

<https://doi.org/10.15407/frg2019.04.308>

УДК 577.1+604.6

ОСОБЛИВОСТІ ДИНАМІКИ НАКОПИЧЕННЯ ФЛАВОНОЇДІВ У КУЛЬТУРІ «БОРОДАТИХ» КОРЕНІВ РОСЛИН *ARTEMISIA TILESII* LEDEB.

В.П. ДУПЛІЙ, Н.А. МАТВЄЄВА

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії Національної академії наук України

03143 Київ, вул. Академіка Заболотного, 148

e-mail: dupliyv@icbge.org.ua

Флавоноїди — сполуки з високим рівнем біологічної активності, які використовуються у фармакології. Вони синтезуються рослинами різних видів, їх синтез у природному середовищі залежить від умов вирощування. Альтернативою рослинам як джерелам флавоноїдів може бути культура «бородатих» коренів, отриманих *Agrobacterium rhizogenes*-опосередкованою трансформацією. Визначено вміст флавоноїдів у різних зразках «бородатих» коренів *Artemisia tilesii* Ledeb. та динаміку їх накопичення. Корені вирощували в стерильних умовах за температури 24 °С. Зразки відбирали через 20, 30 і 40 діб культивування. Вміст флавоноїдів визначали стандартним методом з використанням розчину хлориду алюмінію. Виявлено значні відмінності загального вмісту флавоноїдів у шести ліній «бородатих» коренів рослин *A. tilesii*, який на 40-ву добу становив $5,45 \pm 0,41 \dots 14,79 \pm 3,16$ мг/г сирової речовини. Визначено також відмінності в динаміці накопичення досліджуваних сполук у різних зразках, зокрема у збільшенні відносного приросту вмісту флавоноїдів у зразку № 45 на останньому етапі вирощування (між 30- і 40-ю добами) та значному підвищенні цього параметра у зразку № 44 у часовому інтервалі вирощування між 20- і 30-ю добами. Це може бути результатом того, що при трансформуванні рослин із використанням агробактерій вбудовування перенесених генів, зокрема *rol* генів, є недетермінованим, тобто такі гени можуть вбудовуватись у будь-яку частину геному. Отже, за допомогою відповідного добору можна отримати культури «бородатих» коренів із високим вмістом флавоноїдів і його швидким відносним приростом.

Ключові слова: *Artemisia tilesii* Ledeb., флавоноїди, генетична трансформація, «бородаті» корені.

Генетична інженерія рослин — досить давній та одночасно сучасний метод зміни рослинного геному й отримання рослин із новими корисними властивостями. Використання ґрунтових бактерій *Agrobacterium rhizogenes* дає змогу отримати у такий спосіб не тільки культури «бородатих» коренів, які характеризуються швидким гормонезалежним ростом, а й створити корені, здатні синтезувати біологічно активні сполуки. Кількість цих сполук, синтезованих у

клітинах трансформованих коренів, може значно перевищувати їх кількість у контрольних рослинах [1]. Такий ефект стимулювання синтезу є результатом трансформації, в процесі якої переносяться власні гени агробактерій (*rol* гени). Так, концентрація полісахаридів у трансгенних коренях *Echinacea purpurea* була вищою, ніж у вихідних рослин [2]. Концентрація вітаноліду (седативної, снодійної та антисептичної речовини) в трансгенних коренях *Withania somnifera* була вдвічі вищою, ніж у нетрансформованих [3]. За допомогою *A. rhizogenes*-опосередкованої трансформації отримано корені *Glycyrrhiza uralensis* із підвищеним синтезом флавоноїдів [4]. Ці гени відомі як активатори вторинного метаболізму, що виявлено, зокрема, в експериментах з отримання трансгенних рослин, до геному яких були перенесені *rol* гени [5–8].

Отже, трансформовані корені є потенційними продуцентами різних сполук, включаючи антиоксиданти, алкалоїди та інші вторинні метаболіти [9–12].

Флавоноїди — це група вторинних метаболітів фенольної природи, що виявлена в більшості судинних рослин. Вони мають антиоксидантну активність, запобігають розвитку ішемічної хвороби серця, чинять гепатопротекторну, протизапальну й протипухлинну дію, деякі флавоноїди демонструють високу противірусну та іншу активність [13–18].

Artemisia tilesii Ledeb. — маловідома рослина з дуже вузьким ареалом. Рослини здатні рости за суворих умов Аляски та півночі Росії. Публікацій стосовно біологічної активності цих рослин практично немає. Відомо лише, що корінне населення Аляски використовує їх для лікування різних хвороб [19]. Раніше ми розробили технологію отримання «бородатих» коренів *A. tilesii*, які протягом п'яти років підтримуються в колекції у стерильних умовах [20].

Метою цієї роботи було визначення особливостей динаміки накопичення біологічно активних сполук — флавоноїдів, які властиві рослинам роду *Artemisia*.

Методика

Для субкультивування отримані раніше методом трансформування *Agrobacterium rhizogenes* A4 трансгенні корені *Artemisia tilesii* Ledeb. вирощували на поживному середовищі 1/2 МС [21]. Термінальні частини коренів завдовжки 20–30 мм відокремлювали й переносили на поверхню агаризованого середовища у чашки Петрі. Корені культивували за температури 24 °С (рис. 1). Для визначення вмісту флавоноїдів зразки рослинного матеріалу відбирали через 20, 30 і 40 діб культивування.

Вміст флавоноїдів визначали стандартним методом [22]. Для цього 1 мл деіонізованої води змішували з 250 мкл екстракту і 75 мкл 5 %-го розчину NaNO_2 . Через 5 хв інкубації добавляли 75 мкл 10 %-го розчину AlCl_3 , потім 0,5 мл 1 М розчину NaOH і 0,6 мл деіонізованої води. Інтенсивність поглинання вимірювали на спектрофотолориметрі Флюорат-02 Панорама за довжини хвилі 510 нм. Загальний вміст флавоноїдів виражали в рутиновому еквіваленті (РЕ) у

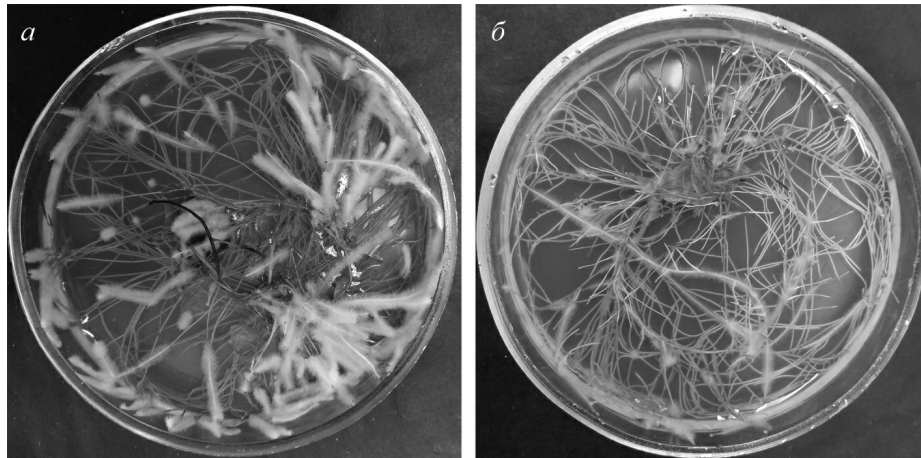


Рис. 1. «Бородаті» корені *Artemisia tilesii*, культивовані в стерильних умовах:
а — зразок № 45; б — зразок № 41

міліграмах на 1 г маси сирової речовини (МСР). Відносний приріст вмісту флавоноїдів (ВПФ) обчислювали за формулою

$$\text{ВПФ} = (\Phi_i - \Phi_{i-1}) / \Phi_{i-1},$$

де Φ_i — вміст флавоноїдів поточного вимірювання; Φ_{i-1} — вміст флавоноїдів попереднього вимірювання.

Виміряні й розраховані величини порівнювали з використанням дисперсійного аналізу і тесту Т'юкі. Довірчі інтервали обчислювали за рівня значущості $p < 0,05$.

Результати та обговорення

Вміст флавоноїдів на початку дослідження (на 20-ту добу культивування) в різних лініях «бородатих» коренів варіював у досить широкій межі (рис. 2). Так, корені лінії № 44 містили найменше флаво-

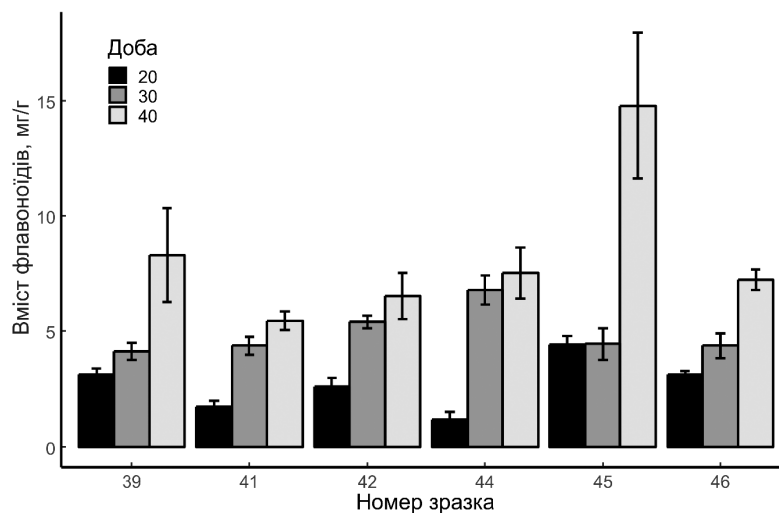


Рис. 2. Динаміка загального вмісту флавоноїдів у зразках «бородатих» коренів *A. tilesii*, культивованих в умовах *in vitro*

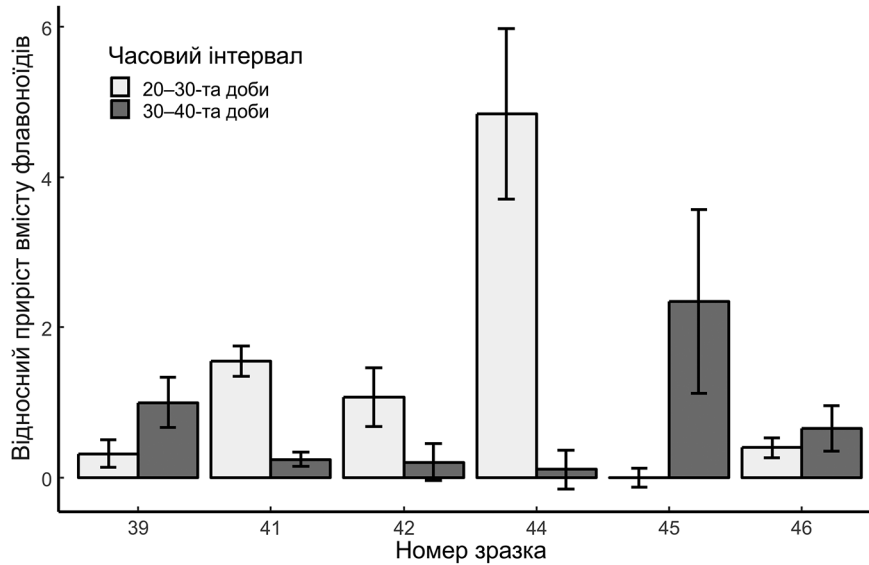


Рис. 3. Відносний приріст вмісту флавоноїдів у зразках «бородатих» коренів *A. tilesii* в часових інтервалах між 20- й 30-ю та 30- і 40-ю добами культивування

ноїдів ($1,17 \pm 0,34$ мг/г МСР), корені лінії № 45 — найбільше ($4,43 \pm 0,38$ мг/г МСР, що в 3,8 раза більше, ніж у лінії № 44). Вміст флавоноїдів зменшувався в такому ряду: № 45 > № 39 = № 46 > № 42 > № 41 > № 44, де знак «=» означає, що розбіжності між вмістом флавоноїдів для зазначених зліва і справа ліній знаходяться в межах статистичної похибки ($p < 0,05$).

Вміст флавоноїдів виявляв тенденцію до зростання протягом усього періоду спостереження у зразках усіх досліджених ліній коренів. Через 30 діб вирощування загальний вміст флавоноїдів у всіх досліджуваних зразках зріс до $4,14 \pm 0,37 \dots 6,78 \pm 0,63$ мг/г МСР. Однак це збільшення було різним для різних ліній. Так, для зразка № 44 вміст флавоноїдів збільшився у 5,8 раза, що в одиницях відносного приросту становило $4,84 \pm 1,14$ (рис. 3). Водночас для зразка № 45 ВПФ був найнижчим і дорівнював $0,004 \pm 0,130$. У часовому інтервалі 20—30-та доби ряд зменшення ВПФ мав зворотну послідовність номерів ліній (№ 44 > № 41 = № 42 > № 46 = № 39 = № 45) порівняно з рядом вмісту флавоноїдів на 20-ту добу, тобто чим меншим був вміст флавоноїдів, тим більше він зростав.

Разом з тим за наступні 10 діб (з 30- до 40-ї доби) найнижчий ВПФ виявлено саме у коренів зразка № 44, які швидше накопичували флавоноїди на попередньому етапі вирощування (20—30-та доби). Найвищий ВПФ спостерігали у лінії № 45 ($2,35 \pm 1,22$), в якій на попередньому етапі вирощування він був найнижчим. Згідно з експериментальними даними, ВПФ у часовий інтервал 30—40-ва доби можна схарактеризувати таким рядом: № 45 > № 39 = № 46 = № 41 = № 42 = № 44.

Найвищий загальний вміст флавоноїдів через 40 діб вирощування мали корені зразка № 45 ($14,79 \pm 3,16$ мг/г МСР), найнижчий — № 41 ($5,45 \pm 0,41$ мг/г МСР). Більшість ліній «бородатих» коренів на

цей день вирізнялися меншими розбіжностями щодо вмісту флавоноїдів, ніж на попередніх етапах. Разом з тим у коренях зразка № 45 вміст флавоноїдів був більшим, ніж у всіх решти зразків ($p < 0,05$), а в коренях зразка № 41 — значно меншим, ніж у всіх інших, крім № 42. Розбіжності в накопиченні флавоноїдів між іншими лініями знаходились у межах статистичної похибки ($p < 0,05$). Вміст флавоноїдів у порядку зменшення на 40-ву добу ілюструє такий ряд: № 45 > № 39 = № 44 = № 46 = № 42 = № 41.

Таким чином, виявлено значні відмінності в загальному вмісті флавоноїдів у шести ліній «бородатих» коренів рослин *A. tilesii*, який становив $1,17 \pm 0,34 \dots 14,79 \pm 3,16$ мг/г МСР з 20-ї по 40-ву доби культивування. Для біотехнології синтезу флавоноїдів найціннішими виявилися корені зразка № 45, які найбільше накопичували цих сполук як за довгострокового культивування (40 діб), так і за короткострокового (20 діб). Встановлено також відмінності в динаміці накопичення досліджуваних сполук різними зразками, що вивлялося, зокрема, у збільшенні ВПФ у зразку № 45 на останньому етапі вирощування (між 30- й 40-ю добами) та значним підвищенням цього параметра у зразку № 44 в часовому інтервалі вирощування між 20- й 30-ю добами. Отже, ми спостерігали істотні відмінності в динаміці накопичення флавоноїдів різними зразками «бородатих» коренів. Оскільки для їх отримання було використано генетично ідентичні рослини та один штам агробактерій, виявлені відмінності можуть бути результатом того, що при трансформуванні рослин із використанням агробактерій вбудовування перенесених генів, зокрема *rol* генів, є недетермінованим, тобто гени можуть вбудовуватися в будь-яку частину геному. Недетерміноване вбудовування є причиною так званого ефекту положення гена, здатного по-різному змінити активності інших генів. Разом з тим отримані результати підтвердили, що відповідним добором можна отримати культури «бородатих» коренів із високим вмістом флавоноїдів і його швидким відносним приростом.

REFERENCES

1. Korde, V.V., Dhas, S.S., Gurave, N.A., Plant, A.J. & Res, S. (2016). Hairy Root Culture: A Promising Approach in Biotransformation, 6, No. 4, pp. 6-11.
2. Wang, B., Zhang, G., Zhu, L., Chen, L. & Zhang, Y. (2006). Genetic transformation of *Echinacea purpurea* with *Agrobacterium rhizogenes* and bioactive ingredient analysis in transformed cultures. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 53, No. 1, pp. 101-104.
3. Murthy, H.N., Dijkstra, C., Anthony, P., White, D.A., Davey, M.R., Power, J.B., Hahn, E.J. & Paek, K.Y. (2008). Establishment of *Withania somnifera* Hairy Root Cultures for the Production of Withanolide A. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50, No. 8, pp. 975-981.
4. Zhang, H.-C., Liu, J.-M., Lu, H.-Y. & Gao, S.-L. (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 Reports*, 28, No. 8, pp. 1205-1213.
5. Filippini, F., Schiavo, F. L., Terzi, M., Costantino, P. & Trovato, M. (1994). The Plant Oncogene *rolB* Alters Binding of Auxin to Plant Cell Membranes. *Plant and Cell Physiology*, 35, No. 5, pp. 767-771.
6. Bulgakov, V.P. (2008). Functions of *rol* genes in plant secondary metabolism. *Biotechnology Advances*, 26, No. 4, pp. 318-324.

7. Palazon, J., Cusido, R.M., Roig, C. & Pinol, M.T. (1998). Expression of the rol C gene and nicotine production in transgenic roots and their regenerated plants. *Plant Cell Reports*, 17, No. 5, pp. 384-390.
8. Dilshad, E., Cusido, R.M., Estrada, K.R., Bonfill, M. & Mirza, B. (2015). Genetic Transformation of *Artemisia carvifolia* Buch with rol Genes Enhances Artemisinin Accumulation. *PLoS One*, 10, No. 10, pp. e0140266.
9. Nopo-Olazabal, C., Hubstenberger, J., Nopo-Olazabal, L. & Medina-Bolivar, F. (2013). Antioxidant Activity of Selected Stilbenoids and Their Bioproduction in Hairy Root Cultures of Muscadine Grape (*Vitis rotundifolia* Michx.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, No. 48, pp. 11744-11758.
10. Sevón, N. & Oksman-Caldentey, K.-M. (2002). *Agrobacterium rhizogenes* — Mediated Transformation: Root Cultures as a Source of Alkaloids. *Planta Medica*, 68, No. 10, pp. 859-868.
11. Pistelli, L., Giovannini, A., Ruffoni, B., Bertoli, A. & Pistelli, L. (2010). Hairy Root Cultures for Secondary Metabolites Production, pp. 167-184.
12. Georgiev, M.I., Pavlov, A.I. & Bley, T. (2007). Hairy root type plant in vitro systems as sources of bioactive substances. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74, No. 6, pp. 1175-1185.
13. Commenges, D., Scotet, V., Renaud, S., Jacqmin-Gadda, H., Barberger-Gateau, P. & Dartigues, J.F. (2000). Intake of flavonoids and risk of dementia. *European Journal of Epidemiology*, 16, No. 4, pp. 357-363.
14. Walle, T. (2004). Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 36, No. 7, pp. 829-837.
15. He, Q. (2004). Silymarin Protects Against Liver Damage in BALB/c Mice Exposed to Fumonisin B1 Despite Increasing Accumulation of Free Sphingoid Bases. *Toxicological Sciences*, 80, No. 2, pp. 335-342.
16. Kim, S.M., Kang, K., Jho, E.H., Jung, Y.-J., Nho, C.W., Um, B.-H. & Pan, C.-H. (2011). Hepatoprotective Effect of Flavonoid Glycosides from *Lespedeza cuneata* against Oxidative Stress Induced by tert-Butyl Hydroperoxide. *Phytotherapy Research*, 25, No. 7, pp. 1011-1017.
17. Cushnie, T.P.T. & Lamb, A.J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26, No. 5, pp. 343-356.
18. Tunon, M., Garcia-Mediavilla, M., Sanchez-Campos, S. & Gonzalez-Gallego, J. (2009). Potential of Flavonoids as Anti-inflammatory Agents: Modulation of Pro — Inflammatory Gene Expression and Signal Transduction Pathways. *Current Drug Metabolism*, 10, No. 3, pp. 256-271.
19. Griffin, D. (2001). Contributions to the Ethnobotany of the Cup'it Eskimo, Nunivak Island, Alaska. *Journal of Ethnobiology*, 21, No. 2, pp. 91-127.
20. Matvieieva, N.A., Shakhovsky, A.M., Belokurova, V.B. & Drobot, K.O. (2016). *Artemisia tilesii* Ledeb hairy roots establishment using *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 46, No. 4, pp. 342-345.
21. Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, No. 3, pp. 473-497.
22. Pekal, A. & Pyrzyńska, K. (2014). Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Analytical Methods*, 7, No. 9, pp. 1776-1782.

Received 25.04.2019

ОСОБЕННОСТИ ДИНАМИКИ НАКОПЛЕНИЯ ФЛАВОНОИДОВ В КУЛЬТУРЕ
«БОРОДАТЫХ» КОРНЕЙ РАСТЕНИЙ *ARTEMISIA TILESII* LEDEB.

В.П. Дуллий, Н.А. Матвеева

Институт клеточной биологии и генетической инженерии Национальной академии наук Украины, Киев

Флавоноиды — соединения с высоким уровнем биологической активности, которые используются в фармакологии. Они синтезируются растениями разных видов, их

синтез в природной среде зависит от условий выращивания. Альтернативой растениям как источнику флавоноидов может быть культура «бородатых» корней, полученных путем *Agrobacterium rhizogenes*-опосредованной трансформации. Определено содержание флавоноидов в различных образцах «бородатых» корней *Artemisia tilesii* Ledeb. и динамика их накопления. Корни выращивали в стерильных условиях при температуре 24 °С. Образцы отбирали через 20, 30 и 40 сут культивирования. Содержание флавоноидов определяли стандартным методом с использованием раствора хлорида алюминия. Выявлены значительные различия в общем содержании флавоноидов в шести линиях «бородатых» корней растений *A. tilesii*, которое на 40-е сутки составляло $5,45 \pm 0,41 \dots 14,79 \pm 3,16$ мг/г сырого вещества. Определены также различия в динамике накопления исследуемых соединений в различных образцах, которые заключались, в частности, в увеличении относительного содержания флавоноидов в образце № 45 на последнем этапе выращивания (между 30- и 40-ми сутками) и значительном повышении этого параметра в образце № 44 во временном интервале выращивания между 20- и 30-ми сутками. Это может быть результатом того, что при трансформировании растений с использованием агробактерий встраивание перенесенных генов, в частности *rol* генов, является недетерминированным, т. е. такие гены могут встраиваться в любую часть генома. Таким образом, с помощью соответствующего отбора можно получить культуры «бородатых» корней с высоким содержанием флавоноидов и его быстрым относительным приростом.

Ключевые слова: *Artemisia tilesii* Ledeb., флавоноиды, генетическая трансформация, «бородатые» корни.

FEATURES OF THE DYNAMICS OF FLAVONOID ACCUMULATION IN *ARTEMISIA TILESII* LEDEB. “HAIRY” ROOT CULTURE

V.P. Duplij, N.A. Matvieieva

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

148 Akademika Zabolotnoho St., 03143, Kyiv, Ukraine

e-mail: duplijv@icbge.org.ua

Flavonoids are compounds with high biological activity, which are used in pharmacology. They are synthesized in plants of different species. However, the synthesis of flavonoids depends on the conditions of cultivation. “Hairy” root culture obtained by *Agrobacterium rhizogenes*-mediated genetic transformation can be an alternative source of flavonoids. Determination of flavonoids content in various samples of “hairy” roots of *Artemisia tilesii* Ledeb. and dynamics of their accumulation was the aim of the work. The roots were grown under sterile conditions at 24 °C. For determining the flavonoid content samples were collected after 20, 30 and 40 days of the cultivation. Flavonoids were quantified by a standard method using of aluminum chloride solution. Significant differences were founded in the total content of flavonoids in six lines of “hairy” roots of *A. tilesii*, which varied from $5,45 \pm 0,41$ to $14,79 \pm 3,16$ mg/g of fresh weight after 40 days of cultivation. The differences in the dynamics of accumulation of the investigated compounds in the samples were also studied. In particular, the relative increase of flavonoids content in the sample No. 45 was the highest at the last stage of cultivation (between the 30th and 40th days). At the same time this coefficient in the sample No. 44 significantly increased between 20th and 30th day of growing. Such differences may be the result of nondetermined place of foreign genes (in particular *rol* genes) incorporation after *Agrobacterium*-mediated transformation. This results indicate the possibility to obtain *A. tilesii* “hairy” roots characterized by high level of flavonoids and a rapid increase in their content.

Key words: *Artemisia tilesii* Ledeb., flavonoids, genetic transformation, “hairy” roots.