

## Fructan Determination in Transgenic *Nicotiana Tabacum L.* Plants Harboured Human Inf $\alpha 2b$ Gene Infected by Tobacco Mosaic Virus

Andrii Potrokhov \*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Adaptative Biotechnology Institute Cell Biology and Genetic Engineering, Ukraine

**Abstract:** Fructan is one of the main storage compounds in higher plants, their accumulation and synthesis is associated with the plant's adaptation. They take part in cryoprotection, osmoregulation and water balance and included in plant protection from pathogens (biotic stress). Fructan, anthocyanins, proline are involved in reduction of negative effects of biotic factors on plants.

Utilizing of genetic engineering methods makes it possible to create stress resistant plants. However, the impact of the transformation still remains unclear, because transformation can be regarded as biotic stress factor for plants. Investigation of the biotic stress effects on metabolic pathways in transformed plants is still actual.

The aim of our work was to identify changes in fructan accumulation caused by the presence of tobacco mosaic virus (TMV) in transgenic *Nicotiana tabacum* plants with human ifn -  $\alpha 2b$  gene.

Control wild type plants contained  $6.8 + 0.08$  mg/g of fructan. In the transgenic line №1, the level of fructan accumulation was  $4.68 \pm 1.02$  mg/g. In the transformed line №3, its content increased to  $30 + 1.8$  mg/g. The fructan content in control plants increased from  $6.8 + 0.08$  to  $8.2 + 1$  mg/g, after viral infection. For transgenic line №1, the content of fructan increased to  $25 + 1$  mg/g. The growth of fructan concentration was not observed in the line №3.

The increase in fructan content in infected transgenic plants can be regarded as adaptive response to viral infection as biotic stress.

### ARTICLE HISTORY

*Received: 06 January 2018*

*Revised: 23 February 2018*

*Accepted: 16 March 2018*

### KEYWORDS


*Nicotiana tabacum,*

*TMV,*

*fructans,*

*biotic stress,*

*interferon*

**CONTACT:** Andrii Potrokhov  [AlexGSMster@gmail.com](mailto:AlexGSMster@gmail.com)  
Biotechnology Institute Cell Biology and Genetic Engineering, Ukraine

 Laboratory of Adaptative

## Определение Содержания Полифруктанов В Трансгенных Растениях *Nicotiana Tabacum* L. С Геном *Inf-A2B* Человека, Инфицированных Вирусом Табачной Мозаики

**Резюме:** Были определены изменения в накоплении фруктанов в трансгенных растениях *Nicotiana tabacum* с геном *ifn - a2b* человека, вызванные наличием вируса табачной мозаики (ВТМ). Для получения экстрактов растительный материал взвешивали, гомогенизировали с добавлением фосфатного буфера (рН 7.4) и центрифугировали 15 минут при 15 тыс. g. После отбирали необходимую аликвоту для проведения анализов. Колориметрический метод (реакция Селиванова) применяли с использованием 0,1% спиртового раствора резорцина для определения количества полифруктанов. В результате было показано, что содержание фруктанов в контрольных растениях составило  $6,8 \pm 0,08$  мг/г. В разных линиях трансгенных неинфицированных растений было установлено как отсутствие достоверных различий накопления фруктанов по сравнению с их содержанием в контрольных нетрансформированных неинфицированных растениях, так и увеличение их содержания до  $25 \pm 1$  мг/г массы. В инфицированных трансгенных растениях содержание фруктанов было выше, чем их содержание в инфицированных нетрансформированных контрольных растениях и составляло до  $30 \pm 1,8$  мг/г и  $10 \pm 2,2$  мг/г соответственно.

Генетическая трансформация в ряде случаев приводила к повышению содержания фруктанов в трансгенных растениях. Наличие фитовирусной инфекции приводило к увеличению содержания фруктанов в инфицированных трансгенных растениях по сравнению с их содержанием в нетрансгенных инфицированных растениях. Вероятно, такое повышение является одной из реакций растений табака на фитовирусную инфекцию как на биотический стрессовый фактор. Следует отметить, что как генетическая трансформация, так и инфекция приводили к развитию растительного ответа, вызванного биотическим стрессовым фактором. Таким образом, нами было показано, что растения реагируют на влияние двух стрессовых факторов, что выражается в накоплении фруктанов, как одного из возможных защитных механизмов.

### ИСТОРИЯ СТАТЬИ

Получено:

06 Января 2018

Пересмотренный:

23 Февраля 2018

Принято: 16 Марта 2018

### КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

*Nicotiana tabacum* L,

ВТМ,

фруктаны,

биотический стресс,

интерферон.

## 1. ВВЕДЕНИЕ

Фруктаны являются одними из главных запасных соединений высших растений [9]. Выделяют несколько основных типов фруктанов: инулин (в основном у двудольных), леван, нео-инулин и нео-леван (у однодольных). У двудольных растений фруктаны накапливаются как долгосрочные резервные углеводы в основном в подземных органах [17]. Их накопления и синтез относят к адаптационной реакции растения на стресс [8]. Известно, в частности, что фруктаны участвуют в процессах криопротекции и осморегуляции клеток и обеспечивают поддержание водного баланса, обеспечивая длительную защиту мембран растений от обезвоживания, препятствуют высушиванию при абиотических стрессах [13, 14], снижают негативное воздействие замораживания [6, 7]. Было показано, что они могут стабилизировать мембранные структуры и уменьшать отток воды из клеток [13]. Благодаря фруктанам поврежденные растения могут быстро восстанавливаться [6]. При биотических стрессах фруктаны включаются в синтетические процессы, направленные на защиту растительного организма от негативного воздействия патогена, стабилизируя мембранные структуры [15]. Явление, которое связано с повышенным синтезом фруктанов при биотических стрессах, получило название «сладкий иммунитет» [10]

Методами генетической инженерии возможно создание устойчивых к стрессам растений, однако, известно, что сама генетическая трансформация является стрессом для растений и может приводить к накоплению фруктанов в растениях. Фитовирусная инфекция также является биотическим стрессовым фактором, поэтому актуально комплексное исследование действия биотических стрессов (трансформация и наличие вируса) на изменения синтеза фруктанов в трансформированных растениях [5].

Исходя из этого, целью нашей работы было исследовать изменения в синтезе фруктанов в трансформированных растениях *Nicotiana tabacum* с геном *ifn- $\alpha$ 2b* человека до и после инфицирования вирусом табачной мозаики.

## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования использовали полученные нами ранее растения *Nicotiana tabacum* L сорта *Petit Havana* с генами *ifn- $\alpha$ 2b* человека и неомицинфосфотрансферазы II. Растения выращивали в стерильных условиях на безгормональной среде МС [11]. Опытные растения переносили в стерильную почву для дальнейшего роста в условиях теплицы при температуре +24°C с 16-часовым режимом освещения.

Вирусосодержащий материал получали из пораженных листьев растений табака с симптомами вирусной инфекции путем гомогенизации в фосфатном буфере (рН 7,4) с последующим центрифугированием в режиме 5 тыс. g 20 мин. Полученный материал был инокулирован в растения механическим втиранием в молодые листья верхнего яруса растения.

Для получения экстрактов растительный материал взвешивали, гомогенизировали с добавлением фосфатного буфера (рН 7.4) и центрифугировали 15 минут при 15 тыс. g. После отбирали необходимую аликвоту для проведения анализов.

Реакцию Селеванова проводили следующим образом: к 100 мкл экстракта добавляли по 100 мкл 0,1% спиртового раствора резорцина и HCl (5:1). Полученный раствор нагревали на водяной бане 5 мин при температуре 80°C. После нагревания в течение 5 мин при температуре 80°C и появления характерного вишневого окраса проводили измерение оптической плотности на автоматическом анализаторе Eppendorf biofotometr plus при длине волны 550 нм.

Исследование проводилось в трех повторностях. Для обработки статистических данных использовали пакет программ MS Exel 2003.

## 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

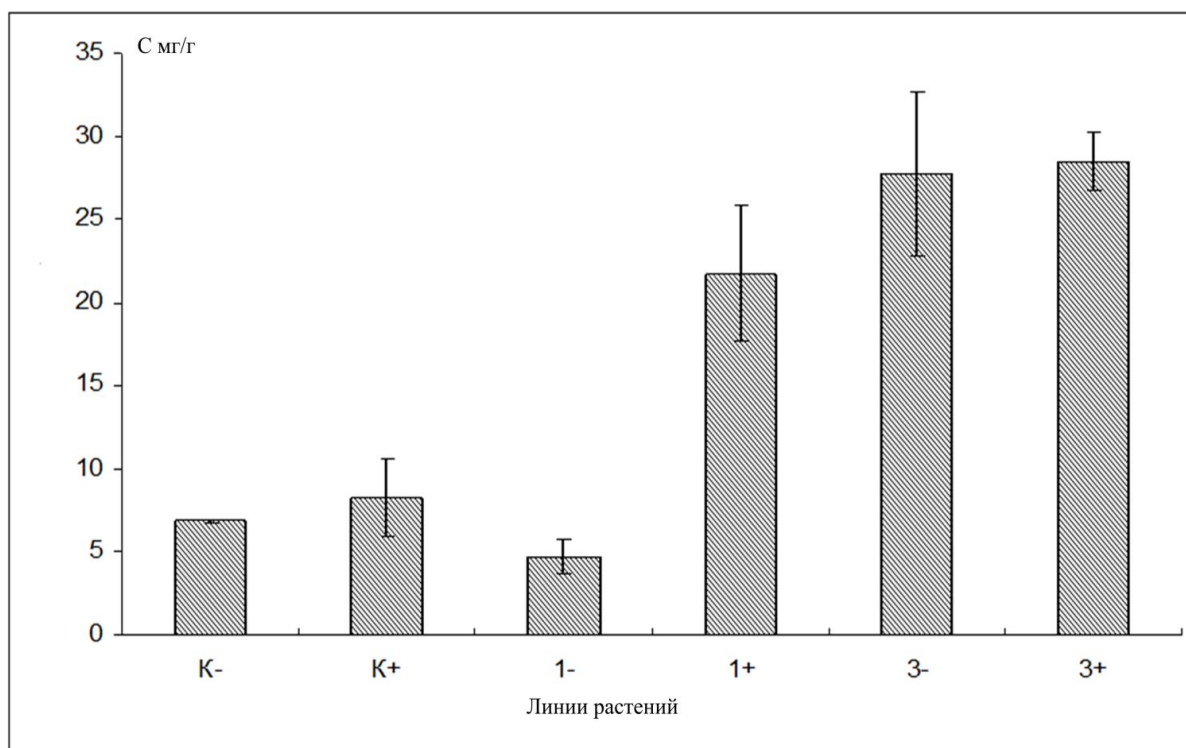
Ранее нами были получены трансгенные растения *Nicotiana tabacum* с геном *ifn- $\alpha$ 2b* человека, их трансгенная природа была подтверждена молекулярно-биологическими методами. Для данного исследования были выбраны две разные линии трансгенного табака, которые были получены из разных исходных эксплантов и являющиеся разными трансформационными событиями.

В результате исследования было показано, что в растениях дикого типа содержание фруктанов составило  $6,8 \pm 0,08$  мг/г. В трансгенной линии №1 уровень накопления фруктанов достоверно не отличался от уровня этих соединений в контрольных растениях и составлял  $4,68 \pm 1,02$  мг/г (рис. 1). Трансгенной линии № 3 наблюдалось повышение содержания фруктанов до  $30 \pm 1,8$  мг/г (рис. 1).

В наших предыдущих исследованиях, проведенных на растениях цикория [2-4] и салата [1], которые были трансформованы *Agrobacterium rhizogenes* или *Agrobacterium tumefaciens* с векторной конструкцией с геном интерферона *ifn- $\alpha$ 2b* человека, также было

отмечено, что содержание фруктанов в трансгенных растениях может как оставаться на уровне контроля, так и превышать контрольные показатели. Вероятно, это вызвано фактом переноса чужеродного гена в разные места в геноме растений. Следовательно, можно предположить, что растения разных видов могут подобным образом реагировать на генетическую трансформацию, которая в ряде случаев может приводить к повышению уровня накопления запасных соединений.

После инфицирования ВТМ происходили изменения в накоплении фруктанов. При инфицировании их содержание росло как в контрольных инфицированных растениях дикого типа, так и в трансгенных растениях с симптомами вирусной инфекции (линии №1 и №3). В контрольных растениях содержание фруктанов повышалось незначительно и составило  $8,2 \pm 1$  мг/г. Для трансгенных растений линии №1 произошло увеличение содержания фруктанов до  $25 \pm 1$  мг/г. Однако, в линии №3 после инфицирования не произошло существенного повышения содержания фруктанов. Этот факт можно объяснить тем, что синтез фруктанов при культивировании *in vitro* частично зависит от наличия субстрата (сахарозы) в среде. Поскольку содержание сахарозы в среде фиксировано, возможно, что именно это лимитирование привело к отсутствию дальнейшего роста содержания фруктанов в инфицированных трансгенных растениях линии №3. Вероятно, содержание этих веществ в клетках растений было лимитировано количеством субстрата.



**РРис. 1.** Содержание полифруктанов в растениях табака до и после инфицирования ВТМ [Примечание: - неинфицированные ВТМ растения, + инфицированные ВТМ растения; К: контрольные нетрансформированные растения; 1 и 3: линий трансгенных растений]

В результате нами было показано, что после инфицирования растений происходит повышение содержания фруктанов, что, вероятно, является результатом биотического стресса, вызванного персистенцией в их организме фитовирусной инфекции. Отсутствие значительного повышения содержания фруктанов в контрольных растениях с вирусом

по сравнению с содержанием этих соединений в контрольных растениях без вируса и увеличение содержания фруктанов в трансгенных инфицированных растениях можно расценивать как стрессовую и адаптационную реакцию трансгенных растений к вирусной инфекции. Вероятно, это вызвано физиологическими особенностями растений., поскольку каждая из полученных линий является отдельным трансформационным событием и реагирует на стресс по-разному. Однако в растениях, подвергшихся воздействию фитовирусной инфекции, происходило увеличение содержания фруктанов, что, вероятно, обусловлено развитием стресс-реакции и ответом растения на биотический стресс, вызванный циркуляцией фитовируса.

#### 4. ОБСУЖДЕНИЕ

Генетическая трансформация в ряде случаев приводила к повышению содержания фруктанов в трансгенных растениях *Nicotiana tabacum* с геном *ifn- $\alpha$ 2b* человека. Наличие фитовирусной инфекции приводило к увеличению содержания фруктанов в инфицированных трансгенных растениях по сравнению с их концентрацией в нетрансгенных инфицированных растениях. Вероятно, такое повышение является одной из реакций растений табака на фитовирусную инфекцию.

После трансформации, как и после инфицирования реакция растений была схожа и проявлялась в повышении содержания фруктанов. Следует отметить, что как генетическая трансформация, так и инфекция приводили к развитию растительного ответа, вызванного биотическим стрессовым фактором. Таким образом, нами было показано, что растения реагируют на влияние двух стрессовых факторов, что выражается в накоплении фруктанов, как одного из возможных защитных механизмов.

#### Orcid

Andrii Potrokhov  <https://orcid.org/0000-0002-6391-1106>

#### 5. СПИСОК ЛИТЕРАТУРИ

- [1]. Елисеєва, Ю.В., Матвєєва, Н.А. (2013). Використання *Agrobacterium rhizogenes*–опосередкованої трансформації для підвищення вмісту поліфруктанів у коренях салату *Lactuca sativa* L, *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 12, 216-219.
- [2]. Матвєєва, Н., Берегова, Т., Кваско, О. (2011). Біосинтез пребіотика інуліну в рослинах цикорію в культурі *in vitro*, *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Біологія*, 57, 7-8.
- [3]. Матвєєва, Н.А., Кваско, О.Ю. (2011). Особливості накопичення поліфруктанів в трансгенних рослинах цикорію *Cichorium intybus* L. *Вісник українського товариства генетиків і селекціонерів*, 9(1), 65-69.
- [4]. Матвєєва, Н.А., Кіщенко, О.М., Шаховський, А.М., Кучук, М.В. (2011). Синтез інуліну в «бородатих» коренях цикорію, трансформованого за допомогою *Agrobacterium rhizogenes*, *Біотехнологія*, 4(3), 56-63.
- [5]. Celine, H. M., Levinus, A. (2007). Inulin and Oligofructose in Chronic Inflammatory Bowel Disease. *J. Nutr.* – 137 (11), 1-3.
- [6]. Christopher, W. E., Philip, J. (1989). Localization of the Enzymes of Fructan Metabolism in Vacuoles Isolated by a Mechanical Method from Tubers of Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *Plant Physio*, 1(89), 658-663.
- [7]. David, P., Livingston, D.P., Dirk, K. (2009). Fructan and its relationship to abiotic stress tolerance in plants. *Cell Mol Life Sci*, 66(13), 2007–2023.
- [8]. Hendry, F. (1993) Evolutionary origins and natural functions of fructans – a climatological, biogeographic and mechanistic appraisal. *New Phytologist*, 123(1), 3–14.

- [9]. Moghaddam, M.R., Van den Ende, W. (2013). Sweet immunity in the plant circadian regulatory network. *J Exp Bot.*, 64(6), 1439-1449.
- [10]. Murashige T., Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol Plant*, 15(3), 473–497.
- [11]. Niness, K.R. (1999) Inulin and Oligofructose. *Nutrition*, 129 (5),1402-1406
- [12]. Ranjitha, B. D., Velayutham, P., Anitha, S.A. (2007). Comparative study on inulin and esculin content of in vitro and in vivo plant of Chicory (*Cichorium intybus* L.). *Advantage in Biological Research*, 1(2), 22–25.
- [13]. Sprenger, N., Schellenbaum, L., Van Dun, K. (1997). Fructan synthesis in transgenic tobacco and chicory plants expressing barley sucrose: fructan 6-fructosyl transferase. *FEBS Lett.*, 400(3), 355–358.
- [14]. Suzuki, N., Rizhsky, L., Liang, H., Shuman, J., Shulaev, V. (2005) Enhanced Tolerance to Environmental Stress in Transgenic Plants Expressing the Transcriptional Coactivator Multiprotein Bridging Factor 1c and Ron Mittler. *Plant Physiology*, 139(3),1313-1322.
- [15]. Valluru, R, Van den Ende, W. (2008) Plant fructans in stress environments: emerging concepts and future prospects, *J Exp Bot*, 59(11), 2905-2916.
- [16]. Vijn, I., Smeekens, S. (1999). Fructan: more than a reserve carbohydrate? *Plant Physiol.*, 120(2), 351–360.



## EXTENDED SUMMARY

### Introduction

Fructan is one of the main storage compounds in higher plants, their accumulation and synthesis is associated with the plant's adaptation. They take part in cryoprotection, osmoregulation and water balance and included in plant protection from pathogens (biotic stress). The increase of fructan synthesis under the biotic stresses has been associated with plant "sweet immunity". Fructan, anthocyanins, proline are involved in reduction of negative effects of biotic factors on plants.

Utilizing of genetic engineering methods makes it possible to create stress resistant plants. However, the impact of the transformation still remains unclear, because transformation can be regarded as biotic stress factor for plants. Genetic transformation can lead to the fructan accumulation in plants and to provide an effect on the plants metabolism. Investigation of the biotic stress effects on metabolic pathways in transformed plants is still actual.

The aim of our work was to identify changes in fructan accumulation caused by the presence of tobacco mosaic virus (TMV) in transgenic *Nicotiana tabacum* plants with human *ifn -  $\alpha$ 2b* gene. Selivanov reaction was used to determine fructan content.

### Material and Method

Control wild type plants contained  $6.8 \pm 0.08$  mg/g of fructan. In the transgenic line №1, the level of fructan accumulation was  $4.68 \pm 1.02$  mg/g. In the transformed line №3, its content increased to  $30 \pm 1.8$  mg/g. In our previous study of transgenic chicory plants and salad were investigated. It was shown that *Agrobacterium* – mediated transformation can either increase the level of fructans or remain at control level. The phenomenon can be explained by position effect of T-DNA integration. We presume that each transformed line is a separate transformation event and has unique stress reaction.

### Result

The fructan content in control plants increased from  $6.8 \pm 0.08$  to  $8.2 \pm 1$  mg/g, after viral infection. For transgenic line №1, the content of fructan increased to  $25 \pm 1$  mg/g. In contrast, the growth of fructan concentration was not observed in the line №3. The fructan synthesis depends on the substrate (sucrose) in the medium during *in vitro* cultivation. The fixed sucrose content in the medium can limit further growth fructan accumulation. Probably, in line №3 the fructan content is limited by substrate in medium.

### Discussion

The increase in fructan content in infected transgenic plants can be regarded as adaptive response to viral infection as biotic stress.

The increase of fructan content was observed both after transformation and viral infection. Genetic transformation or viral infection was the biotic stress factors leading to the development of plant response. Fructan accumulation is one of the possible adaptive mechanisms to the stress influence.