

УДК 575.222.7:581.1

**ВИЗНАЧЕННЯ ВПЛИВУ ВМІСТУ ВУГЛЕВОДІВ, ФІТОГОРМОНІВ НА
РІСТ «БОРОДАТИХ» КОРЕНІВ ТА НАКОПИЧЕННЯ ФЛАВОНОЇДІВ
ЛІКАРСЬКИХ РОСЛИН *BIDENS PILOSA* І *ARTEMISIA TILESII***

О.В. ВЛАСЮК, К.О. ШПЕТНА

Національний авіаційний університет, м. Київ

*Досліджено вплив вмісту вуглеводів (сахарози, глюкози) та фітогормонів (індолілмасляної та гіберелової кислот) на приріст маси «бородатих» коренів та накопичення флавоноїдів у лікарських рослин *Bidens pilosa* і *Artemisia tilesii*. Виявлено, що додавання до поживного середовища Мурасіге та Скуга (1/2 MS) вуглеводів та фітогормонів призводило до стимулювання росту «бородатих» коренів та збільшення вмісту флавоноїдів ліній *A. tilesii*, окрім середовищ з глюкозою. У лініях *B. pilosa* – спостерігали збільшення маси «бородатих» коренів та накопичення флавоноїдів тільки при культивуванні на середовищі з 40 г/л сахарози.*

Ключові слова: «бородаті» корені, агробактеріальна трансформація, *Agrobacterium rhizogenes*, *Artemisia tilesii*, *Bidens pilosa*, флавоноїди.

Вступ. Лікарська рослина *Bidens pilosa* (череда волосиста) є однорічною рослиною, що поширена по всьому світу в помірних і тропічних регіонах, синтезує сполуки з протимікробною, противірусною, протидіабетичною, аналгетичною, протизапальною, протипухлинною активністю та використовуються для лікування більше ніж 40 хвороб [1]. Рослина *Artemisia tilesii* (алеутський полин) – багаторічна холодостійка лікарська рослина активно використовується для лікування різноманітних хвороб корінними народами Аляски, володіє антималярійними властивостями. проте, незважаючи на великий фармакологічний потенціал полину досить мало вивчена. У роді

Artemisia найбільш широко вивченим видом є *A. annua*, з якого виділено близько 50 флавоноїдів; деякі флавоноїди були виявлені і в інших видах, таких як *A. absinthium* L [2], *A. asiatica* і *A. herba-Alb* [3]. Однак концентрація цих біологічно активних речовин (БАР) у диких видів рослин зазвичай дуже низька. Тому перспективним є використання технології *Agrobacterium rhizogenes*-опосередкованої трансформації, як своєрідної «зеленої фабрики» для масового виробництва БАР, що мають фармацевтичне значення [4]. Цінність «бородатих» коренів полягає в тому, що це безвірусний матеріал та вони здатні синтезувати природні для рослин біологічно активні сполуки у кількості, що значно перевищує вміст у рослин, які ростуть у природних умовах.

У більшості робіт [4–7], що присвячені вирощуванню «бородатих» коренів, використовують типове середовище Мурасіге та Скуга ($\frac{1}{2}$ MS) [8], яке містить необхідну кількість вітамінів та макросолей. Проте, додавання до поживного середовища регуляторів росту може суттєво пришвидшити ріст «бородатих» коренів, а також рівень накопичення цінних сполук. Інтерес до фітогормонів та вуглеводів обумовлений широким спектром їх дії на рослини, можливістю направлено регулювати окремі етапи росту і розвитку з метою мобілізації потенційних можливостей рослинного організму для підвищення врожайності і якості продукції. На сьогодні є велика кількість публікацій з дослідження впливу регуляторів росту на різноманітні біологічні об'єкти [9–11]. Але саме зміна вмісту регуляторів росту та її вплив на ріст культур бородатих коренів лікарських рослин *Bidens pilosa* та *Artemisia tilesii* вивчено недостатньо. Тому дослідження з метою пошуків шляхів інтенсифікації накопичення біомаси та синтезу біологічно активних сполук є перспективним та актуальним.

Метою роботи є вивчення впливу вмісту вуглеводів та фітогормонів на ріст «бородатих» коренів та накопичення флавоноїдів у лікарських рослинах *Bidens pilosa* і *Artemisia tilesii*.

Матеріали і методи дослідження. У роботі використовували «бородаті» корені лікарських рослин *Bidens pilosa* (лінії 6–3, 6–4) та *Artemisia tilesii* (лінії

1–1, 1–4) з колекції відділу зародкової плазми Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України. «Бородаті» корені лікарських рослин вирощували на модифікованому середовищі Мурасіге та Скуга [8] – зі зменшеним удвічі вмістом макросолей ($\frac{1}{2}$ MS), (мг/л): KNO_3 – 1900,0; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 440,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 370,0; KH_2PO_4 – 170,0; NH_4NO_3 – 1650,0; KI – 0,83; H_3BO_3 – 6,20; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 24,10; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 10,60; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,25; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,025; $\text{CoSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,025; Na_2EDTA – 37,3; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 27,8; мезоінозит – 100,0; тіамін – 0,50; піридоксин – 0,50; нікотинова кислота – 0,50; фолієва кислота – 0,5; гліцин – 2,0; біотин – 0,05; сахароза – 2000,0; дистильована – 1 літр; рН середовища 5,7–5,5. Солі стерилізували при 1,5 атм.

До середовища ($\frac{1}{2}$ MS) додавали сахарозу – 40 г/л, 60 г/л, глюкозу – 20 г/л, 40 г/л, гіберелову кислоту – 1 мл/л, 2 мл/л та індолілмасляну – 0,5 мг/л, 1 мг/л. У якості контролю використовували базове середовище Мурасіге та Скуга ($\frac{1}{2}$ MS) без додавання регуляторів росту рослин. Вуглеводи (глюкозу та сахарозу) вносили безпосередньо в процесі приготування середовища, а гіберелову та індолілмасляну кислоти додавали у різних концентраціях вже у колби з готовим стерильним середовищем Мурасіге та Скуга. Для отримання твердого середовища додавали агар у кількості – 7000,0 мг/г безпосередньо у термостійкі колби перед процесом стерилізації середовища та підігрівали постійно помішуючи до повного розчинення усіх компонентів.

Для потенціометричного визначення рН середовища використовували комбінований рН-метр «ЕВ-74» з скляним електродом ЕСЛ-63-07 та хлорсрібним електродом порівняння ЕВЛ-1МЗ.

Для отримання «бородатих» коренів на поверхню агаризованого поживного середовища у чашки Петрі переносили по 3 термінальні частини досліджуваних рослин довжиною 10–12 мм. Кожен варіант досліду проводили у трьох повторностях. Корені культивували у термостатованому приміщенні упродовж 2–4 тижнів за температури $+24^\circ\text{C}$ та інтенсивності освітлення 4000 lx. Ріст культур оцінювали візуально.

Приріст маси коренів визначали шляхом прямого зважування на вагах моделі «L310». Для цього усі рослини попередньо очищали від залишків агару та просушували. Приріст біомаси «бородатих» коренів розраховували за формулою (г/добу):

$$\Delta m = m_1 - m_0,$$

де Δm – приріст маси; m_1 – волога маса через 2-3 тижні; m_0 – початкова маса термінальних ділянок коренів.

Для визначення вмісту біологічно активних речовин готували етанольні екстракти «бородатих» коренів лікарських рослин. Для цього 250 мг трансгенних коренів, що росли в умовах *in vitro*, розтирали у фарфоровій ступці в 2,0 мл 70 %-го етанолу. Отриманий гомогенат кількісно переносили в пробірки («Eppendorf») об'ємом 2,0 мл, центрифугували в мікроцентрифузі «Eppendorf Centrifuge 5415 C» при 2 000 g упродовж 10 хв.

Вміст флавоноїдів визначали фотоелектроколориметрично, використовуючи якісну реакцію з $AlCl_3$. Реакція базується на здатності флавоноїдів при взаємодії з катіонами алюмінію утворювати комплексні сполуки, забарвлені в яскраво малиновий колір [12]. Для цього брали 0,25 мл екстракту, додавали 1 мл бідистильованої води та 0,075 мл 5 %-го розчину $NaNO_2$ перемішували та залишали на $\tau = 5$ хв. До суміші додавали 0,075 мл 10 %-го розчину $AlCl_3$ та знову перемішували і залишали на 5 хв. Далі додавали 0,5 мл 1М $NaOH$ та 0,6 мл бідистильованої води. За наявності флавоноїдів у досліджуваних екстрактах з'являлося малинове забарвлення (після додавання відбувалась зміна кольору з жовтого на рожевий, що свідчило про велику кількість флавоноїдів в розчині). Визначення проводили через 30 хв на спектрофлуориметрі «Флюорат-02-Панорама» при довжині хвилі $\lambda = 510$ нм. Калібрування робили в рутиновому еквіваленті. За калібрувальної кривої визначали міст флавоноїдів у 1,0 мл досліджуваного екстракту за формулою отриманою з графіка:

$$C = 0,9002 \times D - 0,0309,$$

де: C – концентрація флавоноїдів у 1,0 мл досліджуваного екстракту, мг/мл; D – оптична густина досліджуваного розчину, од.

Статистичну обробку результатів проводили з використанням пакетів прикладної програми Microsoft Excel ($p < 0,05$).

Результати дослідження та їх обговорення. Було досліджено динаміку росту «бородатих» коренів лікарських рослин *Bidens pilosa* та *Artemisia tilesii* на базовому середовищі Мурасіге та Скуга без додавання регуляторів росту та виявлено, що для ліній 6–3 та 6–4 лікарської рослини *Bidens pilosa* притаманний більш швидкий приріст біомаси та скорочення часу росту (до 2–3 тижнів) порівняно з лініями 1–1 і 1–3 рослини *Artemisia tilesii* (рис. 1).

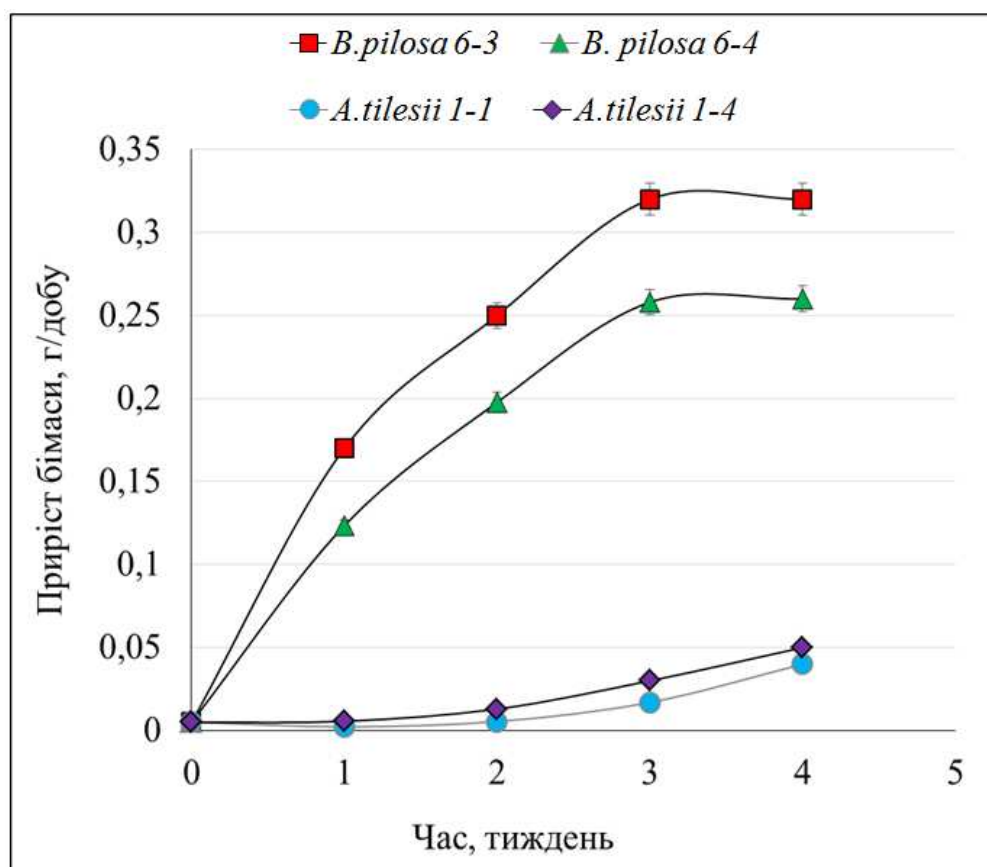


Рис. 1. Динаміка росту «бородатих» коренів лікарських рослин *Bidens pilosa* та *Artemisia tilesii* на базовому середовищі Мурасіге та Скуга без додавання регуляторів росту

Було виявлено, що вже за перший тиждень маса коренів ліній 6–3 та 6–4 лікарської рослини *Bidens pilosa* збільшилася в 3 рази та досягла на четвертий

тиждень максимальних значень 0,3–0,33 г/добу. У коренів лікарської рослини *Artemisia tilesii* спостерігався дуже повільний ріст на 4 тиждень культивування (рис. 2) по відношенню до «бородатих» коренів *Bidens pilosa*, які накопичили максимальну біомасу за 3 тижні культивування.



Рис. 2. «Бородаті» корені: *B. pilosa* на 3 тиждень росту (А) та *A. tilesii* на 4 тиждень (Б) в культурі *in vitro*

Дослідження впливу вуглеводів та фітогормонів на приріст маси «бородатих» коренів *B. pilosa* та *A. tilesii* виявило, що приріст маси «бородатих» коренів *B. pilosa* збільшується у 1,4–1,8 рази в порівнянні з контролем тільки при додаванні 40 г/л сахарози до середовища (рис. 3). Інші концентрації вуглеводів та фітогормонів не впливали на збільшення маси коренів *B. pilosa*.

Для лінії 1–1 *A. tilesii* найефективнішими стимуляторами росту виявились середовища з індолілмасляною кислотою (ІМК) у концентрації 0,5 мг/л та гібереловою кислотою (ГК) у концентрації 2 мг/л. Маса коренів лінії 1–1 *A. tilesii* збільшилася у 20 разів з ІМК та у 12 разів з ГК в порівнянні з контролем, відповідно. Також у 2–2,5 рази збільшився приріст біомаси коренів лінії 1–4 *A. tilesii* з сахарозою у концентрації 60 г/л та з гібереловою кислотою (ГК) у концентрації 2 мг/л, з індолілмасляною кислотою (ІМК) у концентрації 1,0 мг/л.

Були проведені дослідження з визначення вмісту флавоноїдів в етанольних екстрактах «бородатих» коренів *B. pilosa* та *A. tilesii*, які

культивували на середовищах з різними концентраціями вуглеводів і фітогормонів (рис. 4).

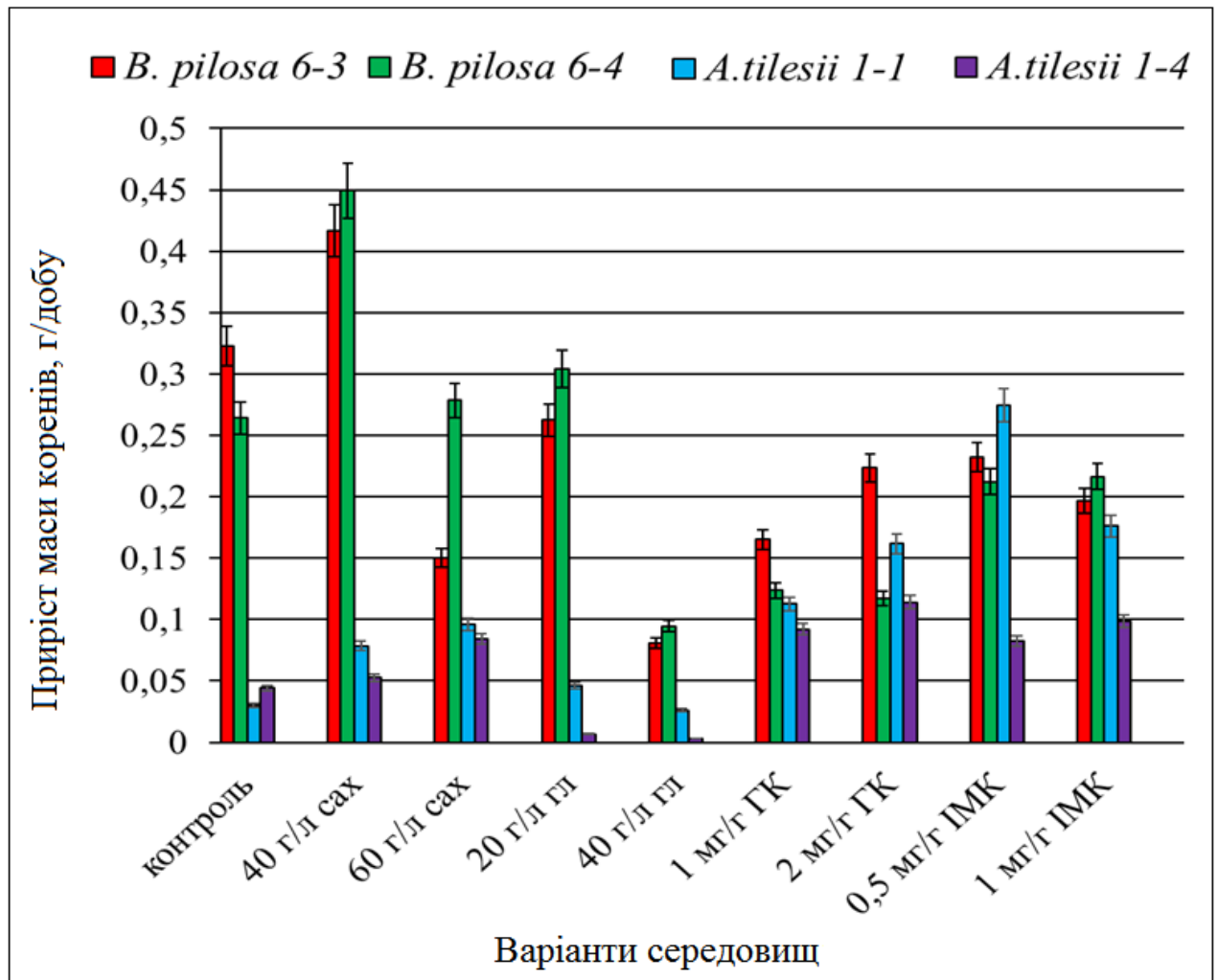


Рис. 3. Вплив сахарози, глюкози, гібереллової та індолілмасляної кислот у різних концентраціях на приріст маси «бородатих» коренів лікарських рослин *Bidens pilosa* та *Artemisia tilesii*

Для ліній «бородатих» коренів *B. pilosa* найбільший вміст флавоноїдів спостерігається тільки в етанольних екстрактах на середовищі з сахарозою в концентрації 40 г/л. Інші концентрації вуглеводів та фітогормонів не впливали на збільшення вмісту флавоноїдів у «бородатих» коренях *B. pilosa*, а інгібували їх вміст. Ці дані корелюють з приростом біомаси коренів *B. pilosa* на

середовищах з різними концентраціями вуглеводів та фітогормонів, що описано вище.

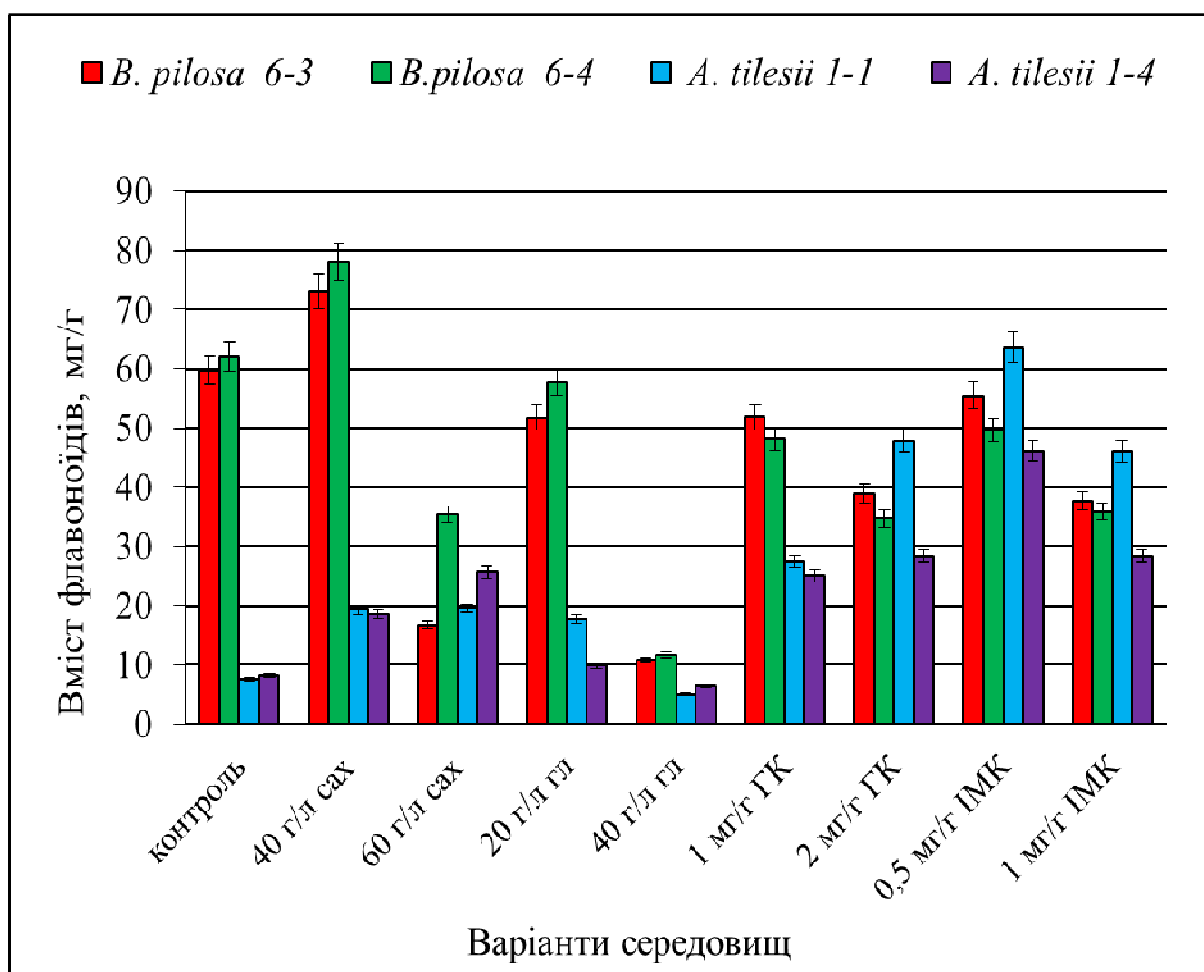


Рис. 4. Вплив цукрів та фітогормонів у різних концентраціях на вміст флавоноїдів у «бородатих» коренях лікарських рослин *B. pilosa* та *A. tilesii*

У ліній 1–1, 1–4 *A. tilesii* спостерігаємо збільшення вмісту флавоноїдів, особливо в етанольних екстрактах «бородатих» коренів, які культивували на середовищах з фітогормонами з гібереловою кислотою (ГК) у концентрації 2,0 мг/л, з індолілмасляною кислотою (ІМК) у концентрації 0,5 мг/л та з сахарозою у концентрації 60 г/л.

ВИСНОВКИ

Отже, було визначено, що для ліній лікарської рослини *Bidens pilosa* приріст біомаси коренів в 30 разів більший за скорочення часу росту (до 2–3 тижнів) порівняно з лініями *Artemisia tilesii*.

Визначено, що додавання до поживного середовища Мурасіге та Скуга (1/2 MS) вуглеводів та фітогормонів приводило до стимулювання росту «бородатих» коренів та збільшенню вмісту флавоноїдів у лініях *A. tilesii*. У лініях *B. pilosa* – спостерігали стимулювання росту та вмісту флавоноїдів тільки при культивуванні на середовищі з 40 г/л сахарози.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Analgesic and antiinflammatory activities of the ethyl acetate fraction of *Bidens pilosa* (Asteraceae). / [Fotso A.F., Longo F, Djomeni P.D. et. al] // *Inflammopharmacology*. – 2014. – Vol. 22(2). – P. 105-14. – doi: 10.1007/s10787-013-0196-2
2. Hazra B. Antioxidant and free radical scavenging activity of *Spondias pinnata*/ B. Hazra, S.Biswas, N. Mandal // *BMC Complementary and Alternative Medicine*. – 2008. – P. 8–63. – doi: 10.1186/1472-6882-8-63.
3. Bartolome A. P. Effect of *Rol* Genes on Polyphenols Biosynthesis in *Artemisia annua* and Their Effect on Antioxidant and Cytotoxic Potential of the Plant *Bidens pilosa* L. (Asteraceae): Botanical Properties, Traditional Uses, Phytochemistry, and Pharmacology [Електронний ресурс]/ A.P. Bartolome, I.M. Villaseñor, W.C. Yang // *Evid Based Complement Alternat Med*. – 2013. – doi: 10.1155/2013/340215.
4. Matveeva T.V. *Agrobacterium rhizogenes*-Mediated Transformation of Plants for Improvement of Yields of Secondary Metabolites/ T. V. Matveeva S. V. Sokornova// *Bioprocessing of Plant In Vitro Systems*. – NY: Springer International Publishing, 2016. – P. 161–202. – DOI 10.1007/978-3-319-32004-5_18-1.

5. Остапчук А. Вивчення «бородатих» коренів *Artemisia tilesii* Ledeb. / А. Остапчук, Н. Матвєєва// Agrobiodiversity for improving nutrition, health and life quality – Nitra: Slovak University of Agriculture, 2015. – P. 518–520.
6. Дробот К. О. Культура трансгенних коренів рослин роду *Artemisia* як джерело біологічно активних сполук: дис. канд. біолог. наук : 0 03.00.20/ Дробот Катерина Олександрівна; МОН України, Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України. – Київ, 2018. – С. 183.
7. Матвєєва Н.А. Вплив зниженої температури на синтез флавоноїдів у культурах «бородатих» коренів *Artemisia vulgaris* та *Artemisia annua* / Н.А.Матвєєва, О.А.Гаврилюк, Л.С.Ястремська// Фактори експериментальної еволюції організмів: зб.наук.пр. – К: Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М. Вавілова, 2018. – Т.23. – С. 302–307.
8. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // *Physiol Plant.* – 1962. – Vol. 15(3) – С. 473–497.
9. Культура генетически трансформированных корней (hairy roots) *Silene roemerii* Friv – источник получения фитоэкдистероидов / [Эрст А.А., Зибарева Л.Н., Железниченко Т.В., Ковзунова О.В.] // Вестник Томского государственного университета. Биология. – 2017. – № 37. – С. 17–30.
10. Biotransformations of putative phytoecdysteroid biosynthetic precursors in tissue cultures of *Polypodium vulgare* / [Reixach N., R. Lafont, F. Camps, J. Casas] // *European Journal of Biochemistry.* – 1999. – Vol. 266. – P. 608–615.
11. Flavonoids are determinants of freezing tolerance and cold acclimation in *Arabidopsis thaliana* / [Schulz E., Tohge T., Zuther E. et. al] – [Електронний ресурс] – // *Sci. Rep.* – 2016. – Vol. 6. – No. 34027. – doi: 10.1038/srep34027.
12. Influence of cold stress on growth and flavonoids accumulation in *Artemisia tilesii* «hairy» root culture / [Havryliuk O., Matvieieva N., Tashyrev O., Yastremskaya L.] // *Agrobiodiversity.* – 2017. – №1. – P. 163–167. – DOI:10.15414/agrobiodiversity.2017.2585-8246.163-167.

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СОДЕРЖАНИЯ УГЛЕВОДОВ,
ФИТОГОРМОНОВ НА РОСТ «БОРОДАТЫХ» КОРНЕЙ И
НАКОПЛЕНИЕ ФЛАВОНОИДОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ
BIDENS PILOSA И *ARTEMISIA TILESII***

О. В. ВЛАСЮК, К. А. ШПЕТНАЯ

Национальный авиационный университет, г. Киев

*Исследовано влияние содержания углеводов (сахарозы, глюкозы) и фитогормонов (индолилмасляная и гибберелловая кислот) на прирост массы «бородатых» корней и накопления флавоноидов в лекарственных растениях *Bidens pilosa* и *Artemisia tilesii*. Выявлено, что добавление в питательную среду Мурасиге и Скуга (½ MS) углеводов и фитогормонов приводит к стимулированию роста «бородатых» корней и увеличению содержания флавоноидов линий *A. tilesii*, кроме сред с глюкозой. В линиях *B. pilosa* - наблюдали увеличение массы «бородатых» корней и накопления флавоноидов только при культивировании на среде с 40 г / л сахарозы.*

Ключевые слова: «бородатые» корни, агробактериальная трансформация, *Agrobacterium rhizogenes*, *Artemisia tilesii*, *Bidens pilosa*, флавоноиды.

**DETERMINATION OF THE INFLUENCE OF THE CONTENT OF
CARBOHYDRATES, PHYTOHORMONES ON GROWTH OF «HAIRY»
ROOTS AND ACCUMULATION OF FLAVONOIDS OF MEDICINAL
PLANTS *BIDENS PILOSA* AND *ARTEMISIA TILESII***

O.V. VLASIUK, K.A. SHPETNA

National Aviation University, Kyiv

The effect of carbohydrates (sucrose, glucose) and phytohormones (indolyl butyric and gibberellic acids) on the weight gain of «hairy» roots and the accumulation of flavonoids in medicinal plants Bidens pilosa and Artemisia tilesii was studied. It was found that the addition of carbohydrates and phytohormones to Murashige and Skoog (½ MS) nutrient medium stimulated the growth of «hairy» roots and an increase in the content of flavors of A. tilesii, except for media with glucose. In the B. pilosa lines, stimulation of the growth and accumulation of flavonoids was observed only in the case of cultivation on a medium with 40 g/l of sucrose.

Key words: «hairy» roots, roots, agrobacterial transformation, Agrobacterium rhizogenes, Artemisia tilesii, Bidens pilosa, flavonoids.