

<https://doi.org/10.15407/frg2023.05.417>

УДК 577.1

ВПЛИВ ТЕМПЕРАТУРНОГО СТРЕСУ НА РІСТ І ВМІСТ БІОАКТИВНИХ СПОЛУК У «БОРОДАТИХ» КОРЕНЯХ *BIDENS PILOSA* L.

Н.А. МАТВЄЄВА¹, В.П. ДУПЛІЙ^{1,2}, Я.І. РАТУШНЯК¹

¹Інститут клітинної біології та генетичної інженерії Національної академії наук України

03143 Київ, вул. Академіка Заболотного, 148

²Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України

03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17

e-mail: dupliyv@icbge.org.ua

Генетична трансформація з використанням *Agrobacterium rhizogenes* може приводити до варіабельності вмісту синтезованих сполук у різних лініях «бородатих» коренів. Це зумовлює відмінності у виживаності різних зразків за дії низької та високої температур як стресового чинника. Аналіз варіабельності дає змогу оцінити вплив трансформації на адаптивний потенціал рослин і виявити можливість підвищення вмісту сполук з антиоксидантними властивостями. Метою роботи було порівняння особливостей відповіді різних ліній «бородатих» коренів *Bidens pilosa* L. на дію короткочасного температурного стресу. Для цього корені рослини культивували *in vitro* та піддавали короткочасній дії зниженої (7 °C) та підвищеної (36 °C) температур. Визначали приріст маси сирої речовини, вміст флавоноїдів та антиоксидантну активність. Виявлено особливості реагування «бородатих» коренів причепи різних ліній на дію короткочасного температурного стресу, які полягали у виживаності коренів різних ліній; відмінностях реакції метаболізму коренів різних ліній; відмінностях антиоксидантної активності екстрактів з коренів різних ліній. Зокрема, корені лише однієї лінії були здатні рости після короткочасного підвищення температури до 36 °C; питомий вміст флавоноїдів (на одиницю маси) значно підвищувався за дії як зниженої, так і підвищеної температури; низькотемпературний стрес не впливав на антиоксидантну активність, але підвищення температури приводило до її збільшення. Такі особливості вірогідно пов'язані з відмінностями між лініями, які є окремими трансформаційними подіями та можуть відрізнятися одна від одної як за місцем вбудовування перенесених після трансформації генів агробактерій, зокрема *rol* генів, так і за копійністю та активністю генів, що, відповідно, впливає на метаболізм рослинних клітин.

Ключові слова: *Bidens pilosa* L., *Agrobacterium rhizogenes*-опосередкована трансформація, «бородаті» корені, температурний стрес, флавоноїди, антиоксидантна активність.

Бактерії *Agrobacterium rhizogenes* успішно використовують для генетичної трансформації рослин різних видів. Результатом цієї транс-

Цитування: Матвєєва Н.А., Дуплій В.П., Ратушняк Я.І. Вплив температурного стресу на ріст і вміст біоактивних сполук у «бородатих» коренях *Bidens pilosa* L.. *Фізіологія рослин і генетика*. 2023. 55, № 5. С. 417–425. <https://doi.org/10.15407/frg2023.05.417>

формації є утворення «бородатих» коренів, які мають специфічний фенотип та можуть тривалий час рости на середовищі без регуляторів росту [1]. Особливий інтерес становить отримання «бородатих» коренів лікарських рослин, оскільки така трансформація приводить також до змін у вторинному метаболізмі. Відомо, що бактеріальні *rol* гени здатні впливати на синтез сполук, властивих рослинам, а також сприяти появі неспецифічних сполук, відсутніх у материнських рослинах; крім того, ці гени можуть впливати також на біологічну активність «бородатих» коренів [2–4]. У опосередкованій *A. rhizogenes* трансформації кожне включення Т-ДНК у рослинну клітину є незалежною трансформаційною подією. Таким чином, використовуючи цей метод генетичної інженерії, можна швидко отримати велику вибірку нових ліній-трансформантів з посиленими або зовсім новими характеристиками, відмінними від контрольних рослин. Аналізу впливу перенесених *rol* генів присвячено численні дослідження останніх років [5].

Разом із тим становить інтерес дослідження особливостей реагування «бородатих» коренів різних ліній (окремі трансформаційні події) на зміну температурного режиму вирощування. Вони можливі через зміни у метаболізмі, що є наслідком перенесення бактеріальних генів у процесі трансформації, оскільки ті чи інші синтезовані сполуки, зокрема флавоноїди, сприяють адаптації рослинних клітин до дії високої або низької температур [6–8]. Така дія флавоноїдів пов'язана передусім з тим, що ці сполуки поширені у рослинах і представляють велику групу фенольних вторинних метаболітів. Флавоноїди виконують різні функціональні ролі, зокрема, є частиною захисного механізму рослин в умовах дії стресових чинників різного походження та мають потужні антиоксидантні властивості [9–12].

Трансформація з використанням *A. rhizogenes* може приводити до варіабельності вмісту синтезованих сполук (у тому числі тих, що виявляють антиоксидантні властивості) у різних лініях «бородатих» коренів по-різному, тому можуть спостерігатися відмінності й у виживаності зразків за дії низької та високої температур як стресового чинника. Аналіз такої варіабельності дає змогу оцінити вплив трансформації на адаптивний потенціал рослин та виявити можливості підвищення вмісту сполук з антиоксидантними властивостями.

Метою роботи було порівняння особливостей відповіді різних ліній «бородатих» коренів причепа на дію короткочасного температурного стресу (зниженої та підвищеної температури).

Методика

У роботі використовували «бородаті» корені *Bidens pilosa* L. ліній 6-2, 6-3 та 6-4. Термінальні ділянки (10 мм) коренів висаджували на агаризоване поживне середовище 1/2 МС. Корені культивували за таких умов:

- 1) при температурі 24 °С упродовж 4-х тижнів;
- 2) при температурі 7 °С упродовж 1-го тижня, далі при 24 °С упродовж 3-х тижнів;

3) при температурі 36 °C упродовж 1-го тижня, далі при 24 °C упродовж 3-х тижнів.

Параметри, що визначали:

- приріст маси;
- питомий і загальний вміст флавоноїдів;
- антиоксидантна активність.

Приріст маси коренів визначали через 4 тижні після початку експерименту.

Для отримання екстрактів корені гомогенізували у 70 %-му етанолі, центрифугували (Eppendorf Centrifuge 5415 C) за 10 000 об/хв упродовж 10 хв. В отриманій надосадовій рідині визначали вміст флавоноїдів та антиоксидантну активність. Вміст флавоноїдів оцінювали модифікованим методом [13]. Інтенсивність забарвлення розчину встановлювали через 30 хв на спектрофлуориметрі «Флюорат-02-Панорама» за довжини хвилі $\lambda = 510$ нм. Для отримання калібрувального графіка ($y = 0,900x$, $R^2 = 0,945$) використовували розчин рутину в 70 %-му етанолі. Питомий вміст флавоноїдів виражали у мг/г сирої речовини коренів у рутиновому еквіваленті (РЕ), загальний вміст розраховували з визначеного вмісту в перерахунку на всю масу коренів, що виростили за 4 тижні.

Антиоксидантну активність екстрактів з «бородатих» коренів досліджували з використанням розчину DPPH-радикалу за стандартною методикою [14]. Оптичну густину розчинів визначали на спектрофлуориметрі «Флюорат-02-Панорама» за довжини хвилі $\lambda = 515$ нм.

Статистичний аналіз. Усі досліді проводили у трьох повторях. Дані аналізували за допомогою багатофакторного та однофакторного дисперсійних аналізів з наступними тестами Тьюкі. Статистично значущими вважали відмінності на рівні $p < 0,05$. Для побудови калібрувальних прямих та під час визначення антиоксидантної активності (EC_{50}) проводили кореляційно-регресійний аналіз. Для розрахунків і побудови діаграм використовували RStudio версії 2023.09.0 з інтерпретатором R версії 4.3.1.

Результати та обговорення

Виявлено відмінності у реакції коренів різних ліній на дію температурного чинника як стресового (рис. 1). Багатофакторний дисперсійний аналіз показав, що температурний стрес впливає на приріст маси бородатих коренів причепа на рівні $p < 10^{-9}$ і залежить від генотипу (лінії коренів) на рівні $p < 0,05$.

За стандартних умов вирощування приріст маси сирої речовини коренів трьох ліній не відрізнявся і становив $1,86 \pm 0,23$; $1,89 \pm 0,17$ та $1,58 \pm 0,29$ г. Найстійкішими як до зниження, так і до підвищення температури виявилися корені лінії 6-2. Ріст цих коренів за короткочасного низькотемпературного стресу практично не відрізнявся від контролю. Вони виживали також після короткочасного високотемпературного стресу, хоча корені двох інших ліній за таких умов не росли (рис. 2). Так, приріст маси сирої речовини коренів лінії 6-2 при вирощуванні за 24, 7 та 36 °C становив $1,86 \pm 0,23$; $1,62 \pm 0,16$ та $0,09 \pm 0,01$ г відповідно. Разом з тим приріст маси сирої речовини ко-

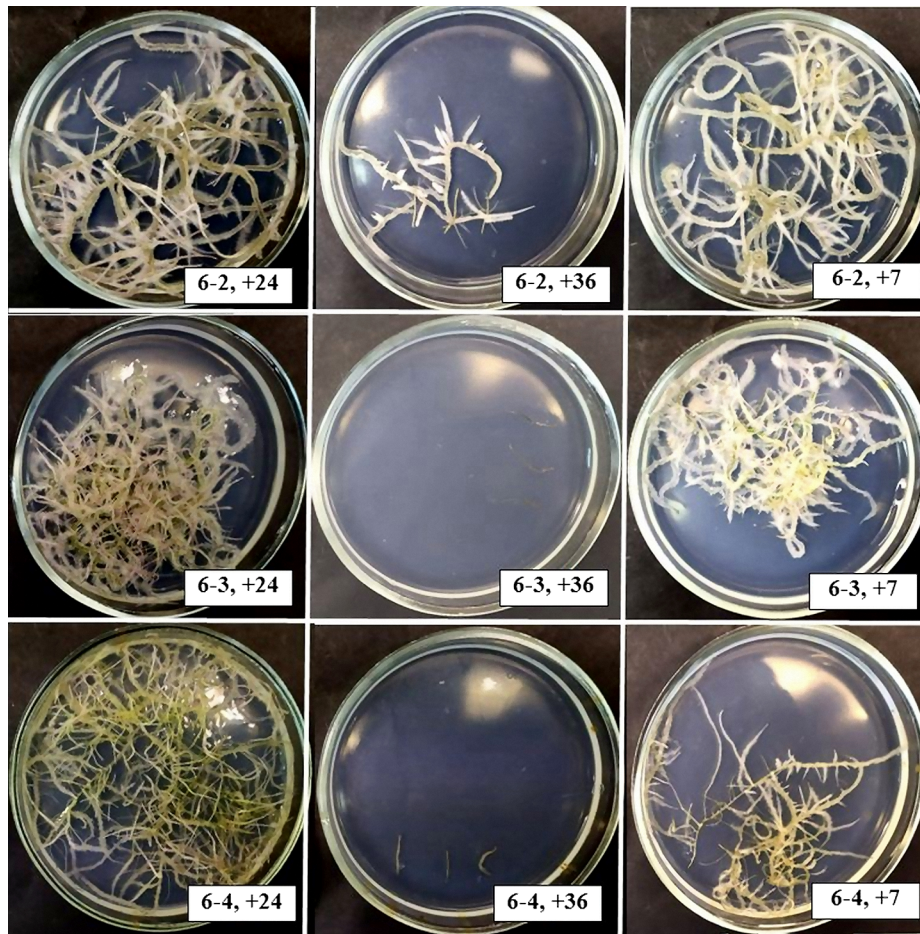


Рис. 1. Ріст «бородастих» коренів *Bidens pilosa* L. ліній 6-2, 6-3, 6-4 за різних температурних умов (°C)

ренів лінії 6-3 під час вирощування за таких самих умов дорівнював $1,89 \pm 0,17$; $1,02 \pm 0,06$ та $0,00$ г відповідно.

Знижена температура мала значно менший негативний вплив на ріст коренів усіх ліній, ніж підвищена. Так, приріст маси сирої речовини за 4 тижні культивування становив $1,62 \pm 0,16$; $1,02 \pm 0,06$ та $0,66 \pm 0,13$ г для ліній 6-2, 6-3 та 6-4 відповідно. Водночас тижневе підвищення температури до 36°C зупиняло ріст коренів ліній 6-3 і 6-4.

Багатофакторний дисперсійний аналіз показав, що накопичення флавоноїдів залежить більше від холодового стресу ($p < 10^{-6}$), ніж від обраної лінії коренів ($p < 10^{-4}$). Найменший вміст флавоноїдів (на одиницю маси) у коренях усіх ліній спостерігали за їх постійного культивування при температурі 24°C . З рис. 3, а видно, що зміна температурного режиму стимулювала синтез флавоноїдів, що збільшувало вміст цих сполук на одиницю маси за короткочасного низькотемпературного стресу. Так, вміст флавоноїдів за 24°C та 7°C у коренях лінії 6-2 становив $1,34 \pm 0,03$ та $2,19 \pm 0,03$; у коренях лінії 6-3 — $1,41 \pm 0,02$ та $2,48 \pm 0,01$; у коренях лінії 6-4 — $2,32 \pm 0,02$ та $2,66 \pm 0,05$

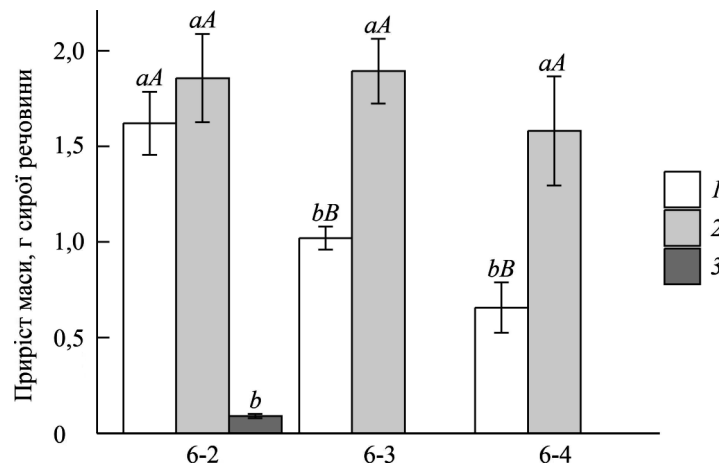


Рис. 2. Приріст маси сирій речовини «бородатих» коренів *Bidens pilosa* L. ліній 6-2, 6-3, 6-4 за різних температурних умов: 1 – 7 °C; 2 – 24 °C; 3 – 36 °C

мг РЕ/г сирій речовини. Найвищий рівень накопичення флавоноїдів ($2,98 \pm 0,02$) спостерігався у лінії 6-2 за впливу високотемпературного стресу.

Перерахунок вмісту флавоноїдів на загальну масу коренів очікувано показав, що найбільший загальний вміст флавоноїдів вищий у тих лініях, які мали високу швидкість росту (рис. 3, б). Так, за різних температурних умов загальний вміст флавоноїдів у коренях трьох ліній, що вирощували за температури 24 °C, значуще не відрізнявся і становив $2,50 \pm 0,34$; $2,66 \pm 0,20$ та $3,67 \pm 0,69$ мг РЕ відповідно у зразках 6-2, 6-3 та 6-4.

Антиоксидантна активність екстрактів мало змінювалась за температурного стресу (рис. 3, в). При короткочасному вирощуванні коренів за зниженої температури не виявлено відмінностей у параметрі ЕС₅₀. Однак підвищена температура не лише призводила до інгібування росту, а й збільшувала рівень антиоксидантної активності. Багатофакторний дисперсійний аналіз показав, що вона залежить від температури $p < 0,01$. Від генотипу залежності не виявлено.

Відомо, що температурний стрес індукуює у рослинах продукування низки сполук. Наприклад, низька температура стимулює синтез антоціанінів [10]. Участь флавоноїдів у відповіді на дію абіотичних чинників та можливі механізми детально розглянуто в оглядовій статті [15]. Флавоноїди є основним класом вторинних рослинних метаболітів, які накопичуються у відповідь на різні стреси, зокрема температурний. Особливості хімічної будови забезпечують їх антиоксидантні властивості, вони беруть участь у нейтралізації активних форм кисню, що виникають за дії температури як стресового чинника. Встановлено, що зниження вмісту антоціаніну під дією високотемпературного стресу (30–40 °C) викликане зниженням експресії генів і активності ферментів на шляху біосинтезу антоціану [11]. Woo, Chon & Lee [16] виявили вплив температурного стресу на регуляцію росту та синтезу антоціанінів. Дослідження показують, що рослини можуть реагувати на підвищені й низькі температури, змінюючи синтез флавоноїдів. Зокрема, висока температура пригнічує біосинтез флавоноїдів,

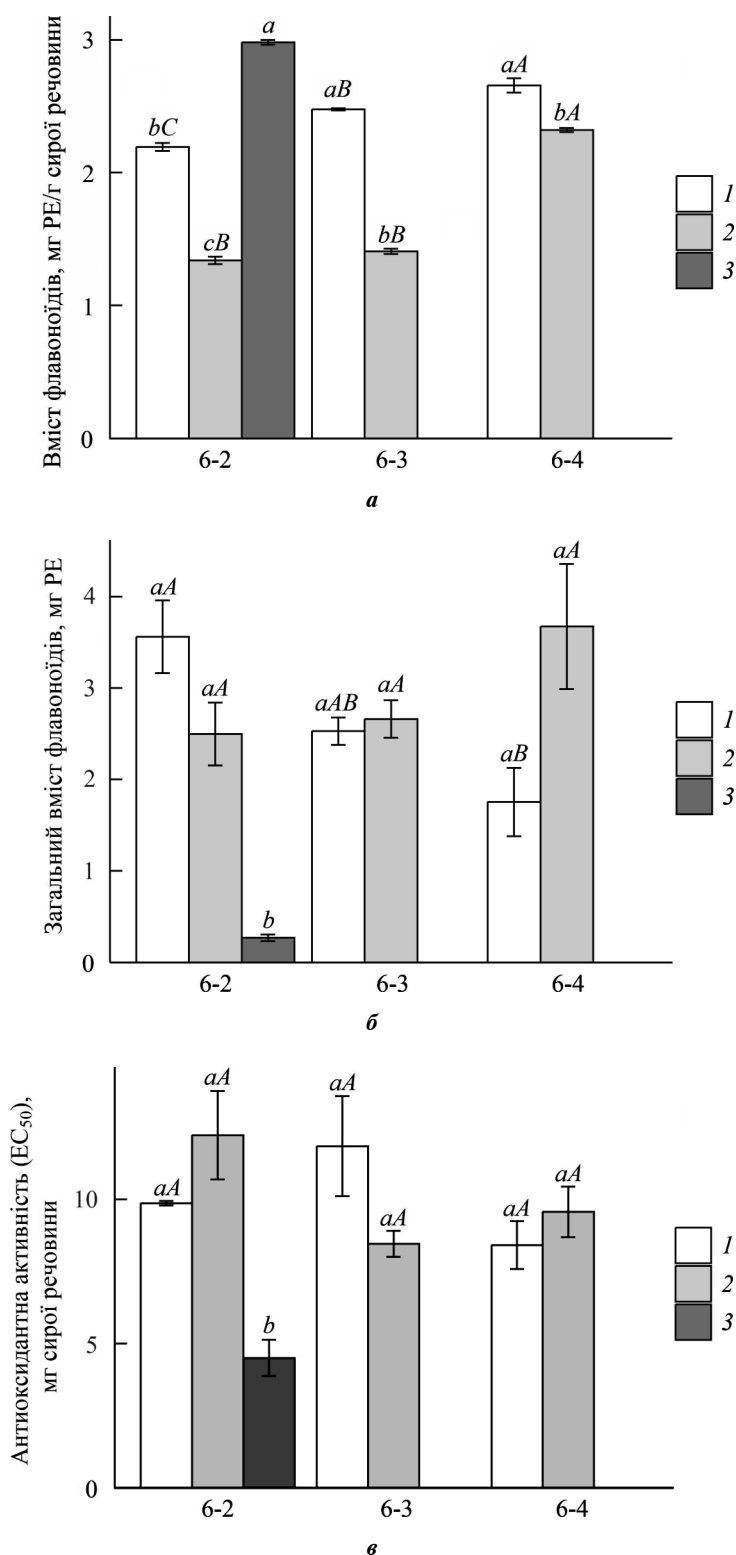


Рис. 3. Вміст флавоноїдів (на одиницю маси, *а*), загальний вміст флавоноїдів (*б*) та антиоксидантна активність (*в*) «бородатих» коренів *Bidens pilosa* L. ліній 6-2, 6-3, 6-4 за різних температурних умов: 1 – 7 °C; 2 – 24 °C; 3 – 36 °C

низька — стимулює їх продукування [7, 9, 17, 18], однак ефект залежить як від виду рослин, так і тривалості дії стресового чинника.

Раніше ми дослідили особливості росту «бородатих» коренів рослин за дії короткочасного температурного стресу. Дослідження показали, зокрема, що «бородаті» корені різних ліній *Althaea officinalis* мали різну чутливість до короткочасних температурних стресових впливів, причому висока температура значно пригнічувала ріст коренів усіх ліній, за винятком тих, які мали найвищий вміст флавоноїдів у контрольних умовах [19]. Подібні дослідження також проводили з використанням «бородатих» коренів *Artemisia vulgaris* L. та *A. dracuncululus* L. [20]. Для обох видів спостерігали середню або сильну негативну кореляцію ($R^2 = 0,37\text{—}0,85$) між тривалістю дії стресового чинника та приростом маси сирової речовини. Різні зразки (лінії) «бородатих» коренів можуть відрізнятися за чутливістю до температурного стресу, причому такі особливості характерні для «бородатих» коренів рослин різних видів.

Отже, виявлено особливості реагування «бородатих» коренів причепи різних ліній на дію короткочасного температурного стресу. Зокрема, відмінності полягали у: а) виживаності коренів різних ліній за дії підвищеної температури. Лише корені однієї лінії були здатні рости після короткочасного підвищення температури до 36 °C; б) реакції метаболізму коренів різних ліній на температурний стрес. Питомий вміст флавоноїдів (на одиницю маси) значно підвищувався за дії як зниженої, так і підвищеної температур; в) зміні антиоксидантної активності екстрактів з коренів різних ліній, що росли в умовах температурного стресу. Низькотемпературний стрес не впливав на антиоксидантну активність, тоді як підвищення температури приводило до її посилення.

Встановлено, що генотип (різні лінії — окремі трансформаційні події) впливає передусім на швидкість росту після температурного стресу. Такі особливості можуть бути пов'язані з відмінностями між лініями, які є окремими трансформаційними подіями та можуть відрізнятися одна від одної як за місцем вбудовування перенесених після трансформації генів агробактерій, зокрема *rol* генів, так і за копійністю й активністю цих генів, що, відповідно, впливає на метаболізм рослинних клітин.

REFERENCES

1. Chen, K. & Otten, L. (2017). Natural Agrobacterium transformants: recent results and some theoretical considerations. *Front. Plant Sci.*, 8, 283312. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01600>
2. Chandra, S. (2012). Natural plant genetic engineer Agrobacterium rhizogenes: Role of T-DNA in plant secondary metabolism. *Biotech. Lett.*, 34, No. 3, pp. 407-415. <https://doi.org/10.1007/S10529-011-0785-3>
3. Bulgakov, V.P., Shkryl, Y.N., Veremeichik, G.N., Gorpenchenko, T.Y. & Vereshchagina, Y.V. (2013). Recent advances in the understanding of agrobacterium rhizogenes-derived genes and their effects on stress resistance and plant metabolism. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 1-22. https://doi.org/10.1007/10_2013_179
4. Dilshad, E., Noor, H., Nosheen, N., Gilani, S.R., Ali, U. & Khan, M.A. (2021). Influence of *rol* genes for enhanced biosynthesis of potent natural products (pp. 379-404), USA: John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9781119640929.ch13>

5. Khan, A.N. & Dilshad, E. (2023). Enhanced antioxidant and anticancer potential of *artemisia carvifolia* buch transformed with rol a gene. *Metabolites*, 13, No. 3, 351. <https://doi.org/10.3390/metabo13030351>
6. Hussain, S., Awan, T.H., Waraich, E.A. & Awan, M.I. (Eds.). (2023). Plant abiotic stress responses and tolerance mechanisms. *IntechOpen*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.102138>
7. Jaakola, L. & Hohtola, A. (2010). Effect of latitude on flavonoid biosynthesis in plants. *Plant, Cell & Environ.*, 33, No. 8, pp. 1239-1247. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02154.x>
8. Dong, N. & Lin, H. (2021). Contribution of phenylpropanoid metabolism to plant development and plant-environment interactions. *J. Integr. Plant Biol.*, 63, No. 1, pp. 180-209. <https://doi.org/10.1111/jipb.13054>
9. Satyakam, Zinta, G., Singh, R.K. & Kumar, R. (2022). Cold adaptation strategies in plants — an emerging role of epigenetics and antifreeze proteins to engineer cold resilient plants. *Front. Genet.*, 13, 909007. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.909007>
10. Choi, S., Kwon, Y.R., Hossain, M.A., Hong, S.W., Lee, B. ha & Lee, H. (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, No. 5, pp. 678-686. <https://doi.org/10.1016/J.PLANTSCI.2009.02.010>
11. Dela, G., Or, E., Ovadia, R., Nissim-Levi, A., Weiss, D. & Oren-Shamir, M. (2003). Changes in anthocyanin concentration and composition in 'Jaguar' rose flowers due to transient high-temperature conditions. *Plant Sci.*, 164, No. 3, pp. 333-340. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00417-X](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00417-X)
12. Ferreira, J.F.S., Luthria, D.L., Sasaki, T. & Heyerick, A. (2010). Flavonoids from *Artemisia annua* L. as antioxidants and their potential synergism with Artemisinin against malaria and cancer. *Molecules*, 15, No. 5, pp. 3135-3170. <https://doi.org/10.3390/molecules15053135>
13. Pękal, A. & Pyrzyńska, K. (2014). Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. *Food Anal. Methods*, 7, No. 9, pp. 1776-1782. <https://doi.org/10.1007/s12161-014-9814-x>
14. Zhao, H., Fan, W., Dong, J., Lu, J., Chen, J., Shan, L., Lin, Y. & Kong, W. (2008). Evaluation of antioxidant activities and total phenolic contents of typical malting barley varieties. *Food Chem.*, 107, No. 1, pp. 296-304. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.018>
15. Shomali, A., Das, S., Arif, N., Sarraf, M., Zahra, N., Yadav, V., Aliniaiefard, S., Chauhan, D.K. & Hasanuzzaman, M. (2022). Diverse physiological roles of flavonoids in plant environmental stress responses and tolerance. *Plants*, 11, No. 22, 3158. <https://doi.org/10.3390/plants11223158>
16. Boon, H.O., Chon, S.U. & Lee, S.Y. (2006). Effects of temperature and plant growth regulators on anthocyanin synthesis and phenylalanine ammonia-lyase activity in chicory (*Cichorium intybus* L.). *J. Hort. Sci. Biotech.*, 81, No. 3, pp. 478-482. <https://doi.org/10.1080/14620316.2006.11512091>
17. Schulz, E., Tohge, T., Zuther, E., Fernie, A.R. & Hinchey, D.K. (2016). Flavonoids are determinants of freezing tolerance and cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *Sci. Rep.*, 6, No. 1, 34027. <https://doi.org/10.1038/srep34027>
18. Albert, A., Sareedenchai, V., Heller, W., Seidlitz, H.K. & Zidorn, C. (2009). Temperature is the key to altitudinal variation of phenolics in *Arnica montana* L. cv. ARBO. *Oecologia*, 160, No. 1, pp. 1-8. <https://doi.org/10.1007/s00442-009-1277-1>
19. Matvieieva, N.A., Ratushnyak, Y.I., Duplij, V.P., Shakhovsky, A.M. & Kuchuk, M.V. (2021). Effect of temperature stress on the *Althaea officinalis*'s «Hairy» roots carrying the human interferon $\alpha 2b$ gene. *Cytology and Genetics*, 55, No. 3, pp. 207-212. <https://doi.org/10.3103/S0095452721030051>
20. Matvieieva, N., Havryliuk, O., Duplij, V. & Drobot, K. (2018). The effect of high temperature on the flavonoid accumulation in *Artemisia* «hairy» roots. *Agrobiodiversity for Improving Nutrition, Health and Life Quality*, No. 2, pp. 262-267. <https://doi.org/10.15414/agrobiodiversity.2018.2585-8246.262-267>

Received 16.10.2023

THE EFFECT OF THE TEMPERATURE STRESS ON THE GROWTH AND
CONTENT OF BIOACTIVE COMPOUNDS IN THE «HAIRY» ROOTS
BIDENS PILOSA L.

N.A. Matvieieva¹, V.P. Duplij^{1,2}, Ya.I. Ratushnyak¹

¹Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine

148 Akademika Zabolotnogo St., Kyiv, 03143, Ukraine

²Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine
31/17 Vasylkivska St., Kyiv, 03022, Ukraine

e-mail: duplijv@icbge.org.ua

Genetic transformation using *Agrobacterium rhizogenes* can lead to variability in the content of compounds synthesized in different lines of «hairy» roots. Such differences may cause disparities in the survival of the samples under the effects of low and high temperatures as a stress factor. The analysis of such variability makes it possible to assess the impact of transformation on plants' adaptive potential and to identify opportunities for increasing the content of compounds with antioxidant properties. This work aimed to compare the characteristics of the response of different lines of *Bidens pilosa* L. «hairy» roots to the effect of short-term temperature stress. For this purpose, the roots were cultivated in vitro and short-term exposed to low (7 °C) and high (36 °C) temperatures. The increase in the fresh weight, the content of flavonoids, and antioxidant activity were determined. The peculiarities of the response of «hairy» roots of different lines to the effect of short-term temperature stress were revealed. Differences in growth rate, synthesis of metabolites (flavonoids), and antioxidant activity of extracts from different root lines under the influence of temperature stress were observed. In particular, only the roots of one line were able to grow after a short-term temperature increase to 36 °C; the specific content of flavonoids significantly increased after the influence of both low and high temperatures; low-temperature stress did not affect antioxidant activity while increasing temperature led to an increase in antioxidant activity. Such features can probably be related to the differences between the lines, which are the separate transformation events and can differ from each other both in the place of insertion of transferred genes, in particular *rol* genes, and in the copy number and activity of genes which, accordingly, affects the metabolism of plant cells.

Key words: *Bidens pilosa* L., *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation, «hairy» roots, temperature stress, flavonoids, antioxidant activity.

ORCID

Н.А. МАТВІЄВА — Nadiia Matvieieva <https://orcid.org/0000-0002-4877-5222>

В.П. ДУПЛІЙ — Volodymyr Duplij <https://orcid.org/0000-0002-7479-7257>

Я.І. РАТУШНЯК — Yakiv Ratushnyak <https://orcid.org/0000-0003-3708-1898>