

ВПЛИВ ТРАНСФОРМАЦІЇ НА НАКОПИЧЕННЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ СПОЛУК У «БОРОДАТИХ» КОРЕНЯХ *BIDENS PILOSA* ТА *ARTEMISIA TILESII*

Генетична трансформація у біоінженерії рослин є методом, який використовують для перенесення чужорідних генів. Застосування цього методу дозволяє отримувати трансгенні рослини або культуру трансформованих коренів (так званих «бородатих» коренів), що синтезують невластиві для них сполуки, у тому числі, тваринного або мікробного походження, відповідно до перенесених генів. Поряд із цим, визначено, що перенесення до геному рослин трансгенів може бути причиною фенотипових, фізіологічних, біохімічних змін у трансгенних рослинах [1]. Отже, генетичну трансформацію, вірогідно, слід визначати не тільки як спосіб перенесення генів, але і як спосіб та причину отримання рослин з незвичайними властивостями, які на пряму не залежать від перенесених генів. Зокрема, трансформування може призводити до фізіологічних та біохімічних змін у рослинних клітинах і, відповідно, до змін у синтезі/накопиченні природно синтезованих у рослинах Біологічно активних сполук [2] та її можна розглядати як стресовий фактор [1]. Культура «бородатих» коренів рослин, у тому числі лікарських, є не тільки джерелом біологічно активних сполук, але й використовується як об'єкт для дослідження впливу перенесених генів на зміни, індуковані процесом трансформування, який включає контакт з агробактеріями, перенесення трансгенів, їх транскрибування та синтез продуктів цих генів.

На нашу думку, особливий інтерес щодо дослідження впливу генетичної трансформації на нові властивості рослин становить використання лікарських рослин. До таких належить ціла низка рослин родини складноцвітих, у тому числі, *Bidens pilosa* L. та *Artemisia tilesii* Ledeb. Перша з них – рослина тропічного регіону, друга – холодостійка полярна рослина.

Рослини роду *Artemisia* – трав'янисті, поширені у Європі, Америці, Центральній Азії та на півночі Африки, є досить відомими у народній медицині. З використанням *A. rhizogenes*-опосередкованої трансформації отримано культури «бородатих» коренів *Artemisia dubia*, *A. indica*,

A. absinthium, *A. vulgaris* [3–5]. Однак існує цікавий вид, *A. tilesii* Ledeb (алеутський полин), ареалом якого є Сибір, Далекий Схід, Арктична Європа та Америка. Хоча ще у 1961 р. було виявлено наявність у рослинах алеутського полину сесквітерпенових лактонів з анти малярійними властивостями [6], ці рослини практично не вивчені. Разом з тим, вони використовуються у нетрадиційній медицині та мають протиревматичну, дезінфікуючу, дезодоруючу, протипухлинну дію [7–9].

Bidens pilosa L. (череда волосиста) розповсюджена у тропічному та субтропічному регіонах. У ряді країн, особливо в Африці та Азії ці рослини використовуються у народній медицині для лікування низки захворювань. Слід зазначити, що спектр лікувальних властивостей рослин цього виду дуже широкий. Так, рослини синтезують сполуки з протимікробною [10], протівірусною [11], протидіабетичною [12], протипухлинною [13] активністю та використовуються для лікування ряду захворювань. Дотепер не було отримано культуру трансгенних коренів рослин цього виду та не визначено особливості трансформованих рослин, хоча і є єдина публікація з інформацією щодо трансформування *B. pilosa* з використанням *Agrobacterium tumefaciens* [14].

Метою роботи було визначення впливу генетичної трансформації як стресового фактора на накопичення білка, фруктозозмісних цукрів та антиоксидантну активність у трансгенних коренях рослин *Bidens pilosa* та *Artemisia tilesii*.

Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження слугували трансгенні корені рослин *B. pilosa* та *A. tilesii*, отримані нами шляхом *Agrobacterium rhizogenes*-опосередкованої трансформації (використовували агробактерії штаму А4, вектор з генами *ifn-β2b* та *nptII*), які вирощували на поверхні агаризованого середовища 1/2 МС (середовище Мураціге та Скуга [15] зі зменшеним удвічі вмістом макросолей) при температурі 24 °С та 16-годинному освітленні, а також у якості контролю рос-

лин цих видів, культивованих *in vitro* за таких самих умов.

Вміст білка у екстрактах з дослідних коренів визначали за методом Бредфорда [16]. Антиоксидантну активність визначали DPPH методом [17]. Для приготування екстрактів рослинний матеріал зважували, гомогенізували у відповідному об'ємі дистильованої води, центрифугували при 10 тис g протягом 10 хв. Для визначення вмісту фруктозовмісних цукрів (поліфруктанів, ПФ) екстрагування проводили на водяній бані при температурі +80 °С протягом 20 хв. ПФ визначали за методом Селіванова [18] на спектрофотометрі Erppendorf (550 нм, калібрування за фруктозою).

Результати та обговорення

У листках та коренях *B. pilosa* вміст білка становив відповідно $8,8 \pm 1,05$ та $7,3 \pm 1,02$ мг/г маси, а у трансгенних коренях був меншим, ніж у контрольних – 4,4–4,9 мг/г маси. Вміст білка у коренях культивованих *in vitro* контрольних рослин *A. tiliisii* був меншим, ніж у листках та становив відповідно $4,5 \pm 0,33$ та $10,1 \pm 1,21$ мг/г маси. У трансгенних коренях *A. tiliisii* вміст білка коливався у досить широких межах. Так, у трьох з чотирьох досліджуваних ліній коренів він достовірно не відрізнявся від вмісту у коренях культивованих *in vitro* рослин. Однак у коренях лінії № 1 білок накопичувався у кількості $8,2 \pm 0,5$ мг/г маси, що достовірно не відрізняється від рівня накопичення білка у листках та у 1,8 разу перевищує вміст у коренях контрольних рослин (рис. а). Отже, генетична трансформація призвела до суттєвого збільшення вмісту білка у коренях однієї лінії.

Підвищення вмісту білка у трансгенних рослинах або коренях становить інтерес виходячи з того, що активізація синтетичних процесів, у тому числі, синтезу білка, може (хоча і не обов'язково, оскільки цей процес зумовлюється рядом механізмів), корелювати з підвищенням накопичення цільових білків, які синтезуються після перенесення трансгенів.

У коренях контрольних рослин *A. tiliisii*, так само як і у *B. pilosa*, вміст ПФ перевищував вміст цих сполук у листках (відповідно корені та листки $12,8 \pm 1,67$ та $8,9 \pm 1,25$ мг/г маси *A. tiliisii*; $10,1 \pm 1,1$ та $4,2 \pm 0,77$ мг/г маси *B. pilosa*), що є цілком закономірним, оскільки ці сполуки є запасними полісахаридами та зазвичай акумулюються у підземних частинах рослин. У ряді ліній трансгенних коренів обох видів рослин визначено змен-

шення вмісту ПФ у порівнянні з контролем, однак у однієї з досліджуваних ліній «бородатих» коренів *A. tiliisii* вміст ПФ був дещо більшим від вмісту сполук у контролі, а у двох ліній *B. pilosa* навіть був вищим за вміст у контролі (рис. б, лінії 6, 10, 11). Таким чином, за даним досліджуваним параметром спостерігали досить широкий діапазон кількості накопичуваних фруктанів, а для ряду ліній виявлено підвищення вмісту цих

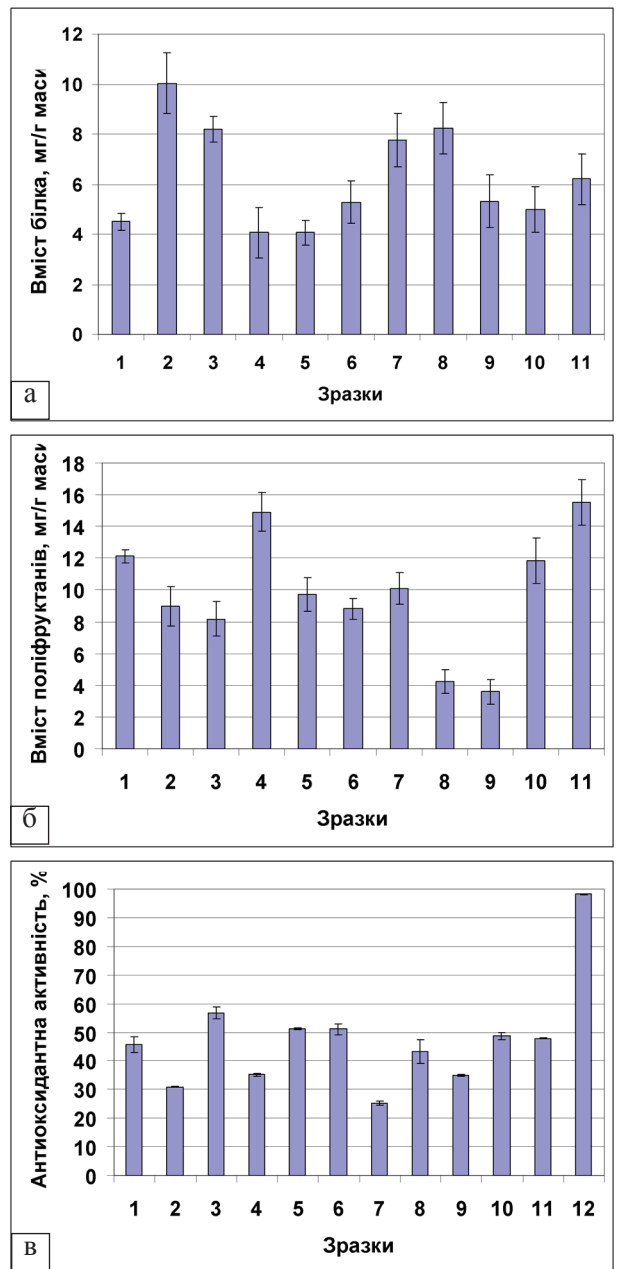


Рис. Вміст білка (а), фруктозовмісних цукрів (б) та антиоксидантна активність (в) екстрактів з трансгенних коренів *A. tiliisii* та *B. pilosa*: 1, 2 та 7, 8 – відповідно корені та листки *A. tiliisii* та *B. pilosa*; 3–6 – трансгенні корені *A. tiliisii*; 9–11 – трансгенні корені *B. pilosa*

сполук у коренях, отриманих після трансформування. Слід зазначити, що рівень накопичення ПФ у трансгенних коренях зворотно корелював зі швидкістю росту – чим швидше росли корені, тим менший у них вміст фруктанів.

Визначена за відновленням дифенілпікрилгідрозилрадикалу антиоксидантна активність екстрактів виявилася невисокою та значно нижчою за АОА розчину аскорбінової кислоти (1 мг/мл, 98,22 %). Антиоксидантна активність екстрактів з коренів контрольних рослин полину була вищою за АОА екстрактів з листків – відповідно 45,7 та 30,94 %, а у коренях причепи АОА виявилася нижчою, ніж у листках та становила відповідно 34,99 % та 43,25 %. Найбільша АОА була у екстрактах з трансгенних коренів полину та становила до 56,74 %. Як видно з рис. в, АОА екстрактів з трансгенних коренів *A. tilesii* перевищували активність екстрактів з коренів контрольних рослин. Аналогічний ефект спостерігали і для екстрактів з «бородатих» коренів *B. pilosa*.

Раніше нами було визначено відмінності у вмісті білка, фруктанів та АОА у трансгенних коренях рослин *Cichorium intybus* L. [19] та *Altaea officinalis* L. [20] та показано значну варіабельність цих показників залежно від ліній «бородатих» коренів. Разом з тим, для усіх досліджених видів рослин у трансгенних коренях можливе значне підвищення вмісту біологічно активних сполук.

Виявлені відмінності у вмісті загального розчинного білка, поліфруктанів та антиоксидантної активності у трансгенних коренях рослин *A. tilesii* та *B. pilosa* свідчать про те, що процес трансформування не тільки призводить до синтезу нових сполук відповідно до перенесених генів, але й впливає на функціонування рослинних клітин, змінюючи їх метаболізм. Такі зміни можуть бути позитивними, оскільки виявляються у збільшенні накопичення біологічно активних сполук.

Висновки

Досліджено особливості впливу генетичної трансформації на накопичення білка, поліфруктанів та рівень антиоксидантної активності екстрактів з трансгенних коренів рослин *B. pilosa* та *A. tilesii*. Визначено, що у ряді випадків трансформація призводила до зменшення вмісту білка та ПФ. Однак можливим є і підвищення вмісту білку, ПФ та АОА, що виявлено у декількох ліній «бородатих» коренів обох досліджуваних видів рослин. Підвищення вмісту біологічно активних сполук може бути досить значним, зокрема, вміст білка у одній з ліній трансгенних коренів *A. tilesii* перевищував вміст у коренях контрольних рослин майже удвічі, а рівень АОА екстрактів з «бородатих» коренів *B. pilosa* був вищим за АОА екстрактів з контрольних коренів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Enikeev A., Kopytina T., Semenova L., Natyaganova A.V., Gamanetz L.V., Volkova O.D. Agrobacterial transformation as complex biotical stressing factor // *J. Stress Physiol. Biochem.* – 2008. – 4, N 1. – P. 11–19.
2. Zhou M.L., Zhu X.M., Shao J.R., Tang Y.X., Wu Y.M. Production and metabolic engineering of bioactive substances in plant hairy root culture // *Applied Microbiol. and Biotechnol.* – 2011. – 90, N 4. – P. 1229–1239.
3. Mannan A., Shaheen N., Arshad W., Qureshi R.A., Zia M., Mirza B. Hairy roots induction and artemisinin analysis in *Artemisia dubia* and *Artemisia indica* // *Afr. J. Biotechnol.* – 2008. – 7, N 18. – P. 3288–3292.
4. Sujatha G., Zdravkovic-Korac S., Calic D., Flamini G., Ranjitha Kumari B.D. High-efficiency *Agrobacterium rhizogenes*-mediated genetic transformation in *Artemisia vulgaris*: Hairy root production and Essential oil analysis // *Industrial Crops and Prod.* – 2013. – 44. – P. 643–652.
5. Nin S., Bennici G., Roselli D., Mariotti D., Schiff S., Magherini R. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Artemisia absinthium* L. (wormwood) and production of secondary metabolites // *Plant Cell Rep.* – 1997. – 16, N 10. – P. 725–730.
6. Werner Herz, Kanichi Ueda The Sesquiterpene Lactones of *Artemisia tilesii* Ledeb // *J. Am. Chem. Soc.* – 1961. – 83, N 5. – P. 1139–1143.
7. Griffin D. Contributions to the ethnobotany of the Cyp'it Eskimo, Nunivac Island, Alaska // *J. of Ethnobiol.* – 2001. – 21, N 2. – P. 91–127.
8. Overfield T., Epstein W.W., Gaudioso L.A. Eskimo Uses of *Artemisia tilesii* (Compositae) // *Econom. Bot.* – 1980. – 34, N 2. – P. 97–99.
9. Kirakosyan A., Kaufman P.B. Recent Advances in Plant Biotechnology. – New York: Springer Science and Business Media, 2009. – 405 p.
10. Silva Junior J., Cerdeira C.D., Chavasco J.M., Cintra A.B., Silva C.B., Mendonza A.N., Ishikawa T., Boriollo M.F., Chavasco J.K. *In vitro* screening antibacterial activity of *Bidens pilosa* Linné and *Annona crassiflora* Mart. against oxacillin resistant *Staphylococcus aureus* (ORSA) from the aerial environment at the dental clinic // *Rev. Inst. Med. Trop. Sao. Paulo.* – 2014. – 56, N 4. – P. 333–340.

11. Nakama S., Tamaki K., Ishikawa C., Tadano M., Mori N. Efficacy of *Bidens pilosa* extract against Herpes Simplex Virus infection *in vitro* and *in vivo* [Электронный ресурс] // Evid. Based Complement. Alternat. Med. – 2012. – Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/413453>.
12. Yang W.C. Botanical, pharmacological, phytochemical, and toxicological aspects of the antidiabetic plant *Bidens pilosa* L. [Электронный ресурс] // Evid. Based Complement. Alternat. Med. – 2014. – Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/698617>.
13. Kwiecinski M.R., Benelli P., Felipe K.B., Correia J.F.G., Pich C.T., Ferreira S.R.S., Pedrosa R.C. SFE from *Bidens pilosa* Linnй to obtain extracts rich in cytotoxic polyacetylenes with antitumor activity // J. Supercritical Fluids. – 2011. – 56, N 3. – P. 243–248.
14. Chen-Kuen Wang, Shin-Yun Hsu, Po-Yen Chen, Kin-Ying To Transformation and characterization of transgenic *Bidens pilosa* L. // Plant Cell Tiss. and Organ Cult. – 2012. – 109, N 3. – P. 457–464.
15. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture // Phys. Plant. – 1962. – 15, N 3. – P. 473–497.
16. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – 72. – P. 248–254.
17. Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity // Lebensmittel Wissenschaft and Technologie. – 1995. – 28, N 1. – P. 25–30.
18. Оленников Д.Н., Танхаева Л.М. Исследование колориметрической реакции инулина с резорцином в зависимости от условий ее проведения // Хим. раст. сырья. – 2008. – № 1. – С. 87–93.
19. Кваско Е.Ю., Матвеева Н.А. Підвищення антиоксидантної активності та активності супероксиддисмутазу у трансгенних рослинах цикорію *Cichorium intybus* L. // Biopolymers and cell. – 2013. – 29, № 2. – P. 163–166.
20. Matvieieva N.A., Drobot K.O. Peculiarities of transgenic *Altaea officinalis* L. hairy root culture growth // International conference «Plant physiology and genetics – Achievements and challenges», 24–26 sept. 2014. – Sofia, Bulgaria, 2014. – P. 31–32.

MATVIEIEVA N.A., DROBOT K.O.

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering National Academy of Science of Ukraine, Ukraine, 03143, Kyiv, Akademika Zabolotnogo str., 148, e-mail: joyna@ukr.net

EFFECT OF TRANSFORMATION ON BIOACTIVE COMPOUNDS ACCUMULATION IN *BIDENS PILOSA* AND *ARTEMISIA TILESII* “HAIRY” ROOT CULTURE

Aims. Genetic transformation can lead to physiological and biochemical changes in plant cells and, therefore, changes in the synthesis/accumulation of natural compounds and the one can be viewed as a stress factor. Study of the effect of transformation on biologically active compounds accumulation is of special interest because transgenic plants of “hairy” root culture can be used as a source of valuable substances. Evaluation of the effect of genetic transformation on fructan (F), total soluble protein (TSP) accumulation and antioxidant activity (AOA) of *A. tilesii* and *B. pilosa* “hairy” root extracts was the aim of the work. **Methods.** We used *A. tilesii* and *B. pilosa* “hairy” root culture constructed by *Agrobacterium rhizogenes* A4-mediated transformation (vectors with human *ifn- β 2b* and *nptIII* genes). To determine fructans content in the extracts Selivaniv method was used. AOA of extracts was measured by DPPH method. Bradford method was used for TSP determine. **Results.** In some cases transformation have led to the reduction of TSP and F accumulation in *A. tilesii* and *B. pilosa* “hairy” roots. However, TSP and F content in some *A. tilesii* and *B. pilosa* “hairy” root lines was higher than in the control. For example, TSP accumulation in root line № 1 was 8.2 ± 0.5 mg/g and this parameter was 1.8 time higher than the one in the roots of control plants. F content in *B. pilosa* root line was higher than in the control – 15.5 ± 1.44 mg/g and 10.07 ± 1.0 mg/g respectively. *A. tilesii* and *B. pilosa* AOA in control roots was 45.7 % and 43.25 % respectively. AOA of extracts of transgenic roots varied from 30.94 to 51.09 % and in some cases it was higher than AOA of extracts from the roots of the control plants. **Conclusions.** Thus, genetic transformation resulted in changes in TSP, fructan content and AOA activity in *Bidens pilosa* and *Artemisia tilesii* “hairy” roots. In several root lines we confirmed increase of AOA, TSP and fructans content.

Keywords: *Bidens pilosa* L., *Artemisia tilesii* Ledeb., “hairy” root culture, AOA, fructans, TSP.