

## ВПЛИВ ГЕНЕТИЧНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ НА АНТИОКСИДАНТНУ АКТИВНІСТЬ «БОРОДАТИХ» КОРЕНІВ *ALTHAEA OFFICINALIS L., ARTEMISIA VULGARIS L. TA ARTEMISIA TILESII LEDEB.*

Т.А. БОГДАНОВИЧ <sup>1\*</sup>, А.М. ШАХОВСЬКИЙ <sup>1</sup>, В.П. ДУПЛІЙ <sup>1</sup>, Я.І. РАТУШНЯК <sup>1</sup>,  
М.В. КУЧУК <sup>1</sup>, Н.Л. ПОЄДИНОК <sup>2,3</sup>, Н.А. МАТВЄЄВА <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, вул. Академіка Заболотного, 148, Київ, 03143, Україна

<sup>2</sup> Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»,  
пр. Перемоги, 37, Київ, 03056, Україна

<sup>3</sup> ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», вул. Осиповського, 2Ф, Київ, 04123, Україна

E-mail: bogdanovych\_tais@ukr.net, an48sha@gmail.com, dupliyv@icbge.org.ua, yakivr@yahoo.com,  
nkuchuk@icbge.org.ua, poyedinok@ukr.net, joyna56@gmail.com

Генетична трансформація за допомогою *Agrobacterium rhizogenes* є традиційним способом індукції культур «бородатих» коренів різних видів рослин, що дозволяє залучати бактеріальні *rol* гени до геному отриманих коренів. Включення *rol* генів, відомих як стимулятори вторинного метаболізму рослин, а також контакт із фітопатогенними бактеріями можуть впливати на низку параметрів росту «бородатих» коренів, зокрема, на збільшення маси, накопичення вторинних метаболітів, активність ферментів тощо. Особливий інтерес має вивчення відкладених змін, індукованих *Agrobacterium*-опосередкованою трансформацією та перенесенням чужорідних генів, після довготривалого культивування трансгенного рослинного матеріалу. В роботі проведено порівняння активності ферментів системи антиоксидантного захисту рослин (каталази та супероксиддисмутази), а також загального вмісту флавоноїдів, антиоксидантної та відновлювальної активності екстрактів з культур «бородатих» коренів рослин *Althaea officinalis*, *Artemisia tilesii*, *Artemisia vulgaris*, отриманих раніше з використанням *A. rhizogenes* – опосередкованої трансформації (штам А4 з геном інтерферону- $\alpha 2b$  людини). За допомогою ПЛР підтверджено наявність перенесених генів у досліджуваних «бородатих» коренях після тривалого культивування. Виявлено значну варіабельність активності каталази та СОД у різних лініях «бородатих» коренів, зокрема, виявлено лінії, що характеризуються підвищеною активністю обох ферментів (у 4,4 рази підвищена активність каталази та вдвічі більша активність СОД порівняно з активністю екстрактів з коренів контрольних рослин). Показана можливість значного підвищення загального вмісту флавоноїдів (у 4,6 рази) та збільшення рівнів анти-

оксидантної і відновлювальної активностей у ряді зразків трансгенних коренів. Максимальний вміст флавоноїдів у «бородатих» коренях *A. officinalis*, *A. vulgaris* та *A. tilesii* становив відповідно  $4,60 \pm 0,19$ ,  $4,55 \pm 0,36$  та  $9,21 \pm 1,28$  мг/г вологої маси. Таким чином, встановлено, що генетична трансформація спричиняє зміни у синтезі метаболітів з антиоксидантними властивостями та активності ферментів системи антиоксидантного захисту, причому такі зміни спостерігалися через 5–8 років після індукції «бородатих» коренів. Ці результати свідчать про пролонгований вплив генетичної трансформації на функціонування клітин досліджуваних видів рослин, зокрема, алтеї лікарської та двох видів полину. Виявлений ефект збільшення вмісту флавоноїдів та рівня антиоксидантної активності у більшості зразків, культивованих протягом тривалого часу, може бути використаний для отримання «бородатих» коренів – продуцентів сполук з антиоксидантними властивостями.

**Ключові слова:** «бородати» корені, антиоксидантна активність, флавоноїди, каталаза, супероксиддисмутаза, *Althaea officinalis*, *Artemisia tilesii*, *Artemisia vulgaris*.

**Вступ.** Фактори навколишнього середовища, як біотичні, так і абіотичні, впливають на ріст та розвиток рослин. Коли будь-який з них перевищує рівень толерантності, це призводить до стресу, що, в свою чергу, впливає на розвиток рослин, а також протікання біохімічних реакцій. Одним з наслідків стресу є іонний дисбаланс та утворення активних форм кисню (АФК). АФК, такі як синглетний кисень ( $^1O_2$ ), супероксидні іони ( $O_2^-$ ) та пероксиди, з яких найбільш поширений перекис водню ( $H_2O_2$ ) – токсичні молекули, які здатні викликати пошкодження майже всіх клітинних макромо-

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

лекул. Рослини мають механізми захисту від оксидативного стресу, які полягають у активізації ферментних систем, зокрема, каталази, супероксиддисмутази, глутатіонпероксидази, а також індукування синтезу вторинних метаболітів з антиоксидантними властивостями, у тому числі флавоноїдів.

Генетична трансформація з використанням ґрунтових фітопатогенних бактерій може розглядатися як абіотичний стресовий фактор, який впливає на систему антиоксидантного захисту рослин. Разом з тим, зміни у синтезі антиоксидантів у клітинах трансформованих рослин можуть бути пролонгованими, зберігаючись при тривалому культивуванні «бородатих» коренів. Такі збережені зміни, вірогідно, обумовлені не стільки самим фактом контакту рослин з патогенними мікроорганізмами у процесі трансформування, але й стабільним перенесенням чужорідних генів до геному рослин (Kim et al, 2019; Bulgakov et al, 2012). Збільшення вмісту сполук з антиоксидантними властивостями, зокрема, флавоноїдів, можливе як при трансформуванні специфічними генами, які безпосередньо зв'язані з процесом біосинтезу флавоноїдів (Zhang et al, 2009) або за умов використання еліситорів (Gharari et al, 2020), так і при трансформації дикими штамми агробактерій (Tavassoli et al, 2018; Sahayarayan et al, 2020) за рахунок перенесення бактеріальних *rol* генів та їх неспецифічного впливу на метаболізм клітин рослин.

Зазвичай збільшення вмісту флавоноїдів у трансгенних коренях корелює з підвищенням антиоксидантної та відновлювальної активності, що доведено при трансформуванні рослин різних видів (Gabr et al, 2019; Sahayarayan et al, 2020; El-Esawi et al, 2017; Reis et al, 2019). Таку кореляцію між загальним вмістом флавоноїдів, антиоксидантною та відновлювальною активністю нами, зокрема, було встановлено при дослідженні «бородатих» коренів полину *Artemisia vulgaris* (Matvieieva et al, 2019). Активність ферментів пероксидази та супероксиддисмутази у «бородатих» коренях виявилася вищою за контрольні параметри (Kohsari et al, 2020). Застосування еліситорів також приводило до активізації ферментів, зокрема, каталази, пероксидази, глутатіон пе-

роксидази, супероксиддисмутази (Khezerluo et al, 2018; Singh et al, 2014).

Виходячи з вищенаведеної інформації, «бородаті» корені лікарських рослин становлять практичний інтерес як джерело біологічно активних сполук, оскільки їх можна вирощувати у закритій системі біореакторів різного типу. Рівень накопичення цінних метаболітів, у тому числі антиоксидантів, таким чином не залежить від можливих змін умов навколишнього середовища, температурного фактору або забруднення ґрунтів токсичними сполуками, а відбір ліній-суперпродуцентів дозволяє значно збільшити вихід цільового продукту порівняно з рослинами, що вирощуються у польових умовах.

Разом з тим, важливим є дослідження наявності або відсутності відмінностей у синтезі антиоксидантів у клітинах трансформованих коренів через значний період часу після трансформування. Такі дані можуть свідчити про стабільність змін у функціонуванні трансформованих клітин, індукованих процесом трансформації та перенесенням чужорідних генів до геному трансгенних коренів.

У даній роботі досліджували особливості змін антиоксидантної активності, у тому числі, накопичення флавоноїдів, у «бородатих» коренів *Althaea officinalis*, *Artemisia vulgaris* та *Artemisia tilesii*, що мали перенесений ген інтерферону- $\alpha 2b$  людини, а також несли *rol* гени *Agrobacterium rhizogenes*.

**Матеріали та методи.** *Рослинний матеріал.* Використовувались лінії «бородатих» коренів *Althaea officinalis* (3 лінії, час підтримання *in vitro* 8 років), *Artemisia vulgaris* (2 лінії, 5 років *in vitro*) та *Artemisia tilesii* (3 лінії, 6 років *in vitro*), а також контрольні рослини з *in vitro* колекції лабораторії адаптаційної біотехнології Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України. «Бородаті» корені було отримано раніше шляхом трансформування *Agrobacterium rhizogenes* A4 з цільовим геном інтерферону- $\alpha 2b$  людини під контролем 35S промотора вірусу мозаїки цвітної капусти (pCB124) за модифікованою методикою (Matvieieva et al, 2015). Трансформовані корені та контрольні рослини культивували при температурі +24 °C впродовж 3–4 тижнів.

*Визначення загального вмісту флавоноїдів.* Загальний вміст флавоноїдів визначали за методикою (Pekal et al, 2014). Для приготування екстрактів корені відділяли від агару, промивали дистильованою водою, висушували за допомогою фільтрувального паперу. Корені (0,3 г) гомогенізували у 3 мл 70%-ного етанолу. Гомогенат центрифугували в мікроцентрифузі Eppendorf Centrifuge 5415 С при 15 000 g впродовж 10 хв. Реакційна суміш містила 0,25 мл супернатанту, 1 мл бідистильованої води, 0,075 мл 5%-ного розчину  $\text{NaNO}_2$ . Через 5 хв до суміші додавали 0,075 мл 10%-ного розчину  $\text{AlCl}_3$  і витримували ще 5 хв. Після цього вносили 0,5 мл 1М  $\text{NaOH}$  та 0,6 мл бідистильованої води. Абсорбцію визначали при  $\lambda = 510$  нм. Калібрувальний графік будували, використовуючи у реакційній суміші рутин ( $y = 0,867x$ ,  $R^2 = 0,994$ ). Вміст флавоноїдів визначали у мг/г вологої маси коренів у рутиновому еквіваленті за формулою:

$$C_1 = C \cdot V/m, \quad (1)$$

де  $C_1$  – концентрація флавоноїдів у 1,0 г вологої маси рослинного матеріалу, мг/г;  $C$  – концентрація флавоноїдів у спиртових екстрактах, мг/мл;  $V$  – об'єм спирту, що використовувався для приготування екстракту (3 мл);  $m$  – маса рослинного матеріалу, що використовувався для досліджень (0,3 г).

*Антиоксидантна активність.* Антиоксидантну активність (АОА) етанольних (70 % етанол) екстрактів «бородатих» коренів досліджували за допомогою модифікованого DPPH-тесту (Matvieieva et al, 2020) спектрофотометрично на спектрофлуориметрі Флюорат-02-Панорама.

Відсоток відновлення DPPH радикалу визначали за формулою:

$$\text{АОА} = [(\text{OD}_1 - \text{OD}_2) / \text{OD}_1] \cdot 100 \%, \quad (2)$$

де  $\text{OD}_1$  – оптична густина DPPH, од.;  $\text{OD}_2$  – оптична густина реакційної суміші після проведення реакції з DPPH, од.

Антиоксидантну активність виражали через ефективну концентрацію ( $\text{EC}_{50}$ ) у мг вологої маси «бородатих» коренів, необхідної для відновлення 50 % DPPH у зразку.

*Відновлювальна активність.* Здатність екстрактів до відновлювання іонів заліза  $\text{Fe}^{3+}$  до

$\text{Fe}^{2+}$  визначали за методикою (Zhao et al, 2008) з модифікаціями спектрофотометрично на спектрофлуориметрі Флюорат-02-Панорама. Реакційна суміш містила: 0,312 мл 0,2 М фосфатного буфера (рН 6,6); 0,312 мл 1%-ного гексаціаноферату(III) калію та спиртовий екстракт коренів, доведений деіонізованою водою до загального об'єму екстракту у 0,25 мл. Для порівняння реакцію проводили не тільки з екстрактами, а і з рутином (1мг/мл) та аскорбіною кислотою (1мг/мл). Реакцію проводили у кюветах, з послідовним зменшенням концентрації екстракту коренів, рутину та аскорбінової кислоти. Суміші у кюветах інкубували на водяній бані при 50 °С впродовж 30 хв. Після цього до реакційної суміші додавали 0,312 мл 10%-ної трихлороцтової кислоти, 1,25 мл води бідистильованої та 0,25 мл 0,1%-ного хлориду заліза(III). Розчин порівняння готували за такою ж методикою, але замість екстракту додавали 0,25 мл деіонізованої води. Оптичну густина вимірювали при довжині хвилі  $\lambda = 700$  нм. Аналогічно до визначення АОА, будували графіки зміни оптичної густини для кожного екстракту. За графіками були визначені рівняння для підрахунку ефективних концентрацій ( $\text{EC}_{0,5}$ ), що відповідають кількості вологої маси (ВМ) коренів (мг ВМ у реакційній суміші, необхідної для отримання  $\text{OD} = 0,5$ ).

*Активність каталази та супероксиддисмутазу.* Активність каталази визначали за модифікованою методикою Aebi (Aebi et al, 1984) спектрофотометрично на спектрофлуориметрі Флюорат-02-Панорама. Для приготування екстрактів корені відділяли від агару, промивали дистильованою водою, висушували за допомогою фільтрувального паперу. 0,5 г коренів гомогенізували з 5 мл 0,1 М фосфатного буферу. Гомогенат переносили в пробірки Eppendorf об'ємом 2 мл і центрифугували 20 хв в мікроцентрифузі Eppendorf Centrifuge 5415 С при 15000 g. Супернатант переносили у чисті пробірки, поміщені у льодяну баню для запобігання втрати активності ферменту. В кювету об'ємом 3 мл наливали 2,8 мл реакційного середовища (30 мкл 33 % пероксиду водню, 50 мл 0,1 М фосфатного буферу, рН 7,0) та 0,2 мл супернатанта. Суміш струшували та вимірювали оптичну густина на спектрофотоме-

трі при  $\lambda = 240$  нм. Вимір повторювали через 1 хв. В контрольну пробу замість супернатанта у реакційне середовище додавали 0,2 мл буфера. Для підрахунку активності каталази використовували формулу:

$$AK = \Delta OD \cdot V_c / (0,036 \cdot C_6 \cdot V_b), \quad (3)$$

де АК – активність каталази, мкМ  $H_2O_2$ /мкг білка · хв;  $V_c$  – об’єм реакційного середовища (2,8 мл);  $0,036 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$  – коефіцієнт екстинкції  $H_2O_2$ ;  $C_6$  – вміст білка в пробі, мкг;  $V_c$  – об’єм екстракту (0,2 мл). Вміст розчиненого білка в супернатанті визначали за методом Бредфорда.

Активність супероксиддисмутази визначали відповідно до (Beuer et al, 1987). Для приготування екстрактів корені відділяли від агару, промивали дистильованою водою, висушували за допомогою фільтрувального паперу. Корені (0,1 г) гомогенізували у 1 мл 50 мМ Tris-HCl буфера (рН 8,0). Отриманий гомогенат центрифугували 15 хв в мікроцентрифугі Eppendorf Centrifuge 5415 C при 13000 g. Супернатант переносили у чисті пробірки, поміщені у льодяну баню для запобігання втрати активності ферменту. Реакційна суміш містила 40 мкл супернатанта; 2160 мкл буфера 50 мМ Tris-HCl; 520 мкл 65 мМ метіоніну; 188 мкл 630 мкМ нітросинього тетразолію; 50 мкл 1 мМ рибофлавіну. Одну пробірку для кожного зразка залишали в темряві, три – опромінювали впродовж 5 хв при 26 °С люмінесцентною лампою білого світла. Абсорбцію визначали при  $\lambda = 550$  нм. Нульова проба містила усі перелічені компоненти за винятком рослинного екстракту. Розрахунок проводили за формулою в од. акт./мкг білка (за Бредфордом):

$$\text{СОД (од. акт./мкг білка)} = \frac{[(OD_1/OD_2 - 1) \cdot V_c]}{(C_6 \cdot V_c)}, \quad (4)$$

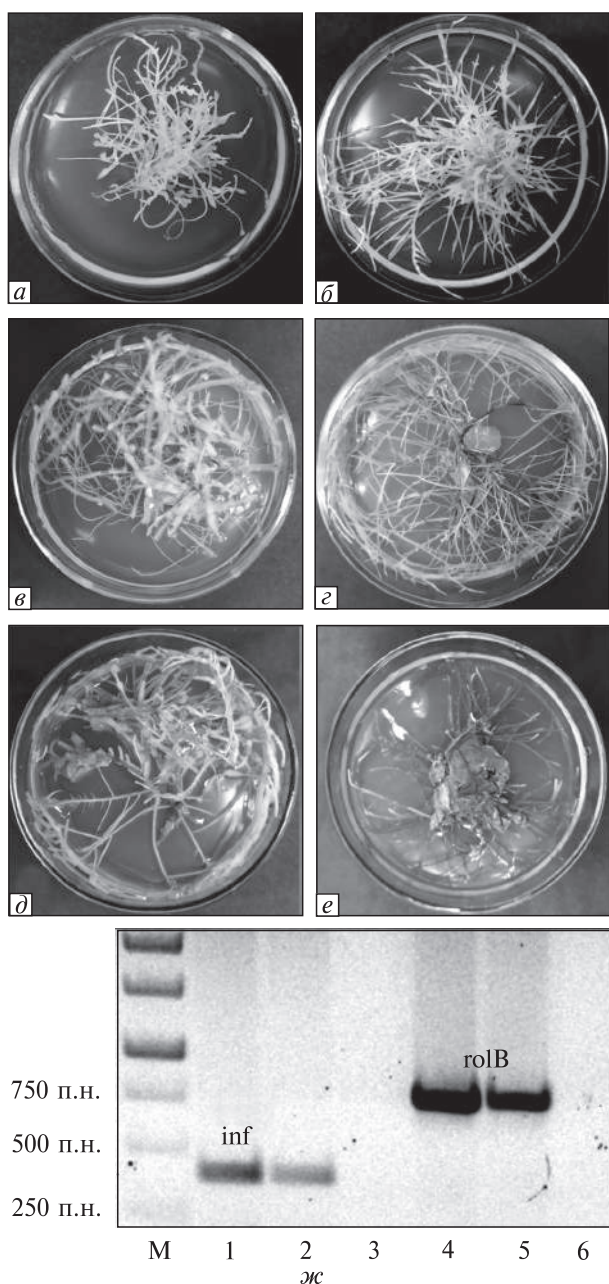
де  $OD_1$  – оптична густина нульової проби;  $OD_2$  – оптична густина експериментальної проби;  $V_c$  – об’єм реакційного середовища (3 мл);  $C_6$  – вміст білка в пробі, мкг;  $V_c$  – об’єм екстракту, мл (0,04 мл).

Аналіз трансформованих рослин та «бородатих» коренів за допомогою полімеразної ланцюгової реакції. Наявність перенесених генів у трансформованих рослинах та коренях визначали за допомогою полімеразної ланцюгової

реакції. Сумарну ДНК екстрагували зі свіжих коренів за допомогою ЦТАБ-методу. Реакцію проводили на ампліфікаторі Mastercycler personal 5332 (Eppendorf) з термостатованою кришкою в пробірках з ультратонкими стінками. Реакційна суміш складалася з однократного ПЛР-буфера з сульфатом амонію (Fermentas), 0,2 мкМ відповідних праймерів, 200 мкМ кожного з дезоксинуклеотидтрифосфатів, 0,5 од. Taq-полімерази (Fermentas), 2,0 мМ хлориду магнію, 10–50 нг ДНК-проби. Загальний об’єм реакційної суміші дорівнював 20 мкл. Продукти ПЛР аналізували за допомогою електрофорезу в 1,5%-ному агарозному гелі в Tris-боратній буферній системі. Негативним контролем була ДНК з нетрансформованих рослин, позитивним контролем – ДНК відповідного плазмідного вектору. Умови ампліфікації: первинна денатурація – 94 °С, 3 хв, 30 циклів (94 °С, 30 с – 60 °С, 30 с – 72 °С, 30 с), полімеризація – 72 °С, 3 хв. Продукти реакції розділяли у 1,5%-ному агарозному гелі. O’GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder #1163 було використано як маркер розмірів ампліфікованих фрагментів. Праймери 5’-atggatcccaaatgctattccttcacga-3’ та 5’-ttaggtctctcttcaggttactgcagc-3’ (780 п.н.), 5’-ttgatctctctggcacag-3’ та 5’-ttctgctctgacaacctc-3’ (396 п.н.) використовували для підтвердження наявності генів *rol B* та *ifn- $\alpha$ 2b* відповідно.

Статистичний аналіз. Статистичний аналіз даних та побудова діаграм проводилася у середовищі для статистичних обчислень R версії 4.0.4 (<https://www.R-project.org/>) з використанням інтегрованого середовища розробки RStudio версії 1.4.1717 (<https://www.rstudio.com/>). Отримані середні значення, представлені як середне  $\pm$  стандартне відхилення, порівнювали за допомогою дисперсійного аналізу та тесту Т’юкі на рівні значимості  $p < 0,05$ . Кореляційно-регресійний аналіз використовували для визначення залежностей концентрації рутину від оптичної густини, а також параметрів  $EC_{50}$  та  $EC_{0,5}$  від концентрації флавоноїдів в екстрактах. Для визначення самих ефективних концентрацій  $EC_{50}$  та  $EC_{0,5}$  цей метод застосовували до лінійних ділянок залежностей АОА/флавоноїди та OD/флавоноїди відповідно.

**Результати та обговорення.** У дослідженні використовували по три лінії «бородатих» коре-



**Рис. 1.** «Бородаті» корені *A. officinalis* (а, б), *A. tylesii* (в, г), *A. vulgaris* (д, е) та електрофореграма результатів ПЛР аналізу загальної ДНК зразків з праймерами, специфічними до генів *rolB* та *ifn- $\alpha$ 2b* (ж, М – маркер O'GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder #1163; 1, 2, 4, 5 – ДНК «бородатих» коренів; 3, 6 – ДНК контрольних рослин)

нів *A. officinalis*, *A. tylesii*, дві лінії *A. vulgaris* (рис. 1, а–е). Вони культивувалися впродовж 5–8 років *in vitro* за стандартизованих умов.

Наявність перенесених генів *rolB* та *ifn- $\alpha$ 2b*, що підтверджувала трансгенну природу коренів, перевіряли безпосередньо перед дослідженнями (рис. 1, ж). Як видно з рис. 1, корені відрізнялися за морфологічними ознаками, зокрема, ступенем галуження та товщиною і забарвленням. Разом з тим, усі аналізовані зразки мали як перенесений ген інтерферону- $\alpha$ 2b людини, так і ген *rolB* агробактерій.

Результати досліджень виявили значні відмінності активності ферментів каталази та супероксиддисмутази у лініях «бородатих» коренів порівняно з контролем. Так, активність каталази (рис. 2) у зразку № 2 *A. officinalis* перевищувала у 4,4 рази активність ферменту у коренях контрольних рослин. У той же час, активність каталази у всіх лініях «бородатих» коренів *A. vulgaris* та *A. tylesii* була нижчою за контроль у 2,3–5,6 та 1,6–1,9 рази відповідно.

Активність СОД значно варіювала у всіх зразках (рис. 3, а). Так, у зразку № 2 *A. officinalis* поряд із збільшеною активністю каталази спостерігалася вдвічі вища активність СОД. У той же час, активність ферменту у екстрактах двох інших ліній «бородатих» коренів алтеї була нижчою за таку у контрольних коренях. Порівняння активності СОД у трансгенних та контрольних коренях полину показало зменшення активності у «бородатих» коренях порівняно з контролем. Така значна варіабельність може бути пов'язана з особливостями генетичної трансформації з використанням агробактерій, за якої місце вбудовування перенесених генів недетерміновано. Таким чином, інкорпоровані у геном чужорідні гени, як гени агробактерій (зокрема, *rol* гени), так і ген *ifn- $\alpha$ 2b*, можуть непередбачувано впливати на активність власних генів трансформованих рослин, призводячи до змін у метаболізмі і, відповідно, до змін у ферментативній активності.

Генетична трансформація привела до підвищення загального вмісту флавоноїдів у більшості ліній «бородатих» коренів рослин трьох видів (рис. 4). Так, «бородаті» корені № 2 *A. officinalis* та № 1 *A. tylesii* мали у 4,6 та 3,3 рази більше флавоноїдів, ніж корені відповідних контрольних рослин. Обидві лінії «бородатих» коренів *A. vulgaris* мали у 2,2 та 2,8 рази вищий вміст флавоноїдів, ніж у коренях контрольних рослин.

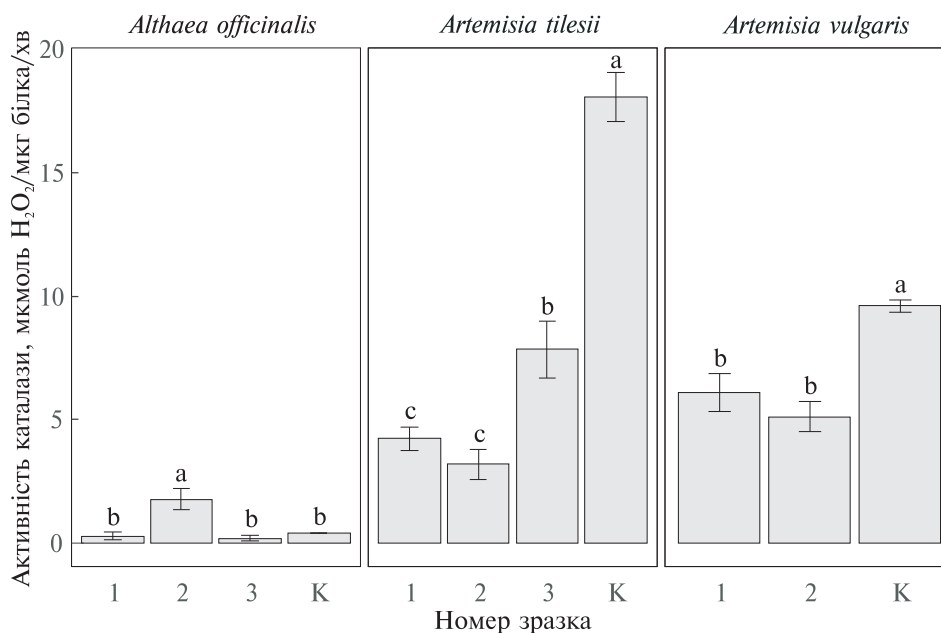


Рис. 2. Активність каталази у зразках «бородатих» коренів (1–3) та коренях контрольних рослин (К) *A. officinalis*, *A. vulgaris*, *A. tilesii*

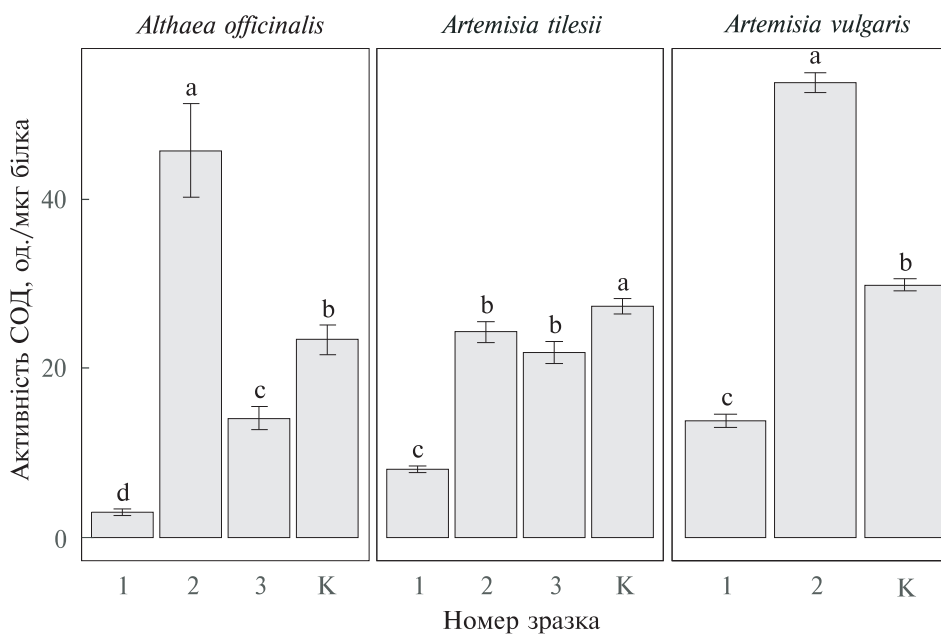


Рис. 3. Активність СОД у зразках «бородатих» коренів (1–3) та коренях контрольних рослин (К) *A. officinalis*, *A. vulgaris*, *A. tilesii*

Рівень антиоксидантної активності залежав, очевидно, від вмісту флавоноїдів, оскільки більшою АОА відзначалися саме корені, що містили більшу кількість флавоноїдів (рис. 5).

Так екстракт № 1 *A. tilesii*, що містив  $9,21 \pm 1,28$  мг/г ВМ РЕ флавоноїдів, мав і найвищу антиоксидантну активність, що виражалася у найнижчому показнику  $EC_{50} - 1,85$  мг ВМ. З

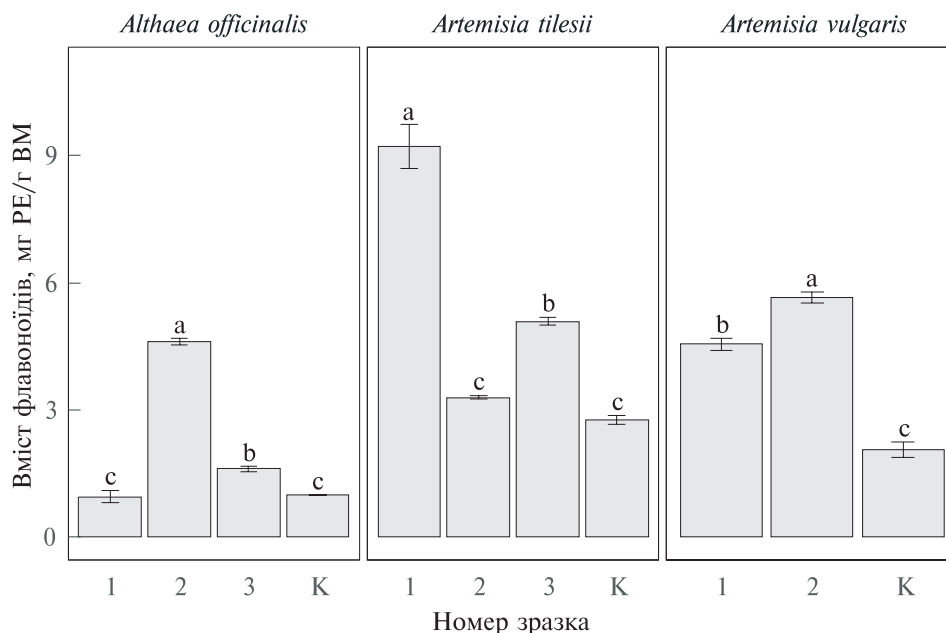


Рис. 4. Вміст флавоноїдів у зразках «бородатих» коренів *A. officinalis*, *A. vulgaris*, *A. tilesii* (1–3) та коренях кон-трольних рослин (К)

іншого боку, екстракти з найменшим вмістом флавоноїдів («бородаті» корені № 1 та контрольні рослини *A. officinalis*, 0,94 та 1,0 мг/г ВМ РЕ відповідно) мали найнижчу АОА ( $EC_{50}$  25,10 та 23,67 мг ВМ відповідно). Аналогічна залежність спостерігалася між загальним вмістом флавоноїдів та відновлювальною активністю відповідних екстрактів (рис. 6). Ті ж самі № 1 *A. tilesii* та № 1 *A. officinalis* так само мали найвищу ( $EC_{0,5}$  = 1,42 мг ВМ) і найнижчу відновлювальні активності ( $EC_{0,5}$  = 22,32 мг ВМ). Кореляційно-регресійний аналіз показав середню детермінованість антиоксидантної ( $R^2$  = 0,62) та відновлювальної ( $R^2$  = 0,41) активностей екстрактів вмістом в них флавоноїдів. Такі, досить низькі, коефіцієнти детермінації ми отримали вперше. Наприклад, у попередній нашій роботі (Matvieieva et al, 2020) вони були 0,745 та 0,65 для антиоксидантної та відновлювальної активностей відповідно. Можна припустити, що зменшення коефіцієнтів детермінації є результатом узагальненого аналізу зразків трьох видів двох різних родин.

У процесі *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації бактеріальні *rol* гени залучаються до геному отриманих коренів. Залучення

*rol* генів, а також контакт із фітопатогенними бактеріями можуть впливати на низку параметрів, що характеризують «бородаті» корені. Активність ферментів системи антиоксидантного захисту рослин, а також синтез антиоксидантів, зокрема, флавоноїдів, можуть змінюватися у трансформованих коренях як відповідь та адаптивна реакція на стрес, викликаний трансформацією.

Особливий інтерес становить вивчення відкладених змін, ініційованих *Agrobacterium*-опосередкованою трансформацією, після довготривалого культивування трансгенного рослинного матеріалу. Такі дані можуть свідчити про стабільність змін у функціонуванні трансформованих клітин, індукованих процесом трансформації та включенням чужорідних генів до геному трансгенних коренів.

Аналіз активності ферментів антиоксидантного захисту (каталази та СОД) у зразках «бородатих» коренів рослин трьох видів показав відмінності такої від активності екстрактів з контрольних рослин. Виявлено як підвищення (наприклад, у зразка № 2 *A. officinalis*) активностей каталази та СОД, так і їх зменшення у зразка № 1 «бородатих» коренів *A. tilesii*.

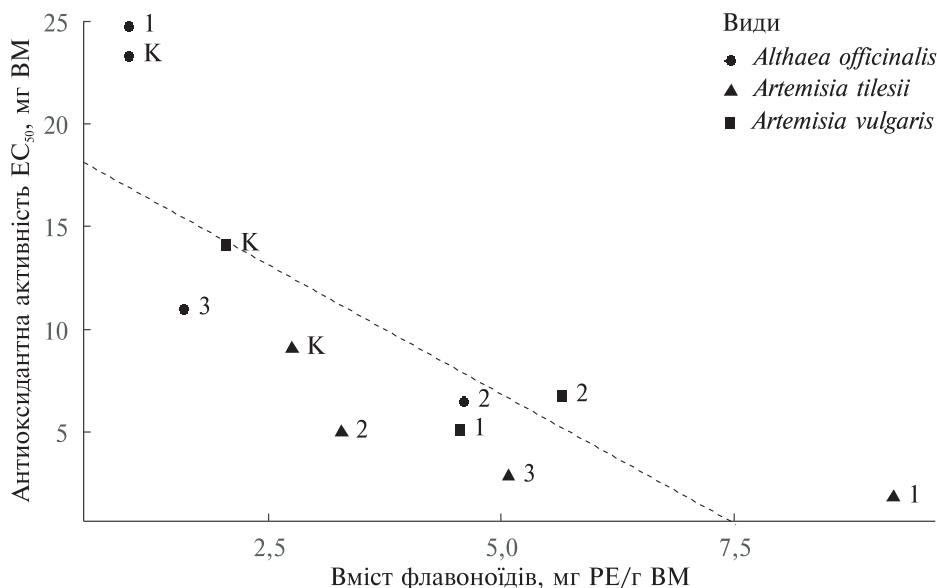


Рис. 5. Залежність ( $y = 19,42 - 2,52x$ ,  $R^2 = 0,62$ ) антиоксидантної активності екстрактів з «бородатих» коренів *A. officinalis*, *A. vulgaris* та *A. tilesii* (1–3) та коренів контрольних рослин (К) від вмісту в них флавоноїдів

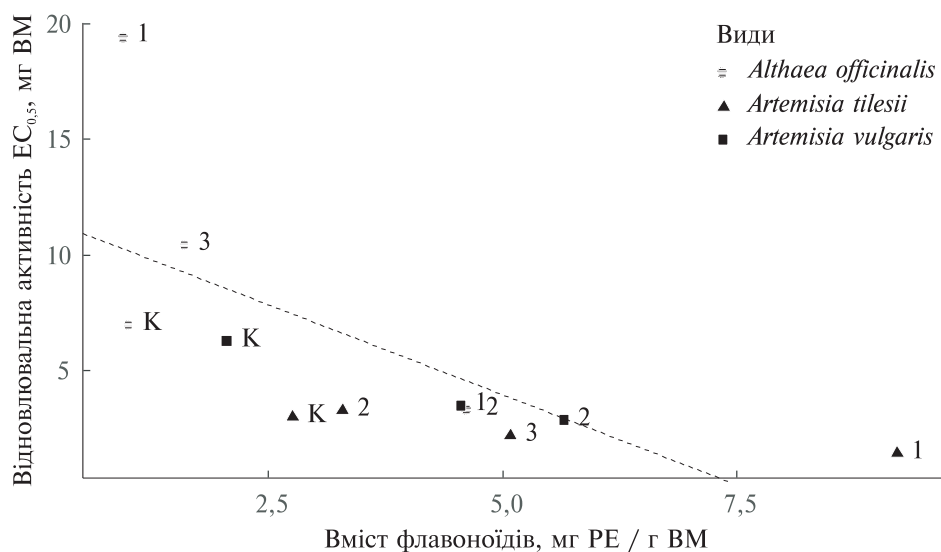


Рис. 6. Залежність ( $y = 11,74 - 1,56x$ ,  $R^2 = 0,41$ ) відновлювальної активності екстрактів з «бородатих» коренів *A. officinalis*, *A. vulgaris*, *A. tilesii* (1–3) та коренів контрольних рослин (К) від вмісту в них флавоноїдів

Встановлено також, що вміст флавоноїдів, сполук, що характеризуються антиоксидантною активністю (Pietta et al, 2000; Kumar et al, 2013; Wang et al, 2020; Giri et al, 2000), також значно варіював у різних лініях «бородатих» коренів рослин усіх досліджуваних видів, причому виявлено 4,6-разове збільшення вмісту флавоно-

їдів у порівнянні з контролем (зразок № 2 *A. officinalis*). Слід відмітити особливості декількох зразків (№ 2 *A. officinalis*, № 1 *A. tilesii* та №№ 1, 2 *A. vulgaris*), вміст флавоноїдів у яких був високим та корелював з високою антиоксидантною та відновлювальною активностями.



Можна припустити, що встановлені відмінності біологічної активності та вмісту вторинних метаболітів (флавоноїдів) у лініях «бородатих» коренів не залежать від виду рослин. Очевидно, такі відмінності можуть бути пов'язані з наявністю чужорідних генів, їхнім неконтрольованим за умов генетичної трансформації з використанням агробактерій місцем вбудовування та опосередкованим впливом перенесених генів на активність власних генів рослин. Цей феномен за наявності значної вибірки ліній «бородатих» коренів може бути використаний для отримання зразків, що відрізняються високим рівнем продукування сполук з антиоксидантними властивостями. Вплив генетичної трансформації на синтез флавоноїдів та кореляцію вмісту флавоноїдів з антиоксидантною активністю екстрактів виявлено і в інших видів рослин, зокрема, при дослідженні культур «бородатих» коренів *Fagopyrum esculentum* (Gabr et al, 2019), *F. tataricum* (Thwe et al, 2016), *Scutellaria baicalensis* (Tiwari et al, 2008), *Raphanus sativus* (Muthusamy et al, 2020) та ін.

Таким чином, встановлено, що генетична трансформація призводила до виникнення змін у активності ферментів системи антиоксидантного захисту та синтезу метаболітів з антиоксидантними властивостями у «бородатих» коренях, причому такі зміни спостерігалися через 5–8 років після індукції «бородатих» коренів. Ці результати свідчать про наявність пролонгованого впливу генетичної трансформації на функціонування клітин рослин різних видів, зокрема, алтеї лікарської, полину Тілесіуса та полину звичайного.

**Дотримання етичних стандартів.** Ця робота виконана з дотриманням етичних вимог кожним із авторів та не передбачає досліджень, у які залучено тварин або людей.

**Конфлікт інтересів.** Автори задекларували відсутність конфлікту інтересів і фінансових зобов'язань.

**Фінансування.** Робота виконана частково за рахунок гранту НФД України № 2020.01/0301 та гранту МОН України «Розроблення способу отримання активних фармацевтичних інгредієнтів з протизапальною та антиоксидантною активністю на основі біотехнології коренів полину» 2021–2022 pp.

ною активністю на основі біотехнології коренів полину» 2021–2022 pp.

EFFECT OF THE GENETIC TRANSFORMATION ON THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *ALTHAEA OFFICINALIS* L., *ARTEMISIA VULGARIS* L. AND *ARTEMISIA TILESII* LEDEB. «HAIRY» ROOTS

T. Bohdanovych, A. Shakhovsky, V. Duplij, Y. Ratushnyak, M. Kuchuk, N. Poyedinok, N. Matvieieva

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of National Academy of Sciences of Ukraine, 148 Akademika Zabolotnoho St., 03143, Kyiv, Ukraine, bogdanovych\_tais@ukr.net National Technical University of Ukraine «Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute», 37, Prosp. Peremohy, Kyiv, 03056, Ukraine Institute of Food Biotechnology and Genomics of National Academy of Sciences of Ukraine, 2a Osyповskoho St., 04123, Kyiv, Ukraine

E-mail: bogdanovych\_tais@ukr.net, an48sha@gmail.com, duplijv@icbge.org.ua, yakivr@yahoo.com, kuchuk@icbge.org.ua, poyedinok@ukr.net, joyna56@gmail.com

Genetic transformation using *Agrobacterium rhizogenes* is a well-known method for induction of «hairy» root cultures of different plant species. During the process of transformation bacterial *rol* genes are incorporated into the genome of the forming roots. Incorporation of *rol* genes, known as stimulators of plant secondary metabolism, as well as contact with phytopathogenic bacteria, can affect a number of growth parameters of «hairy» roots, in particular, mass increase, accumulation of secondary metabolites, the activity of ferments etc. The study of changes initiated by *Agrobacterium*-mediated transformation after long-term cultivation of transgenic plant material has a special interest. In this work antioxidant potential of *Althaea officinalis* L., *Artemisia tilesii* Ledeb., *Artemisia vulgaris* L. «hairy» roots obtained using *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation (A4 strain carrying human interferon- $\alpha$ 2b gene) was studied. Some parameters such as the activity of antioxidant enzymes (catalase and superoxide dismutase), total content of flavonoids, antioxidant and reducing activity of «hairy» root extracts were evaluated and compared with the same parameters in the roots of *in vitro* cultivated plants. The presence of foreign genes in studied «hairy» roots after long-term cultivation was confirmed by PCR analyses. Significant variability of catalase and SOD activity in different lines of «hairy» roots as well as the difference between these parameters

and the control one were revealed. In particular, we found root lines that were characterized by increased activity of both enzymes (4.4 times increased catalase activity and twice the activity of SOD compared to the activity of extracts from the roots of control plants). The possibility of a significant increase in the content of total flavonoids (up to 4.6 times compared to the control) and an increase in the levels of antioxidant and reducing activities in some samples of transgenic roots was demonstrated. The maximum content of flavonoids in the «hairy» roots of *A. officinalis*, *A. vulgaris* and *A. tilesii* was  $4.60 \pm 0.19$ ,  $4.55 \pm 0.36$  and  $9.21 \pm 1.28$  mg/g of fresh weight, respectively. Thus, it was found that genetic transformation led to changes in the synthesis of metabolites with antioxidant properties and enzyme activity of the antioxidant defense system, and such changes were observed 5–8 years after the induction of «hairy» roots. These results indicate a prolonged effect of genetic transformation on the functioning of plant cells of different species, in particular, marshmallow, and two wormwood species. The detected effect of increasing the content of flavonoids and level of antioxidant activity in most samples cultivated over a long period of time can be used to obtain «hairy» roots – producers of compounds with antioxidant properties.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Bulgakov VP, Gorpenchenko TY, Veremeichik GN et al. (2012) The *rolB* gene suppresses reactive oxygen species in transformed plant cells through the sustained activation of antioxidant defense. *Plant Physiol* 158:1371–1381. doi: 10.1104/pp.111.191494
- El-Esawi MA, Elkelish A, Elansary HO et al. (2017) Genetic Transformation and Hairy Root Induction Enhance the Antioxidant Potential of *Lactuca serriola* L. *Oxid Med Cell Longev* 2017:5604746. doi: 10.1155/2017/5604746
- Gabr AMM, Sytar O, Ghareeb H et al. (2019) Accumulation of amino acids and flavonoids in hairy root cultures of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*). *Physiol Mol Biol Plants* 25:787–797. doi: 10.1007/s12298-019-00669-1
- Gharari Z, Bagheri K, Danafar H et al. (2020) Enhanced flavonoid production in hairy root cultures of *Scutellaria bornmuelleri* by elicitor induced over expression of MYB7 and FNS2 genes. *Plant Physiol Biochem* 148:35–44. doi: 10.1016/j.plaphy.2020.01.002
- Giri A, Narasu ML. (2000) Transgenic hairy roots: recent trends and applications. *Biotechnol Adv* 18:1–22. doi: 10.1016/S0734-9750(99)00016-6
- Khezerluo M, Hosseini B, Amiri J. (2018) Sodium nitroprusside stimulated production of tropane alkaloids and antioxidant enzymes activity in hairy root culture of *Hyoscyamus reticulatus* L. *Acta Biol Hung* 69:437–448. doi: 10.1556/018.69.2018.4.6
- Kim S-E, Lee C-J, Ji C et al. (2019) Transgenic sweetpotato plants overexpressing tocopherol cyclase display enhanced  $\alpha$ -tocopherol content and abiotic stress tolerance. *Plant Physiol Biochem* 144:436–444. doi: 10.1016/j.plaphy.2019.09.046
- Kohsari S, Rezayian M, Niknam V et al. (2020) Antioxidative enzymes activities and accumulation of steroids in hairy roots of *Trigonella*. *Physiol Mol Biol Plants* 26:281–288. doi: 10.1007/s12298-019-00753-6
- Kumar S, Pandey AK. (2013) Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World J* 2013:162750, doi: 10.1155/2013/162750
- 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. doi: 10.1080/10826068.2018.1536994
- Matvieieva NA, Shakhovsky AM, Belokurova VB et al. (2015) *Artemisia tilesii* Ledeb hairy roots establishment using *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation. *Preparative Biochemi and Biotechnol* 46: 342–345 doi: 10.1080/10826068.2015.1031393
- Matvieieva N, Morgun B, Lakhneko O et al. (2020) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation enhances the antioxidant potential of *Artemisia tilesii* Ledeb. *Plant Physiol Biochem* 152:177–183. doi: 10.1016/j.plaphy.2020.04.020
- Muthusamy B, Shanmugam G. (2020) Analysis of flavonoid content, antioxidant, antimicrobial and antibiofilm activity of in vitro hairy root extract of radish (*Raphanus sativus* L.). *Plant Cell Tiss Organ Cult* 140:619–633 doi: 10.1007/s11240-019-01757-6
- Pekal A, Pyrzynska K. (2014) Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay *Food Anal Methods* 7:1776–1782. doi: 10.1007/s12161-014-9814-x
- Pietta PG. (2000) Flavonoids as Antioxidants. *J Nat Prod* 63:1035–1042. doi: 10.1021/np9904509
- Reis A, Boutet-Mercey S, Massot S et al. (2019) Isoflavone production in hairy root cultures and plantlets of *Trifolium pratense*. *Biotechnol Lett* (3):427–442. doi: 10.1007/s10529-018-02640-8
- Sahayarayan J, Udayakumar R, Arun M et al. (2020) Effect of different *Agrobacterium rhizogenes* strains for *in-vitro* hairy root induction, total phenolic, flavonoids contents, antibacterial and antioxidant activity of (*Cucumis anguria* L.). *Saudi J Biol Sci* 27:2972–2979. doi: 10.1016/j.sjbs.2020.08.050
- Singh H, Dixit S, Verma PC et al. (2014) Evaluation of total phenolic compounds and insecticidal and antioxidant activities of tomato hairy root extract. *J Agric Food Chem* 62:2588–2594. doi: 10.1021/jf405695y

- Tavassoli P, Safipour Afshar A. (2018) Influence of different *Agrobacterium rhizogenes* strains on hairy root induction and analysis of phenolic and flavonoid compounds in marshmallow (*Althaea officinalis* L.). 3 Biotech 8:351. doi: 10.1007/s13205-018-1375-z
- Thwe A, Arasu MV, Li X et al. (2016) Effect of different *Agrobacterium rhizogenes* strains on hairy root induction and phenylpropanoid biosynthesis in Tartary Buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn) Front Microbiol 7:318. doi: 10.3389/fmicb.2016.00318
- Tiwari RK, Trivedi M, Guang ZC et al. (2008) *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of *Scutellaria baicalensis* and production of flavonoids in hairy roots. Biol Plant 52:26. doi: 10.1007/s10535-008-0004-9
- Wang X, Ding G, Liu B, Wang Q. (2020) Flavonoids and antioxidant activity of rare and endangered fern: *Isoetes sinensis*. PLoS ONE 15(5):e0232185. doi: 10.1371/journal.pone.0232185
- Zhang HC, Liu JM, Lu HY et al. (2009) 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 28:1205–1213. doi: 10.1007/s00299-009-0721-3

Надійшла в редакцію 08.06.21  
Після доопрацювання 18.06.21  
Прийнята до друку 18.11.21