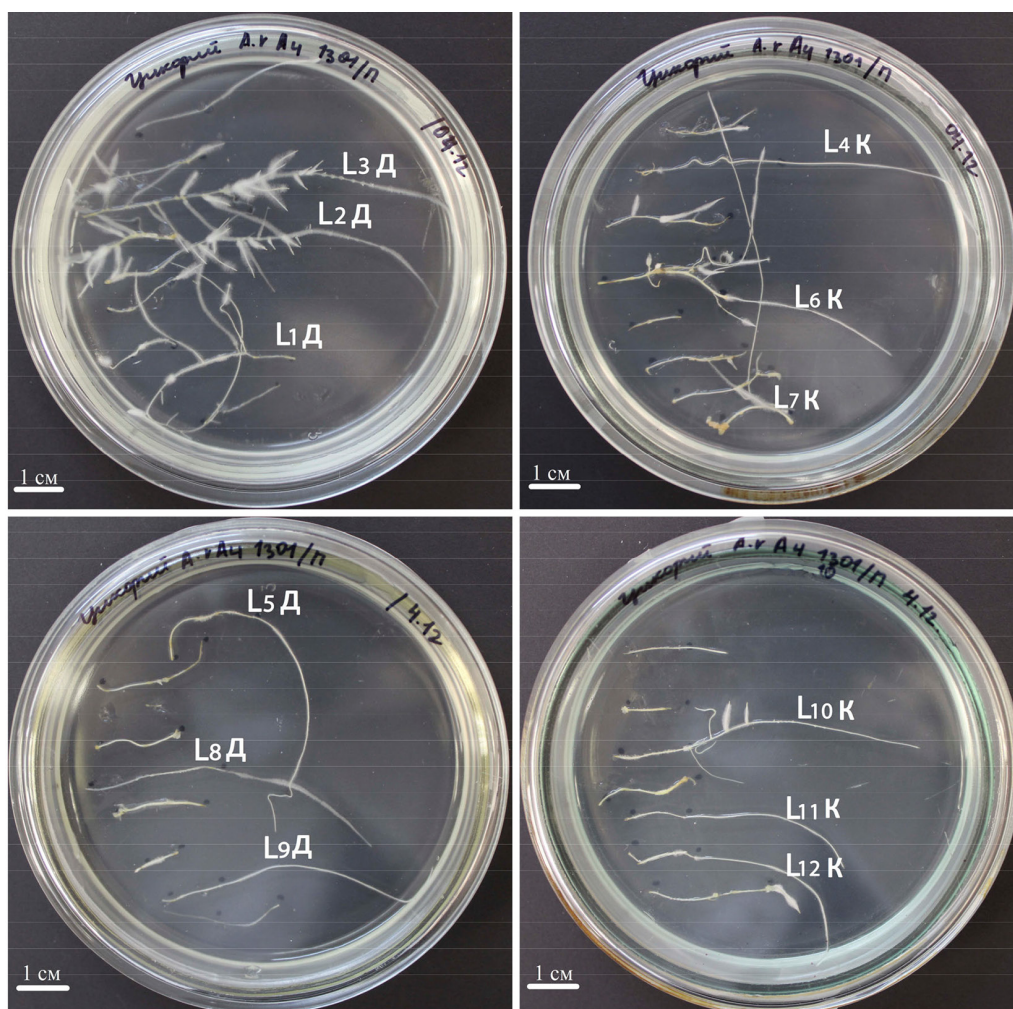


Рис. 2. Волосовидные корни, растущие на чашках Петри на твердой среде: L1, L2, L3, L5, L8, L9 – линии волосовидных корней, полученные от диких растений *C. intybus* (Д), L4, L6, L7, L10, L11, L12 – линии волосовидных корней, полученные от растений *C. intybus* сорта Кофеек (К)

Fig. 2. Hairy roots growing on Petri dishes on a solid medium: L1, L2, L3, L5, L8, L9 – lines of hairy roots obtained from wild chicory plants (Д), L4, L6, L7, L10, L11, L12 – lines of hairy roots obtained from chicory 'Kofeek' (К)



Таблица 1. Длина главного корня (мм, среднее  $\pm$  SE, n=3) у волосовидных корней *C. intybus* линий L1-L12 при культивировании на твердой среде в течение 30 сутокTable 1. Lengths of the main roots (mm, mean  $\pm$  SE, n=3) in *C. intybus* hairy root L1-L12 lines cultivated on a solid medium for 30 days

Номер линии	Сутки						
	1	5	10	15	20	25	30
L1 Д	34 $\pm$ 1,70	47 $\pm$ 2,35	55 $\pm$ 2,75	82 $\pm$ 4,10	101 $\pm$ 5,05	125 $\pm$ 6,25	148 $\pm$ 7,40
L2 Д	31 $\pm$ 1,55	42 $\pm$ 2,10	52 $\pm$ 2,60	96 $\pm$ 4,80	129 $\pm$ 6,45	152 $\pm$ 7,60	172 $\pm$ 8,60
L3 Д	42 $\pm$ 2,10	53 $\pm$ 2,65	62 $\pm$ 3,10	99 $\pm$ 4,95	131 $\pm$ 6,55	163 $\pm$ 8,15	189 $\pm$ 9,45
L4 К	40 $\pm$ 2,00	53 $\pm$ 2,65	60 $\pm$ 3,00	85 $\pm$ 4,25	107 $\pm$ 5,35	138 $\pm$ 6,90	168 $\pm$ 8,40
L5 Д	33 $\pm$ 1,65	45 $\pm$ 2,25	55 $\pm$ 2,75	80 $\pm$ 4,00	107 $\pm$ 5,35	139 $\pm$ 6,95	161 $\pm$ 8,05
L6 К	34 $\pm$ 1,70	46 $\pm$ 2,30	57 $\pm$ 2,85	94 $\pm$ 4,70	118 $\pm$ 5,90	148 $\pm$ 7,40	170 $\pm$ 8,50
L7 К	39 $\pm$ 1,95	52 $\pm$ 2,60	63 $\pm$ 3,15	91 $\pm$ 4,55	110 $\pm$ 5,50	137 $\pm$ 6,85	163 $\pm$ 8,15
L8 Д	36 $\pm$ 1,80	49 $\pm$ 2,45	62 $\pm$ 3,10	99 $\pm$ 4,95	121 $\pm$ 6,05	142 $\pm$ 7,10	174 $\pm$ 8,70
L9 Д	36 $\pm$ 1,80	44 $\pm$ 2,20	52 $\pm$ 2,60	89 $\pm$ 4,45	119 $\pm$ 5,95	139 $\pm$ 6,95	164 $\pm$ 8,20
L10 К	34 $\pm$ 1,70	42 $\pm$ 2,10	50 $\pm$ 2,50	85 $\pm$ 4,25	111 $\pm$ 5,55	132 $\pm$ 6,6	165 $\pm$ 8,25
L11 К	38 $\pm$ 1,90	51 $\pm$ 2,55	65 $\pm$ 3,25	87 $\pm$ 4,35	114 $\pm$ 5,70	131 $\pm$ 6,55	160 $\pm$ 8,00
L12 К	35 $\pm$ 1,75	49 $\pm$ 2,45	61 $\pm$ 3,05	81 $\pm$ 4,05	111 $\pm$ 5,55	132 $\pm$ 6,60	159 $\pm$ 7,95

К – линии волосовидных корней сорта Кофеек.

Д – линии волосовидных корней, полученных от диких растений *C. intybus*.

у линии L1 (табл. 1). Однако данные различия были статистически недостоверны.

При культивировании на жидкой среде волосовидные корни, накапливая интенсивно биомассу, спустя 30 суток представляли переплетенные между собой разветвленные корни. Стоит отметить, что рост волосовидных корней не имел тенденции к снижению скорости в течение длительного времени (120 суток). За 30 суток культивирования масса корней в среднем увеличивалась в 8 раз (с 154,8 $\pm$ 32,6 мг до 1240,7 $\pm$ 63,4 мг) (рис. 3).

Для однозначного подтверждения трансгенной природы полученные линии корней исследовали на наличие генов *HPT* и *uidA*. ПЦР-анализ показал наличие маркерных генов из Т-ДНК бинарного вектора pCambia 1301 во всех исследованных линиях (рис. 4), что свидетельствует о том, что полученные корневые культуры *C. intybus* являются генетически трансформированными.

Исследование содержания инулина в волосовидных корнях проводили спектрофотометрическим методом через 30, 60, 90 суток после начала изолированного культивирования. Результаты показали постепенное увлечение содержания инулина по мере культивирования. Наибольшим содержанием инулина через 90 суток культивирования характеризовалась линия под номером 3–2,86 $\pm$ 0,14 % на сырую массу, достоверно ( $p=0,000$ ) превышая остальные линии. Также относительно высокое содержание наблюдалось у линий L6, L7, L12 (табл. 2). В целом содержание инулина в остальных линиях волосовидных корней варьировало незначительно. В среднем содержание инулина в волосовидных корнях диких растений *C. intybus* составляло 1,46 $\pm$ 0,46 %, а сорта Кофеек – 1,34 $\pm$ 0,34 %. В главном корне растения сорта Кофеек, выращенного в почвенных условиях, содержалось в среднем 11,55 $\pm$ 2,32 % инули-

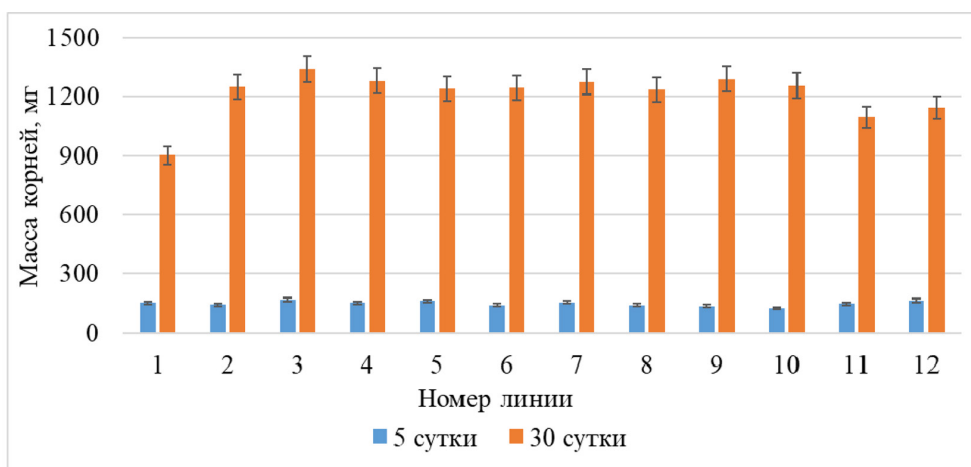


Рис. 3. Сырая масса (мг, среднее  $\pm$  SE,  $n=3$ ) изолированно растущих на жидкой среде волосовидных корней линий L1-L12

Fig. 3. Fresh weight (mg, mean  $\pm$  SE,  $n=3$ ) of isolated hairy root lines L1-L12 growing on a liquid medium

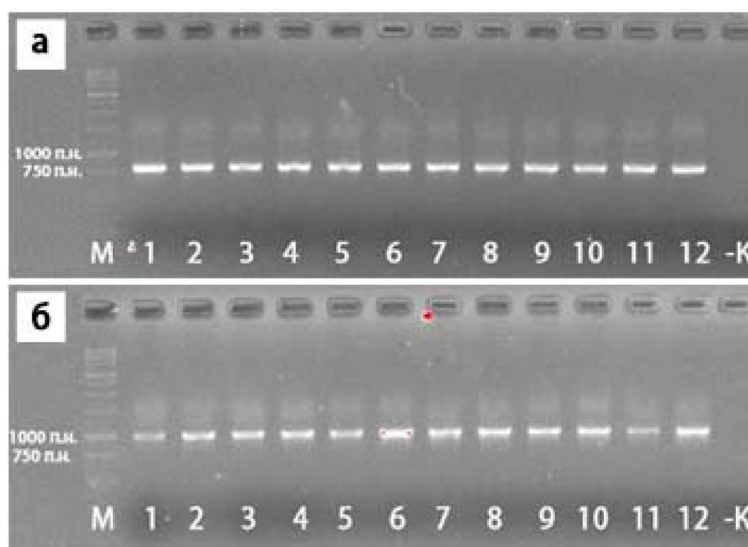


Рис. 4. Результаты ПЦР-анализа волосовидных корней *C. intybus*: а – на наличие гена *HPT*, б – на наличие гена *uidA*, 1–12 – линии волосовидных корней, М – маркер молекулярного веса 1 kb (ЗАО «Евроген», Россия)

Fig. 4. Results of PCR analysis of hairy roots of chicory: а – for the presence of the *HPT* gene, б – for the presence of the *uidA* gene, 1–12 – lines of hairy roots, М – molecular weight marker 1 kb (CJSC “Evrogen”, Russia)

на сырую массу, в то время как в боковых корнях –  $4,28 \pm 0,79$  %. В главном корне диких растений *C. intybus* содержалось  $13,13 \pm 1,9$  % инулина, а в боковых –  $5,61 \pm 1,38$  % (табл. 3). Между дикими растениями цикория и сорта Кофеек не было найдено достоверных раз-

личий в содержании инулина как в главном ( $p=0,088$ ), так и в боковых корнях ( $p=0,069$ ).

### Обсуждение

Таким образом, нами была проведена трансформация листовых эксплантов

Таблица 2. Содержание инулина (% от сырой массы, среднее  $\pm$  SE, n=3) в волосовидных корнях, полученных от диких растений цикория и сорта КофеекTable 2. The content of inulin (% of fresh weight, mean  $\pm$  SE, n=3) in hairy roots obtained from *C. intybus* 'Kofeek' and wild type

Номер линии	Содержание инулина через 30 суток, %	Содержание инулина через 60 суток, %	Содержание инулина через 90 суток, %
L1 Д	0,83 $\pm$ 0,04	1,21 $\pm$ 0,06	1,39 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>
L2 Д	1,08 $\pm$ 0,05	1,25 $\pm$ 0,06	1,39 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>
L3 Д	0,85 $\pm$ 0,04	1,43 $\pm$ 0,07	2,86 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>
L4 К	0,93 $\pm$ 0,05	1,12 $\pm$ 0,06	1,33 $\pm$ 0,06 <sup>d</sup>
L5 Д	0,58 $\pm$ 0,03	0,62 $\pm$ 0,03	0,66 $\pm$ 0,03 <sup>c</sup>
L6 К	0,89 $\pm$ 0,05	1,19 $\pm$ 0,06	1,68 $\pm$ 0,08 <sup>c</sup>
L7 К	0,91 $\pm$ 0,05	1,63 $\pm$ 0,08	1,67 $\pm$ 0,08 <sup>c</sup>
L8 Д	1,12 $\pm$ 0,06	1,14 $\pm$ 0,05	1,42 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>
L9 Д	0,32 $\pm$ 0,02	0,71 $\pm$ 0,03	1,04 $\pm$ 0,05 <sup>f</sup>
L10 К	0,13 $\pm$ 0,01	0,25 $\pm$ 0,01	0,34 $\pm$ 0,02 <sup>g</sup>
L11 К	0,66 $\pm$ 0,03	0,81 $\pm$ 0,04	1,33 $\pm$ 0,06 <sup>d</sup>
L12 К	0,92 $\pm$ 0,05	1,07 $\pm$ 0,05	1,70 $\pm$ 0,08 <sup>c</sup>

К – линии волосовидных корней сорта Кофеек.

Д – линии волосовидных корней, полученных от диких растений *C. intybus*.Средние, отмеченные одинаковыми буквами, не имеют достоверных различий по LSD-тесту ( $p < 0,05$ ).Таблица 3. Содержание инулина (% от сырой массы, среднее  $\pm$  SE, n=3) в главных и боковых корнях диких растений *C. intybus* и сорта КофеекTable 3. The content of inulin (% of fresh weight, mean  $\pm$  SE, n=3) in the main and lateral roots of *C. intybus* 'Kofeek' and wild type

Номер растения	<i>C. intybus</i> сорта Кофеек		Дикие растения <i>C. intybus</i>	
	Главный корень	Боковые корни	Главный корень	Боковые корни
1	9,80 $\pm$ 0,49	3,14 $\pm$ 0,16	13,31 $\pm$ 0,67	9,09 $\pm$ 0,46
2	13,53 $\pm$ 0,68	5,33 $\pm$ 0,27	15,84 $\pm$ 0,79	7,05 $\pm$ 0,35
3	16,93 $\pm$ 0,85	5,01 $\pm$ 0,25	13,62 $\pm$ 0,68	7,41 $\pm$ 0,37
4	16,52 $\pm$ 0,83	3,42 $\pm$ 0,17	12,80 $\pm$ 0,64	4,90 $\pm$ 0,26
5	12,53 $\pm$ 0,63	4,14 $\pm$ 0,21	10,31 $\pm$ 0,52	5,98 $\pm$ 0,3
6	9,29 $\pm$ 0,47	5,42 $\pm$ 0,27	14,19 $\pm$ 0,71	5,47 $\pm$ 0,27
7	12,20 $\pm$ 0,61	3,76 $\pm$ 0,19	13,97 $\pm$ 0,70	4,62 $\pm$ 0,23
8	9,42 $\pm$ 0,48	3,27 $\pm$ 0,16	11,02 $\pm$ 0,55	6,59 $\pm$ 0,33
9	8,83 $\pm$ 0,44	4,62 $\pm$ 0,23	16,96 $\pm$ 0,85	4,69 $\pm$ 0,23
10	8,74 $\pm$ 0,44	3,19 $\pm$ 0,16	10,32 $\pm$ 0,52	2,53 $\pm$ 0,13
11	10,40 $\pm$ 0,52	5,48 $\pm$ 0,27	15,45 $\pm$ 0,77	5,89 $\pm$ 0,29
12	10,48 $\pm$ 0,52	4,57 $\pm$ 0,23	9,81 $\pm$ 0,49	3,19 $\pm$ 0,16
Среднее	11,55 $\pm$ 2,32 <sup>a</sup>	4,28 $\pm$ 0,79 <sup>B</sup>	13,13 $\pm$ 1,90 <sup>a</sup>	5,61 $\pm$ 1,38 <sup>B</sup>

Средние, отмеченные одинаковыми буквами, достоверно не отличаются по U-критерию Манна-Уитни ( $p < 0,05$ ).

*C. intybus*, в результате которой были получены 12 линий корней. Полученные культуры характеризовались способностью к неограниченному росту на среде без фитогормонов, быстрым накоплением биомассы и отсутствием апикального доминирования. ПЦР-анализ показал встройку Т-ДНК бинарного вектора pCambia1301, что возможно лишь при генетической трансформации агробактериями. Все эти данные говорят о том, что нами были получены истинные волосовидные корни *C. intybus*. Ранее публиковались данные о получении волосовидных корней *C. intybus* овощного сорта Палла Росса (Matvieieva et al., 2011), которые авторы использовали для регенерации из них трансгенных растений. Здесь же мы сообщаем о создании волосовидных корней диких растений *C. intybus*, а также *C. intybus* корневого сорта Кофеек.

Проведенный нами спектрофотометрический анализ показал наличие в волосовидных корнях инулина, содержание которого увеличивалось в процессе культивирования, по крайней мере, в течение 90 суток. Результаты исследования свидетельствуют о том, что волосовидные корни, полученные трансформацией *A. rhizogenes*, способны сохранять биосинтез корнеспецифичного метаболита. Содержание инулина в волосовидных корнях при этом было сопоставимо с содержанием инулина в боковых корнях растений, растущих на почве, как у дикого растения, так и у сорта Кофеек (табл. 2 и 3). Исходя из полученных нами данных, можно полагать, что дальнейшее увеличение продолжительности культивирования волосовидных корней *C. intybus* может способствовать увеличению содержания инулина.

Накопление корневых метаболитов у волосовидных корней может быть как больше, так и меньше, чем у нативных корней (Gantait, Mukherjee, 2021; Pedreño, Almagro, 2020). Од-

нако в отличие от нативных корней при культивировании волосовидных корней возможно применение широкого спектра стимуляторов продукции метаболитов. Поэтому представляет интерес дальнейший поиск оптимального сочетания состава питательных сред и условий культивирования для накопления наибольшей биомассы и инулина в волосовидных корнях. Так, например, Tabatabaee и соавторы (2021) в своих исследованиях установили, что повышение содержания сахарозы в питательной среде до 60 г/л приводит к значительному увеличению накопления инулина в волосовидных корнях цикория до 53 % на сухую массу. К тому же ими было показано, что снижение содержания  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  до 0,5 мМ также способствует увеличению накопления инулина почти в 2 раза по сравнению с контролем (1,25 мМ). Также стоит отметить, что на уровень накопления инулина могут влиять регуляторы роста, что было показано в исследованиях Kirakosyan и соавторов (2022). Эксперименты, проведенные на каллусах *C. intybus*, показали увеличение содержания инулина при культивировании на питательной среде, содержащей 2 мг/л БАП и 7,5 мг/л ИУК.

Выявленное нами довольно небольшое содержание инулина в корнях *C. intybus* из почвы, вероятнее всего, связано с неоптимальными условиями для роста: маленькие вегетационные сосуды, нехватка освещения и минеральных удобрений. Кроме того, известно, что для получения инулина в промышленных объемах используются специальные сорта *C. intybus* корневого – *C. intybus* var. *sativum*, содержание инулина в корнях которого может достигать 12–30 % на сырую массу в полевых условиях выращивания, поэтому для дальнейших исследований целесообразно проводить агробактериальную трансформацию корневого *C. intybus*, причем

полученные волосовидные корни, вероятнее всего, будут накапливать больше инулина.

Хотя полученные результаты и свидетельствуют о том, что содержание инулина в волосовидных корнях ниже, чем в нативных корнях, получение инулина из волосовидных корней в условиях промышленного культивирования в биореакторах может иметь ряд преимуществ, таких как независимость от природных условий, отсутствие необходимости предварительной очистки корней, а также возможность круглогодичного культивирования, что в перспективе может частично компенсировать низкое содержание инулина.

### Заключение

В данной статье описывается исследование содержания инулина в волосовидных и нативных корнях растений *C. intybus*. Полученные результаты показали, что содержание инулина

в волосовидных корнях ( $1,46 \pm 0,46$  % – в корнях диких растений *C. intybus*,  $1,34 \pm 0,34$  % – в корнях сорта Кофеек), полученных с помощью агробактериальной трансформации, ниже, чем в нативных корнях (к примеру, в главном корне цикория сорта Кофеек содержалось  $11,55 \pm 2,32$  % инулина).

Получение инулина из волосовидных корней в биореакторах может иметь ряд преимуществ, например, таких как стабильность условий выращивания и возможность круглогодичного культивирования, что в перспективе может компенсировать низкое содержание инулина. Стоит отметить, что для промышленного производства из волосовидных корней следует использовать специальные сорта *C. intybus* с высоким содержанием инулина, а также изучить условия их культивирования в биореакторах для увеличения производительности.

### Список литературы / References

- Будько Д. (2019) Рынок инулина: Европа лидирует в мировом производстве, Россия подчитывает упущенные возможности. *Бизнес пищевых ингредиентов*, 2: 46–47 [Budko D. (2019) The inulin market: Europe leads the world in production, Russia counts lost opportunities. *Business of food ingredients* [Biznes pishchevykh ingredientov], 2: 46–47 (in Russian)]
- Матвеева Н. А., Кищенко Е. М., Шаховский А. М., Кучук Н. В. (2011) Синтез инулина «бородатыми корнями» цикория, трансформированного с помощью *Agrobacterium rhizogenes*. *Биотехнология*, 4(3): 56–63 [Matvieieva N. A., Kishchenko O. M., Shakhovsky A. M., Kuchuk M. V. (2011) Inulin synthesis in chihory hairy roots transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Biotechnology* [Biotekhnologiya], 4(3): 56–63 (in Ukrainian)]
- Яницкая А. В., Митрофанова И. Ю. (2012) Исследования по стандартизации инулинсодержащего лекарственного растительного сырья и противодиабетических комплексов. *Вестник Волгоградского государственного медицинского университета*, 4: 80–82 [Yanitskaya A. V., Mitrofanova I. Yu. (2012) Inulin herbal raw material and antidiabetic complex standartization research. *Journal of Volgograd State Medical University* [Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta], 4: 80–82 (in Russian)]
- Akram W., Garud N., Joshi R. (2019) Role of inulin as prebiotics on inflammatory bowel disease. *Drug Discoveries and Therapeutics*, 13(1): 1–8
- Canaday J., Gerard J. C., Crouzet P., Otten L. (1992) Organization and functional analysis of three T-DNAs from the vitopine Ti plasmid pTiS 4. *Molecular Genetics and Genomics*, 235(2–3): 292–303



- Costa G., Vasconcelos Q., Abreu G., Albuquerque A., Vilarejo J., Aragão G. (2020) Changes in nutrient absorption in children and adolescents caused by fructans, especially fructooligosaccharides and inulin. *Archives de Pédiatrie*, 27(3): 166–169
- Demirci T., Akçay U.Ç., Göktürk Baydar N. (2020) Physical and biochemical differences in *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transgenic hairy root lines of *Echinacea purpurea*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 56(6): 875–881
- Fathi R., Mohebodini M., Chamani E. (2019) High-efficiency *Agrobacterium rhizogenes*-mediated genetic transformation in *Cichorium intybus* L. via removing macronutrients. *Industrial Crops and Products*, 128: 572–580
- Gantait S., Mukherjee E. (2021) Hairy root culture technology: applications, constraints and prospect. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(1): 35–53
- Gelvin S.B. (2021) Plant DNA repair and *Agrobacterium* T– DNA integration. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16): 8458
- Hughes R.L., Alvarado D.A., Swanson K.S., Holscher H.D. (2022) The prebiotic potential of inulin-type fructans: a systematic review. *Advances in Nutrition*, 13(2): 492–529
- Kaur S. (2019) Medicinal uses of *Cichorium intybus*. *Advances in Pharmacology & Toxicology*, 20(3): 35–44
- Kirakosyan R.N., Sumin A. V., Polupanova A.A., Pankova M. G., Degtyareva I. S., Sleptsov N.N., Khuat Q. V. (2022) Influence of plant growth regulators and artificial light on the growth and accumulation of inulin of dedifferentiated chicory (*Cichorium intybus* L.) callus cells. *Life*, 12(10): 1524
- Malik B., Rehman R.U. (2021) Chicory inulin: a versatile biopolymer with nutritional and therapeutic properties. *Medicinal and aromatic plants*. Aftab T., Hakeem K. R. (eds.) Springer Nature Switzerland AG, p. 373–390
- Matvieieva N.A., Kishchenko O.M., Potrochov A.O., Shakhovsky A.M., Kuchuk M.V. (2011) Regeneration of transgenic plants from hairy roots of *Cichorium intybus* L. var. *Foliosum* Hegi. *Cytology and Genetics*, 45(5): 277–281
- Matvieieva N., Shakhovsky A., Kvasko O., Kuchuk N. (2015) High frequency genetic transformation of *Cichorium intybus* L. using *nptII* gene as a selective marker. *Cytology and Genetics*, 49(4): 220–225
- Pedreño M.A., Almagro L. (2020) Carrot hairy roots: Factories for secondary metabolite production. *Journal of Experimental Botany*, 71(22): 6861–6864
- Perović J., Tumbas Šaponjac V., Kojić J., Krulj J., Moreno D.A., García-Viguera C., Bodroža-Solarov M., Ilić N. (2021) Chicory (*Cichorium intybus* L.) as a food ingredient – nutritional composition, bioactivity, safety, and health claims: a review. *Food Chemistry*, 336: 127676
- Petropoulos S.A., Levizou E., Ntatsi G., Fernandes Â., Petrotos K., Akoumianakis K., Barros L., Ferreira I. C. F. R. (2017) Salinity effect on nutritional value, chemical composition and bioactive compounds content of *Cichorium spinosum* L. *Food Chemistry*, 214: 129–136
- Rao M., Gao C., Xu L., Jiang L., Zhu J., Chen G., Yuen Kwan Law B., Xu Y. (2019) Effect of inulin-type carbohydrates on insulin resistance in patients with type 2 diabetes and obesity: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Diabetes Research*, 2019: 5101423
- Rency A.S., Pandian S., Kasinathan R., Satish L., Swamy M.K., Ramesh M. (2019) Hairy root cultures as an alternative source for the production of high-value secondary metabolites. *Natural bio-*

*active compounds. Volume 3: biotechnology, bioengineering, and molecular approaches.* Akhtar M. S., Swamy M. K. (eds.) Singapore, Springer Nature Singapore Pte Ltd., p. 237–264

Tabatabaee S., Sanjarian F., Lohrasebi T., Karimi M. (2021) Enhanced inulin production by hairy root cultures of *Cichorium intybus* in response to Pi and Fe starvation. *Molecular Biology Research Communications*, 10(2): 85–91

Wan X., Guo H., Liang Y., Zhou C., Liu Z., Li K., Niu F., Zhai X., Wang L. (2020) The physiological functions and pharmaceutical applications of inulin: a review. *Carbohydrate Polymers*, 246: 116589