

УДК 574.24+604.6

## ВПЛИВ ТЕМПЕРАТУРНОГО СТРЕСУ НА «БОРОДАТІ» КОРЕНІ *ALTHAEA OFFICINALIS*, ЩО НЕСУТЬ ГЕН ІНТЕРФЕРОНУ $\alpha 2b$ ЛЮДИНИ

Н.А. МАТВЄЄВА, Я.І. РАТУШНЯК, В.П. ДУПЛІЙ, А.М. ШАХОВСЬКИЙ, М.В. КУЧУК

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, вул. Академіка Заболотного, 148, м. Київ, 03143, Україна

E-mail: dupliyv@icbge.org.ua

«Бородаті» корені, отримані в результаті генетичної трансформації рослин ґрунтовими фітопатогенними бактеріями *Agrobacterium rhizogenes*, є цінними продуцентами важливих вторинних метаболітів з лікувальними властивостями, а також зручним модельним об'єктом для вивчення реакції рослин на дію несприятливих умов довкілля. У даній роботі проведено порівняння відкладеної відповіді «бородатих» коренів *Althaea officinalis* L. на дію короткотермінового холодного та високотемпературного стресу. Отримані результати свідчать про те, що «бородаті» корені різних ліній *A. officinalis* (окремі трансформаційні події) відрізняються за чутливістю до дії короткочасного температурного стресу незалежно від використаного для трансформації вектору та наявності в ньому гена інтерферону іfn- $\alpha 2b$  людини. Висока температура призводила до значного гальмування росту коренів усіх ліній, крім тієї, що мала найвищий вміст флавоноїдів за контрольних умов. З іншого боку, короткочасне культивування «бородатих» коренів за зниженої температури не викликало пригнічення росту. Одночасно з інгібуванням росту при підвищенні температури спостерігалася активізація синтезу флавоноїдів, вірогідно, як відповідь рослин на дію високої температури як стресового фактору. Показано сильну ( $R^2 = 0,78$ ) лінійну залежність антиоксидантної активності екстрактів із «бородатих» коренів від вмісту в них флавоноїдів. Таким чином, флавоноїди, очевидно, беруть участь у процесі відповіді та адаптації коренів до високотемпературного стресу.

**Ключові слова:** *Agrobacterium rhizogenes*, *Althaea officinalis*, «бородаті» корені, температурний стрес, флавоноїди, антиоксидантна активність.

**Вступ.** *Agrobacterium rhizogenes* є ґрунтовими фітопатогенними бактеріями, які давно та ефек-

тивно використовуються для генетичної трансформації рослин завдяки природній здатності переносити частину власного геному. Результатом такого переносу є отримання культур «бородатих» коренів, які мають бактеріальні *rol* гени, що обумовлюють характерний фенотип таких коренів. Відомо, що ці гени можуть впливати на метаболізм трансформованих коренів та приводити до змін у синтезі великої групи різноманітних сполук, які задіяні у численних важливих процесах в клітинах рослин (Srivastava and Srivastava, 2007). З них варто відзначити флавоноїди, що беруть участь у адаптації рослин до дії низьких та високих температур (Sanghera et al., 2011; Fini et al., 2011; Ramakrishna and Ravishankar, 2011). Так, у експериментах з двадцятьма мутантними лініями *Arabidopsis thaliana* встановлено, що знижений вміст флавоноїдів у різних мутантів погіршував толерантність листків до низької температури. Авторами також встановлено, що участь флавоноїдів у стійкості до низьких температур є генотип-залежною (Schulz et al., 2016).

Деякі флавоноїди, зокрема, флавоноли та антицианіни, відіграють важливу роль у толерантності рослин до замерзання. На прикладі досліджень *A. thaliana* встановлено важливість посттранскрипційних механізмів у регуляції флавоноїдного обміну у відповідь на холодний стрес, якому піддавали рослини (Schulz et al., 2015). На модельних рослинах арабідопсису було продемонстровано залежність стійкості до холодного стресу (4 °C) від кількісного вмісту флавоноїдів (Choi et al., 2009).

© Н.А. МАТВЄЄВА, Я.І. РАТУШНЯК, В.П. ДУПЛІЙ, А.М. ШАХОВСЬКИЙ, М.В. КУЧУК, 2021

Також було встановлено залежність між вмістом флавоноїдів та експозицією при підвищеній температурі. Наприклад, А. Wahid (Wahid, 2007) встановив, що вміст антоціанів у рослинах *Saccharum officinarum* зростає після дії теплового стресу (40 °С). У дослідженні Wang та Zheng (Wang and Zheng, 2001), проведеного на рослинах полуниці, виявлено більший вміст флавоноїдів при підвищеній температурі. Разом з тим, слід зазначити, що особливості відповіді рослин на дію несприятливих температур можуть бути різними для різних видів. Зокрема, у роботі Boo et al. (Boo et al., 2006) було показано, що найбільший рівень синтезу флавоноїдів (антоціанів) спостерігався при вирощуванні рослин при зниженій температурі та майже повністю інгібувався при підвищенні температури до 30 °С.

Раніше (Наврулюк et al., 2017) нами було досліджено особливості росту культур «бородатих» коренів полину при дії температурного стресу та встановлено, що різні лінії коренів (окремі трансформаційні події) характеризуються різною адаптивністю до дії холодного стресу, що проявлялося як у відмінностях швидкості росту, так за вмістом флавоноїдів.

Метою цієї роботи було вивчити вплив короточасного культивування «бородатих» коренів алтеї *Althaea officinalis* за знижених та підвищених температур: на швидкість їх подальшого росту, накопичення в них флавоноїдів та антиоксидантну активність їх екстрактів.

**Матеріали і методи.** Вихідним матеріалом слугували «бородаті» корені *A. officinalis*, що були отримані нами раніше з використанням *A. rhizogenes* дикого штаму А4 (лінія 5) (Matvieieva 2012), а також *A. rhizogenes* з векторами рСВ161 (лінії 3, 4) (Matvieieva et al., 2011) та рСВ124 (лінії 1, 2) (Matvieieva et al., 2009). Корені, трансформовані бактеріями з векторами рСВ161 та рСВ124, мали ген *ifn-α2b* під МІІ та 35S промоторами відповідно. Корені субкультивували на агаризованому живильному середовищі Мурасіге і Скуга зі зменшеною удвічі концентрацією макросолей (1/2МС) (Murashige and Skoog, 1962).

Для підтвердження наявності перенесених генів використовували метод ПЛР. Рослинну ДНК виділяли за методикою, використаною раніше (Matvieieva et al., 2020). Присутність перенесених генів визначали на ампліфікаторі

Mastercycler personal 5332 (Eppendorf). Реакційна суміш складалася з одноразового ПЛР-буфера з сульфатом амонію, 0,2 мкМ праймерів, 200 мкМ дезоксинуклеозидтрифосфатов, 0,5 од. Таq-полімерази, 10–50 нг ДНК. Для ампліфікації використовували праймери, специфічні до генів *ifn-α2b* та *rol B* (відповідно, 5'-ttgatgctcctggcacag-3' і 5'-ttctgctctgacaacctc-3' (396 п.н.) та 5'-ctcactccagcatggagcca-3' і 5'-attgtgtggcgccgaagcta-3' (592 п.н.)). Умови ампліфікації: первинна денатурація – 94 °С, 3 хв, 33 цикли ампліфікації (94 °С, 30 с – 60 °С, 30 с – 72 °С, 30 с), заключний синтез – 72 °С, 5 хв.

Для визначення впливу температурного фактору корені культивували за таких умов:

впродовж 7 діб за температури +10 °С, потім 4 тижні за температури 24 °С (дослідний варіант 1);  
впродовж 7 діб за температури +36 °С, потім 4 тижні за температури 24 °С (дослідний варіант 2);  
впродовж 5 тижнів за температури 24 °С (контрольний варіант).

Приріст маси коренів  $\Delta m$  у трьох варіантах експерименту визначали за формулою:

$$\Delta m = m - m_0$$

де  $m_0$  – маса коренів на початку експерименту;  $m$  – маса коренів через 5 тижнів.

Для отримання екстрактів корені гомогенізували у 70%-ному етанолі, центрифугували (Eppendorf Centrifuge 5415 C) при 4 000 g впродовж 10 хв. Отриманий супернатант використовували для визначення загального вмісту флавоноїдів та антиоксидантної активності. Вміст флавоноїдів визначали модифікованим методом (Pękal and Puzynska, 2014). Визначення інтенсивності забарвлення розчину проводили через 30 хв на спектрофлуориметрі «Флюорат-02-Панорама» при довжині хвилі  $\lambda = 510$  нм. Для отримання калібрувального графіку використовували розчин рутину у 70%-ному етанолі ( $y = 0,9186x$ ,  $R^2 = 0,9357$ ). Загальний вміст флавоноїдів визначали у мг/г вологої маси коренів у рутиновому еквіваленті (мг РЕ/г ВМ).

Антиоксидантну активність (АОА) екстрактів «бородатих» коренів визначали з використанням розчину DPPH радикалу згідно оптимізованої методики (Matvieieva et al., 2020).

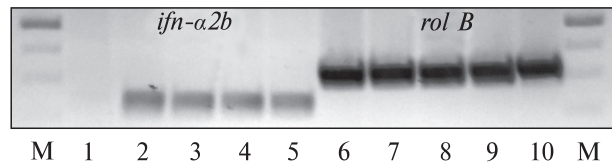
Оптичну густину розчинів визначали на спектрофлуориметрі «Флюорат-02-Панорама» при довжині хвилі  $\lambda = 515$  нм.

Статистичну обробку та побудову діаграм проводили в програмному середовищі R версії 3.5.3, використовуючи інтегроване середовище розробки RStudio версії 1.2. Розраховували довірчі інтервали та проводили порівняння середніх на рівні значимості  $p < 0,05$ .

**Результати та обговорення.** Наявність перенесених генів у різних лініях «бородатих» коренів *A. officinalis* підтверджували за допомогою ПЛР аналізу з використанням праймерів, специфічних до генів *ifn- $\alpha$ 2b* та *rol B*. Як видно на рис. 1, для ліній №№ 1–4 виявлено фрагменти очікуваного розміру, що відповідають генам *ifn- $\alpha$ 2b* (396 п.н.) та *rol B* (592 п.н.). У лінії № 5, отриманої після трансформації диким штамом *A. rhizogenes*, виявлено ампліфікований фрагмент розміром 592 п.н., що свідчить про наявність гена *rol B*.

Різні лінії коренів алтеї відрізнялися за швидкістю росту за контрольних умов (рис. 2). Так, приріст маси коренів лінії № 3 був найбільшим та становив  $0,63 \pm 0,28$  г за 5 тижнів. Найменший приріст спостерігали у коренів лінії № 4 –  $0,17 \pm 0,09$  г. Така значна різниця (у 3,7 рази) не пов'язана з відмінностями у векторі, який використовували для трансформації, оскільки в обох випадках *A. rhizogenes* містила вектор pCB161, у якому ген *ifn- $\alpha$ 2b* знаходився під контролем M11 промотора. Вірогідно, різні темпи росту різних ліній обумовлені результатом недетермінованого місця вбудовування перенесених генів і, таким чином, різного їх впливу на метаболізм клітин.

Вирощування при зниженій температурі не призводило до інгібування росту коренів (рис. 3), відмінності порівняно із контрольними умовами не перевищували статистичної похибки. Так, приріст маси коренів лінії № 1 (pCB124) після дії зниженої температури становив  $0,63 \pm 0,10$  г, а за контрольних умов вирощування –  $0,50 \pm 0,22$  г. Відповідні показники для лінії № 3 (pCB161) дорівнювали  $0,73 \pm 0,06$  г та  $0,63 \pm 0,28$  г, а лінії № 5 –  $0,48 \pm 0,04$  г та  $0,43 \pm 0,12$  г. Таким чином, відносно короткий період зниження температури відкладено не призводив до пригнічення росту коренів усіх ліній незалежно від використаних для трансфор-



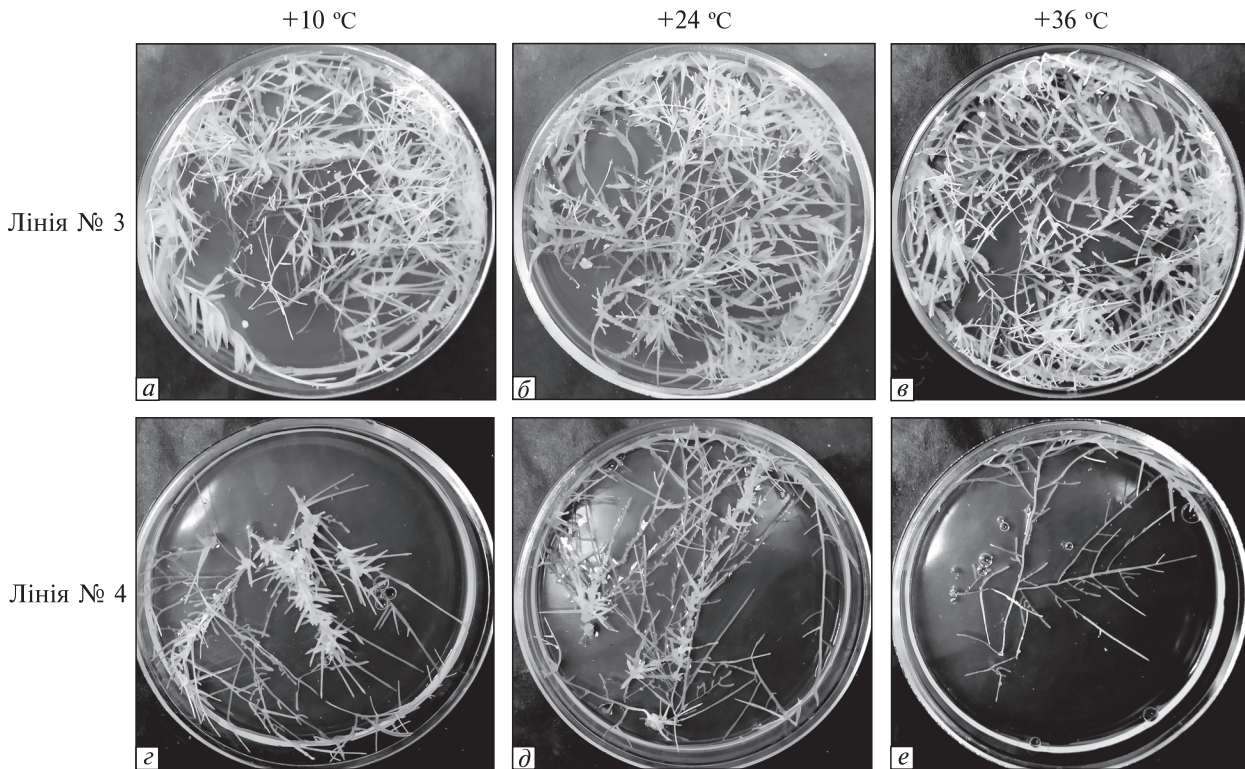
**Рис. 1.** Електрофореграма результатів ПЛР аналізу «бородатих» коренів алтеї *Althaea officinalis* з використанням праймерів, специфічних до генів *ifn- $\alpha$ 2b* (1–5) та *rol B* (6–10): 1 та 6 – трансформовані *A. rhizogenes* A4 (лінія 5); 2, 3 та 7, 8 – корені, трансформовані бактеріями *A. rhizogenes* з вектором pCB124 (лінії 1, 2), 4, 5 та 9, 10 – pCB161 (лінії 3, 4 відповідно). М – маркер GeneRuler SM1163

мування векторів та наявності або відсутності гена *ifn- $\alpha$ 2b*. Це свідчить про досить широкий діапазон адаптивних можливостей «бородатих» коренів при дії зниженої температури, а також відсутність неспецифічного ефекту наявності гена, що кодує синтез інтерферону.

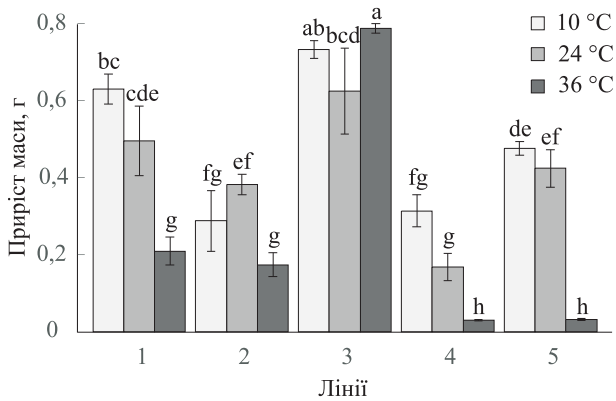
Після вирощування впродовж 7 діб при підвищеній температурі у більшості ліній «бородатих» коренів (у чотирьох з п'яти) спостерігали пригнічення росту. Так, приріст маси коренів № 1, 2, 4 та 5 був меншим за приріст за контрольних умов у 2,38, 2,11, 5,67 та 14,33 рази, відповідно (рис. 3). Разом з тим, корені № 3 відрізнялись стійкістю до високих та низьких температур, оскільки прирости маси у трьох варіантах експерименту (контроль, дія зниженої та підвищеної температури) майже не відрізнялися і становили  $0,63 \pm 0,28$  г,  $0,73 \pm 0,06$  г та  $0,79 \pm 0,03$  г, відповідно.

Флавоноїди є вторинними метаболітами рослин, які характеризуються антиоксидантною активністю і беруть участь у адаптації рослин до дії стресових чинників різного генезу. Нами було визначено особливості накопичення флавоноїдів у «бородатих» коренях алтеї, які вирощували за різних температурних умов. Дослідження показали наявність відмінностей у вмісті флавоноїдів у досліджуваних зразках навіть при їх вирощуванні за контрольних умов. Зокрема, найбільший вміст флавоноїдів виявлено у коренях № 3 –  $1,62 \pm 0,29$  мг РЕ/г ВМ (рис. 4).

Треба відзначити, що температурний стрес не приводив до зменшення вмісту флавоноїдів у «бородатих» коренях. Вміст флавоноїдів у екстрактах варіював від значень, що статистично



**Рис. 2.** Ріст «бородатих» коренів *Althaea officinalis*, лінії № 3 (а, б, в) та № 4 (з, д, е): а, з – ріст коренів після короткочасного вирощування при +10 °С; б, д – ріст за контрольних умов; в, е – ріст після короткочасного вирощування при +36 °С



**Рис. 3.** Приріст маси «бородатих» коренів *Althaea officinalis* ліній №№ 1–5 через 5 тижнів культивування при дії температурного стресу (10 °С і 36 °С) та за контрольних умов (24 °С). На діаграмі вказано стандартне відхилення, однакові букви показують відсутність статистично значимої різниці

не відрізнялись від контролю, до таких, що у кілька разів були більшими за контроль. Короткочасне вирощування коренів при зниженій

до +10 °С температурі привело до значимого збільшення флавоноїдів у 1,33 та 1,23 рази тільки для ліній 2 і 3 відповідно. Разом із тим, відносно короткочасне підвищення температури при вирощуванні зразків № 2, 3, 4 та 5 привело до збільшення вмісту флавоноїдів у 1,22–2,89 рази. У ліній № 3, вміст флавоноїдів у якої був найбільшим та значимі зміни були найменшими за різних умов культивування, вміст флавоноїдів збільшувався лише в 1,22 та 1,23 рази при холодovому та тепловому стресах відповідно. Слід зазначити, що саме цей зразок також мав найвищий приріст маси, якийне зменшувався внаслідок дії температурного стресу.

Аналіз антиоксидантної активності екстрактів з «бородатих» коренів виявив сильну кореляцію між загальним вмістом флавоноїдів та цим параметром (рис. 5). Так, зразки, що мали більший вміст флавоноїдів, характеризувалися і більшою антиоксидантною активністю. Наприклад, екстракти з коренів № 3 мали найбільший

вміст флавоноїдів ( $1,62 \pm 0,29$ ,  $1,99 \pm 0,04$  та  $1,97 \pm 0,10$  мг РЕ/г ВМ, контроль, холодний, тепловий стрес відповідно) та найбільшу антиоксидантну активність, що проявлялося у найнижчих значеннях  $EC_{50}$  – 11,2, 10,8 та 19,0 у трьох варіантах експерименту відповідно. Позитивна лінійна залежність АОА (негативна для значень  $EC_{50}$ ) від вмісту флавоноїдів із високим коефіцієнтом детермінації ( $R^2 = 0,78$ ) свідчить про значний їх вплив на захист рослин від вільних радикалів.

Одним із механізмів захисної дії флавоноїдів під час температурного стресу може бути видалення активних форм кисню завдяки антиоксидантній дії цих сполук (Wang et al., 2006). Флавоноїди, які локалізовані у вакуолі та ядрі, мають здатність до захисту мембран, що покращує стійкість рослин до температур, далеких від оптимальних (Agati et al., 2012). Підвищені температури можуть активізувати синтез у рослинах сполук фенольної природи, зокрема, флавоноїдів, імовірно, завдяки активації каталітичних ферментів (Wu et al., 2016). Наприклад, у рослин пшениці, які вирощували за різних температурних умов, виявлено підвищення загального вмісту флавоноїдів та фенольних кислот при підвищенні температури (Shamloo et al., 2017). Рослини полуниці при підвищенні температури накопичували більше поліфенолів та проявляли більшу антиоксидантну активність (Wang and Zheng, 2001).

В цій роботі, як і в попередніх наших дослідженнях (Matvieieva et al., 2019; 2020), була продемонстрована сильна лінійна залежність антиоксидантної активності від вмісту флавоноїдів у рослинних екстрактах. Дослідження не виявило помітного позитивного чи негативного впливу наявності гена інтерферону у «бородатих» коренях, отриманих із використанням різних векторів, на ріст цих коренів, вміст флавоноїдів та антиоксидантну активність флавоноїдвмісних екстрактів. За вмістом флавоноїдів, як за нормальних умов, так і в наслідок реакції на температурний стрес, лінія № 5, що не несе гена інтерферону, не відрізнялася від лінії № 4, що такий ген має. З іншого боку, розбіжності у вмісті флавоноїдів між лініями № 3 та № 4, що були отримані внаслідок генетичної трансформації одним вектором, можуть бути

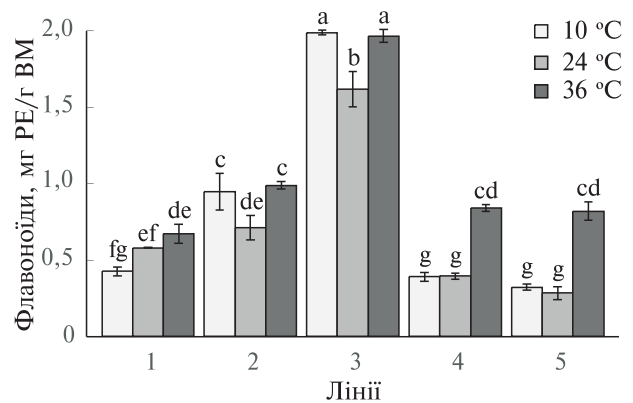


Рис. 4. Загальний вміст флавоноїдів у «бородатих» коренів *Althaea officinalis* ліній №№ 1–5 через 5 тижнів при дії температурного стресу (10 °C і 36 °C) та за контрольних умов (24 °C). На діаграмі вказано стандартне відхилення, однакові букви показують відсутність статистично значимої різниці

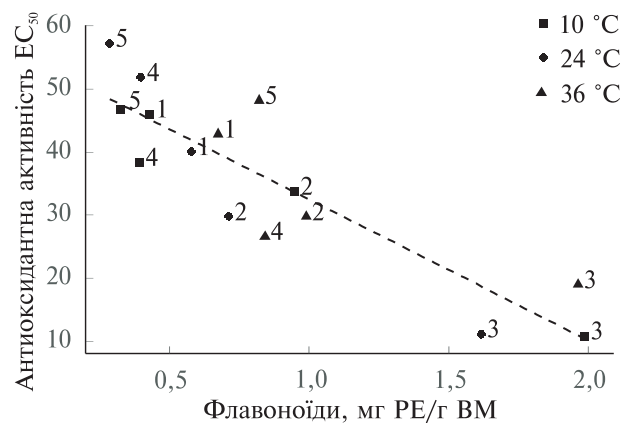


Рис. 5. Залежність ( $y = 54,8 - 22,3x$ ,  $R^2 = 0,78$ ) антиоксидантної активності ( $EC_{50}$ ), визначена за здатністю відновлювати DPPH радикал, від концентрації флавоноїдів у екстрактах «бородатих» коренів *Althaea officinalis* через 5 тижнів холодного, теплового стресу та в контрольних умовах

пояснені ефектом різного місця вбудовування перенесених генів.

**Висновки.** Отримані результати свідчать про те, що «бородаті» корені різних ліній *Althaea officinalis* (окремі трансформаційні події) відрізняються за чутливістю до дії короточасного температурного стресу незалежно від використаного вектору та наявності в ньому гена *ifn- $\alpha$ 2b* людини. Висока температура призводила до значного гальмування росту усіх ліній коренів, крім лінії № 3. З іншого боку, короточасне

культивування «бородатих» коренів за зниженої температури не викликало пригнічення їх росту. Одночасно з інгібуванням росту при підвищенні температури спостерігалася активізація синтезу флавоноїдів, вірогідно, як відповідь рослин на дію високої температури як стресового фактору. Показано сильну ( $R^2 = 0,78$ ) лінійну залежність антиоксидантної активності екстрактів із «бородатих» коренів від вмісту в них флавоноїдів. Таким чином, флавоноїди, очевидно, беруть участь у процесі відповіді та адаптації коренів до високотемпературного стресу.

**Дотримання етичних стандартів.** Ця стаття не містить жодних досліджень за участю тварин чи людей, проведених будь-яким із авторів.

**Конфлікт інтересів.** Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

**Фінансування.** Робота виконана за підтримки гранту НФД № 27/01.2020 «Біосинтез в рослинах рекомбінантних фармацевтичних білків, які протидіють поширенню деяких інфекційних захворювань вірусного та бактеріального походження»

#### TEMPERATURE STRESS RESPONSE OF *ALTHAEA OFFICINALIS* «HAIRY» ROOT LINES CARRYING HUMAN INTERFERON *α2b* GENE

N.A. Matvieieva, Y.I. Ratushnyak, V.P. Duplij, A.M. Shakhovskiy, M.V. Kuchuk

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of National Academy of Sciences of Ukraine, 148 Akademika Zabolotnoho St., 03143, Kyiv, Ukraine

E-mail: duplijv@icbge.org.ua

«Hairy» roots, obtained by genetic transformation of plants using soil phytopathogenic bacteria *Agrobacterium rhizogenes*, are valuable producers of important secondary metabolites with medicinal properties and a convenient model object for studying the response of plants to adverse environmental conditions. This paper compares the postponed response of «hairy» roots of *Althaea officinalis* L. to the short-term cold and high-temperature stresses. The results indicate that the «hairy» roots of different lines of *A. officinalis* (individual transformational events) differ in sensitivity to short-term temperature stress, regardless of the vector used for the transformation and the presence of human interferon *ifn-α2b* gene. The high temperature led to significant inhibition of root growth of all lines, except the one that had the highest content of flavonoids under

the control conditions. On the other hand, short-term cultivation of «hairy» roots at low temperature did not cause growth inhibition. Simultaneously with the inhibition of growth by high temperature conditions, an increase in the synthesis of flavonoids was observed. Probably, it was a response of the roots to the action of high temperature as a stress factor. The strong ( $R^2 = 0,78$ ) linear dependence between antioxidant activity of «hairy» root extracts and the total flavonoid content was determined. Thus, flavonoids synthesized in *A. officinalis* «hairy» roots may be involved in the process of response and adaptation of the roots to high temperature stress.

#### REFERENCES

- Agati G, Azzarello E, Pollastri S, Tattini M (2012) Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Sci* 196:67–76
- Boo HO, Chon SU, Lee SY (2006) Effects of temperature and plant growth regulators on anthocyanin synthesis and phenylalanine ammonia-lyase activity in chicory (*Cichorium intybus* L.). *J Hortic Sci Biotechnol* 81:478–482. <https://doi.org/10.1080/14620316.200.11512091>
- Choi S, Kwon YR, Hossain MA, et al (2009) A mutation in ELA1, an age-dependent negative regulator of PAP1/MYB75, causes UV- and cold stress-tolerance in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Sci* 176:678–686. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.02.010>
- Fini A, Brunetti C, Di Ferdinando M, et al (2011) Stress-induced flavonoid biosynthesis and the antioxidant machinery of plants. *Plant Signal Behav* 6:709–711. <https://doi.org/10.4161/psb.6.5.15069>
- Havryliuk O, Matvieieva N, Tashyrev O, Yastremskaya L (2017) Influence Of Cold Stress On Growth And Flavonoids Accumulation In *Artemisia Tilesii* «Hairy» Root Culture. In: *Agrobiodiversity for Improving Nutrition, Health and Life Quality*. pp 163–167
- Matvieieva N, Drobot K, Duplij V, et al (2019) Flavonoid content and antioxidant activity of *Artemisia vulgaris* L. «hairy» roots. *Prep Biochem Biotechnol* 49:82–87. <https://doi.org/10.1080/10826068.2018.1536994>
- Matvieieva NA (2012) Generation of *Tragopogon porrifolius* and *Althaea officinalis* «hairy» roots using *Agrobacterium rhizogenes*. *Bull Vavilov Soc Genet Breeders Ukr* 10:262–268
- Matvieieva NA, Kishchenko OM, Potrochov AO, et al (2011) Regeneration of transgenic plants from hairy roots of *Cichorium intybus* L. var. *Foliosum* Hegi. *Cytol Genet* 45:277–281. <https://doi.org/10.3103/S0095452711050082>
- Matvieieva NA, Morgun B V., Lakhneko OR, et al (2020) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation enhances the antioxidant potential of *Artemisia*

- tilesii Ledeb. *Plant Physiol Biochem* 152:177–183. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.04.020>
- Matvieieva NA, Shachovsky AM, Gerasymenko IM, et al (2009) Agrobacterium-mediated transformation of *Cichorium intybus* L. with interferon- $\alpha$ 2b gene. *Biopolym Cell* 25:120–125. <https://doi.org/10.7124/bc.0007D4>
- Murashige T, Skoog F (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant* 15:473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Pełal A, Pyrzynska K (2014) Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Anal Methods* 7:1776–1782. <https://doi.org/10.1007/s12161-014-9814-x>
- Ramakrishna A, Ravishankar GA (2011) Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signal. Behav.* 6:1720–1731
- Sanghera GS, Wani SH, Hussain W, Singh NB (2011) Engineering Cold Stress Tolerance in Crop Plants. *Curr Genomics* 12:30–43. <https://doi.org/10.2174/138920211794520178>
- Schulz E, Tohge T, Zuther E, et al (2016) Flavonoids are determinants of freezing tolerance and cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *Sci Rep* 6:34027. <https://doi.org/10.1038/srep34027>
- Schulz E, Tohge T, Zuther E, et al (2015) Natural variation in flavonol and anthocyanin metabolism during cold acclimation in *A rabidopsis thaliana* accessions. *Plant Cell Environ* 38:1658–1672. <https://doi.org/10.1111/pce.12518>
- Shamloo M, Babawale EA, Furtado A, et al (2017) Effects of genotype and temperature on accumulation of plant secondary metabolites in Canadian and Australian wheat grown under controlled environments. *Sci Rep* 7:9133. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09681-5>
- Srivastava S, Srivastava AK (2007) Hairy Root Culture for Mass-Production of High-Value Secondary Metabolites. *Crit Rev Biotechnol* 27:29–43. <https://doi.org/10.1080/07388550601173918>
- Wahid A (2007) Physiological implications of metabolite biosynthesis for net assimilation and heat-stress tolerance of sugarcane (*Saccharum officinarum*) sprouts. *J Plant Res* 120:219–228. <https://doi.org/10.1007/s10265-006-0040-5>
- Wang L, Tu Y-C, Lian T-W, et al (2006) Distinctive Antioxidant and Antiinflammatory Effects of Flavonols. *J Agric Food Chem* 54:9798–9804. <https://doi.org/10.1021/jf0620719>
- Wang SY, Zheng W (2001) Effect of Plant Growth Temperature on Antioxidant Capacity in Strawberry. *J Agric Food Chem* 49:4977–4982. <https://doi.org/10.1021/jf0106244>
- Wu G, Johnson SK, Bornman JF, et al (2016) Growth temperature and genotype both play important roles in sorghum grain phenolic composition. *Sci Rep* 6:21835. <https://doi.org/10.1038/srep21835>

Надійшла в редакцію 12.11.20  
Після доопрацювання 23.12.20  
Прийнята до друку 18.05.21