

<https://doi.org/10.15407/frg2024.03.254>

УДК 577.1

ОСОБЛИВОСТІ РОСТУ, ВМІСТ ФЛАВОНОЇДІВ І БІОАКТИВНІСТЬ ЕКСТРАКТІВ «БОРОДАТИХ» КОРЕНІВ ПОЛИНУ *ARTEMISIA ANNUA*, *A. TILESII* ТА *A. LUDOVICIANA*

Н. МАТВЄЄВА¹, В. ДУПЛІЙ¹, Т. БОГДАНОВИЧ¹,
В. ХОРЧИНОВА-СЕДЛЯЧКОВА²

¹Інститут клітинної біології та генетичної інженерії Національної академії
наук України

03143 Київ, вул. Академіка Заболотного, 148

e-mail: dupliyv@icbge.org.ua

²Словацький сільськогосподарський університет у Німрі

94976 Німра, Трієда Андрея Глінку, 2, Словацька Республіка

Рослини роду *Artemisia* здавна відомі як лікарські, оскільки синтезують низку цінних біологічно активних сполук з антиоксидантними, протизапальними, протималарійними, протипухлинними властивостями. Генетична трансформація з використанням *Agrobacterium rhizogenes* дає можливість отримати культури «бородатих» коренів, що характеризуються швидким ростом, незалежністю від наявності у середовищі регуляторів росту та негативним геотропізмом. Завдяки активності перенесених до генома рослин бактеріальних *rol* генів «бородаті» корені можуть синтезувати біологічно активні сполуки у вищих кількостях, ніж вихідні рослини, оскільки самі *rol* гени є індукторами вторинного метаболізму рослин. У роботі порівнювали ріст і накопичення флавоноїдів у «бородатих» коренях рослин *A. annua*, *A. tilesii* та *A. ludoviciana*. Корені рослин трьох видів різнилися швидкістю росту, вмістом флавоноїдів і рівнем антиоксидантної активності. Приріст маси сирої речовини трансгенних коренів *A. annua* був у 2,1–3,2 раза більшим, ніж приріст маси коренів *A. ludoviciana*, та у 2,3–3,1 раза більшим, ніж у коренів *A. tilesii*. Корені з найбільшою швидкістю росту та середнім питомим вмістом флавоноїдів відрізнялися найвищим загальним вмістом флавоноїдів. Оскільки антиоксидантна та відновна активності мали сильну лінійну залежність від питомого вмісту флавоноїдів у екстрактах з «бородатих» коренів рослин досліджуваних видів, можна припустити значну роль саме флавоноїдів у прояві такої активності. Таким чином, використані у дослідженні лінії «бородатих» коренів *A. annua*, які характеризувались швидким ростом і найбільшим загальним вмістом флавоноїдів з високою антиоксидантною активністю, можуть бути природним джерелом антиоксидантів.

Ключові слова: *Artemisia annua* L., *Artemisia tilesii* Ledeb., *Artemisia ludoviciana* L., «бородаті» корені, флавоноїди, антиоксидантна активність.

Рід *Artemisia* родини Asteraceae налічує понад 400 видів. Це рослини, які здебільшого мають широкий ареал та зустрічаються на територіях

Цитування: Матвєєва Н., Дуплій В., Богданович Т., Хорчинова-Седлячкова В. Особливості росту, вміст флавоноїдів і біоактивність екстрактів «бородатих» коренів полину *Artemisia annua*, *A. tilesii* та *A. ludoviciana*. *Фізіологія рослин і генетика*. 2024. 56, № 3. С. 254–265. <https://doi.org/10.15407/frg2024.03.254>

з різним кліматом. Багато рослин цього роду відомі як лікарські, оскільки синтезують ряд цінних біологічно активних сполук. Особливо відомою серед полинів є рослина *Artemisia annua*, яка була детально досліджена та продовжує зацікавлювати вчених. Цьому значною мірою сприяло присудження Нобелівської премії китайській науковиці Ту Юю за всебічне вивчення артемізиніну, що синтезують рослини *A. annua*, а також можливості його використання для лікування малярії. Рослини полину різних видів мають не лише протималярійні властивості завдяки синтезу артемізиніну та інших сполук [1, 2], а й антиоксидантні [3], протизапальні [4], протипухлинні [5], протимікробні [6].

Рослини *A. ludoviciana* традиційно використовуються для лікування захворювань травної системи, таких як гастрит, основним збудником якого є *Helicobacter pylori*. Виявлено, що водний екстракт *A. ludoviciana* має значну антигелікобактерну, гастропротекторну та протизапальну дію [7]. Ці рослини мають також гіпоглікемічні властивості [8].

Рослини *A. tilesii* цікаві тим, що ростуть у суворих умовах на півночі Америки, на Алясці і, таким чином, можуть мати специфічні особливості метаболізму. Нашими дослідженнями встановлено, що ці рослини синтезують ряд флавоноїдів і фенольних кислот [9, 10].

Біотехнологічні методи, розроблені у другій половині 20-го століття, уможливають перенесення до геному рослин чужорідних генів різного походження, зокрема *Agrobacterium rhizogenes*. Генетична трансформація з використанням *A. rhizogenes* дає змогу отримати культури «бородатих» коренів — трансгенних коренів, які характеризуються швидким ростом, незалежністю від регуляторів росту, негативним геотропізмом [11]. Завдяки активності перенесених до геному рослин бактеріальних *rol* генів «бородаті» корені можуть синтезувати біологічно активні сполуки у більших кількостях, ніж вихідні рослини, оскільки самі *rol* гени є індукторами вторинного метаболізму рослин [12]. Саме тому значний інтерес становить аналіз особливостей росту різних ліній трансформованих коренів і можливість їх подальшого використання як продуцентів цінних сполук.

Метою роботи було порівняльне дослідження росту й накопичення флавоноїдів, антиоксидантної та відновної активності у «бородатих» коренях рослин *A. annua*, *A. tilesii* та *A. ludoviciana*.

Методика

Рослинний матеріал. У роботі використовували трансгенні «бородаті» корені полину трьох видів (*A. annua* L., *A. tilesii* Ledeb. та *A. ludoviciana* L.) з колекції Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України. Корені субкультивували на агаризованому поживному середовищі Мурасіге та Скуга (Duchefa, Netherland) зі зменшеним удвічі вмістом компонентів (1/2 МС) та цукрозою у концентрації 20 г/л. Для дослідження термінальної ділянки коренів завдовжки 10—15 мм відділяли й вирощували упродовж 6 тижнів за освітлення та температури 24 °С на середовищі 1/2 МС. Відтак корені відділяли від середовища, промивали деіонізованою водою, про-

сушували фільтрувальним папером та зважували. Для приготування екстрактів використовували 70 %-й етанол. Визначали приріст маси сирової речовини коренів, питомий вміст флавоноїдів у рутиновому еквіваленті (мг РЕ/г сирової речовини), загальний вміст флавоноїдів (мг РЕ) в усій масі коренів, антиоксидантну активність, відновну активність.

Приготування екстрактів. Для приготування екстрактів корені гомогенізували у 70 %-му етанолі, центрифугували (Eppendorf Centrifuge 5415 C) за 12 000 об/хв упродовж 10 хв. Отриману надосадову рідину використовували для визначення загального вмісту флавоноїдів і біологічної активності.

Визначення вмісту флавоноїдів. Для визначення вмісту флавоноїдів використовували модифікований метод [13]. До 1 мл деіонізованої води додавали 250 мкл екстракту і 75 мкл 5 %-го розчину NaNO_2 , перемішували. Через 5 хв додавали 75 мкл 10 % розчину AlCl_3 , 0,5 мл 1 М розчину NaOH і 0,6 мл деіонізованої води. Поглинання вимірювали за 510 нм. Питомий вміст флавоноїдів виражали у рутиновому еквіваленті (мг РЕ/г сирової речовини), використовуючи калібрувальний графік ($y = 1,30x$, $R^2 = 0,99$). Загальний вміст флавоноїдів (мг РЕ) визначали в усій масі вирощених коренів.

Визначення антиоксидантної активності. Антиоксидантну активність (АОА) екстрактів визначали із застосуванням реакції з розчином 2,2-дифеніл-1-пікрилгідразил радикалу (ДФПГ, Sigma) за методикою [14]. Оптичну густину розчинів визначали на спектрофлуориметрі «Флюорат-02-Панорама» за довжини хвилі 515 нм. Для оцінювання активності використовували параметр еквівалентної концентрації EC_{50} , яку розраховували як кількість рослинного матеріалу, що необхідна для приготування екстракту, який дає 50 % інгібування 0,004 %-го розчину ДФПГ радикалу.

Визначення відновної активності. Для визначення відновної активності було застосовано методику з використанням хлориду заліза. Для цього до суміші 0,312 мл 0,2 М фосфатного буфера (рН 6,6) і 0,312 мл 1 % фериціаніду калію додавали 0,016–0,5 мл екстракту та інкубували за 50 °С упродовж 30 хв. Потім додавали 0,312 мл 10 %-го розчину трихлороцтової кислоти; до 1,25 мл отриманої суміші додавали 1,25 мл деіонізованої води і 0,25 мл 0,1 %-го хлориду заліза. Поглинання світла вимірювали за довжини хвилі 700 нм. Еквівалентну концентрацію ($\text{EC}_{0,5}$) розраховували як масу кореневого матеріалу, необхідного для отримання оптичної густини 0,5 на основі рівнянь, що виражають залежність оптичної густини від концентрації екстракту. Рівняння були отримані методом лінійної регресії.

Статистичний аналіз. Усі аналізи проводили в трьох повтореннях. Дані проаналізовано на статистичну значущість за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу з наступним тестом Тьюкі. В межах видів використовували порівняння за Стьюдентом. Групи вимірів перевіряли на нормальний розподіл методом Шапіро-Вілка, а на гомогенність дисперсії — тестом Левене. Значення вважалися значущими за $p < 0,05$. Метод лінійної регресії застосовували для розрахунку калібрувальної залежності оптичної густини від концентрації

рутину та визначення антиоксидантної та відновної активностей. Результати були представлені як середнє та стандартна похибка ($x \pm SE$).

Результати та обговорення

Встановлено, що, незважаючи на значні фенотипні відмінності між лініями коренів одного виду (рис. 1), приріст маси таких коренів у *A. annua* значимо не різнився. Зокрема, приріст маси сирої речовини коренів двох ліній *A. annua* дорівнював $3,37 \pm 0,19$ г та $3,23 \pm 0,15$ г, ліній № 2 та № 4 *A. tilesii* — $1,42 \pm 0,04$ г та $1,07 \pm 0,04$ г, відповідно, та ліній № 1 та № 2 *A. ludoviciana* — $1,54 \pm 0,11$ г та $1,05 \pm 0,07$ г, відповідно (рис. 2).

Водночас трансгенні корені рослин різних видів значно відрізнялись за швидкістю росту. Так, приріст маси коренів *A. annua* був значно більшим за відповідний період, ніж приріст маси коренів рослин інших двох видів, зокрема, перевищував приріст маси коренів *A. ludoviciana* у 2,1—3,2 рази та *A. tilesii* — у 2,3—3,1 рази.

Прикметно, що різні лінії трансгенних коренів рослин одного виду не різнилися між собою за питомим вмістом флавоноїдів. Найвищий питомий вміст флавоноїдів виявлено в екстрактах з трансгенних коренів *A. tilesii* (рис. 3, а), який становив у лініях № 2 та № 4 $4,89 \pm 0,29$ та $5,71 \pm 0,39$ мг РЕ/г сирої речовини відповідно. Найменший вміст флавоноїдів виявлено у коренях *A. ludoviciana* — $2,05 \pm 0,18$ та $2,38 \pm 0,07$ мг РЕ/г сирої речовини. Разом з тим співвідношення загального вмісту флавоноїдів у «бородатих» коренях рослин трьох видів відрізнялось від співвідношення питомого вмісту цих сполук. Так, найбільший загальний вміст флавоноїдів виявлено у трансгенних коренях *A. annua* — $13,46 \pm 0,90$ та $11,34 \pm 1,03$ мг РЕ, а у «бородатих» коренях *A. tilesii*, які відзначались найбільшим питомим вмістом флавоноїдів — лише $6,95 \pm 0,49$ та $6,19 \pm 0,91$ мг РЕ (рис. 3, б). Очевидно, що такі відмінності пов'язані з особливостями досліджуваних видів та швидким приростом біомаси «бородатих» коренів саме *A. annua*. Зв'язку між приростом маси коренів та питомим вмістом флавоноїдів в їхніх екстрактах не спостерігалось ($R^2 = 0,002$).

Аналіз антиоксидантної активності екстрактів з «бородатих» коренів рослин трьох видів полину виявив також істотні відмінності (рис. 4). Високу активність показали екстракти з коренів *A. tilesii* та *A. annua*, а екстракти з трансформованих коренів *A. ludoviciana* мали дуже низький рівень такої активності. Так, параметр EC_{50} у двох лініях *A. tilesii* дорівнював $6,47 \pm 0,42$ та $3,85 \pm 0,38$ мг сирої речовини, а у двох лініях *A. ludoviciana* був найвищим — $23,55 \pm 2,69$ та $24,37 \pm 2,96$ мг сирої речовини, що відповідає найнижчій антиоксидантній активності екстрактів. Отже, АОА екстрактів з «бородатих» коренів *A. ludoviciana* була у шість разів нижчою за відповідну активність екстрактів з *A. tilesii*. Такі результати цілком узгоджуються з отриманими даними стосовно питомого вмісту флавоноїдів у коренях *A. tilesii* та *A. ludoviciana*: вміст цих сполук у коренях *A. ludoviciana* був значно меншим (див. рис. 3, а). Як і у попередніх дослідженнях [15, 16] була виявлена сильна лінійна залежність АОА (EC_{50}) від питомого



Рис. 1. Ріст бородатих коренів полину *A. annua* (а — лінія № 3, б — лінія № 14), *A. ludoviciana* (в — лінія № 1, г — лінія № 2), *A. tilesii* (д — лінія № 2, е — лінія № 4)

вмісту флавоноїдів у екстрактах, що спостерігалось і в цій роботі ($y = 34,94 - 6,56x$, $R^2 = 0,76$).

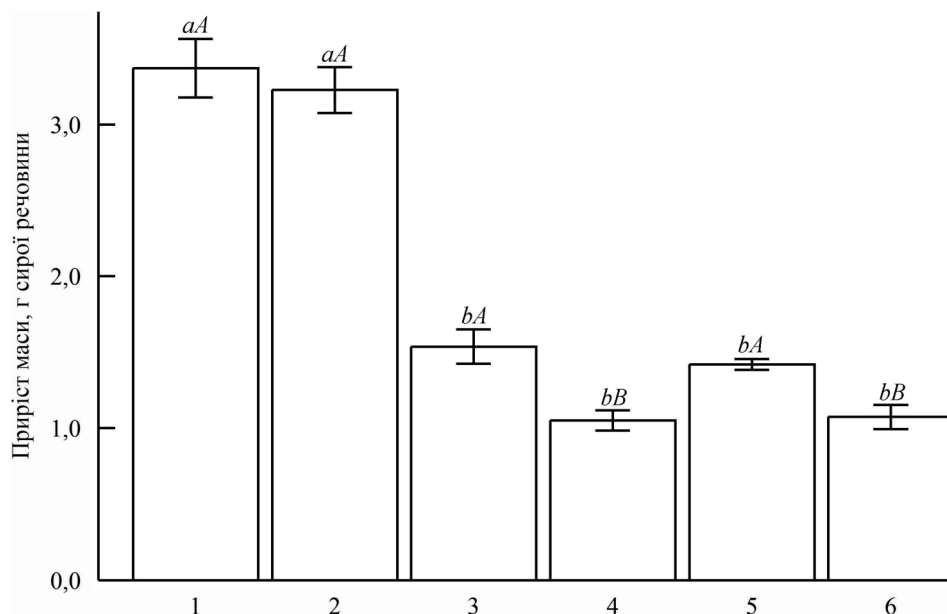


Рис. 2. Приріст маси сирової речовини бородатих коренів полину *A. annua* (1 — лінія № 3, 2 — лінія № 14), *A. ludoviciana* (3 — лінія № 1, 4 — лінія № 2), *A. tilesii* (5 — лінія № 2, 6 — лінія № 4). Однакові літери показують відсутність значущих відмінностей, великі літери стосуються порівнянь в межах виду

Аналіз біоактивності екстрактів з «бородатих» коренів рослин трьох видів (рис. 5, а), проведений з використанням реакції з хлоридом заліза (ІІІ), виявив практичну відсутність відновлювальної активності екстрактів з *A. ludoviciana* — поява характерного забарвлення реакційної суміші не спостерігалася навіть за додавання екстрактів у високій концентрації (до 0,5 мл у реакції). Це досить закономірно, зважаючи на низьку концентрацію флавоноїдів у цих екстрактах, та свідчить, що передусім флавоноїди, які містяться в екстрактах з коренів полину, беруть участь у реакції відновлення. Очікуваною з цього погляду є більша відновна активність (менше значення $EC_{0,5}$) саме екстрактів з коренів *A. tilesii* ($3,86 \pm 0,47$ та $3,29 \pm 0,02$ мг сирової речовини), які мали і найвищий питомий вміст флавоноїдів, як це видно з рис. 5, б. Як і у попередніх дослідженнях [15, 16], відновна активність ($EC_{0,5}$) залежала від питомого вмісту флавоноїдів у екстрактах ($y = 44,94 - 7,72x$, $R^2 = 0,87$). З огляду на це легко підрахувати, що середній показник $EC_{0,5}$ для двох ліній *A. ludoviciana* мав би бути 29,11 та 26,72 мг сирової речовини. Можливо, така низька відновна активність знаходиться за межами чутливості методу. Додатковим свідченням цього є порівняно велика стандартна похибка $EC_{0,5}$ для лінії № 14 *A. annua* (варіант 2 на рис. 5). Проте експериментальні дані відповідають критерію Левене на гомогенність дисперсії та критерію Шапіро-Вілکا на нормальність розподілу, що й дало змогу провести дисперсійний аналіз.

Очевидно, вихідний генотип та місце вбудовування перенесеного генетичного матеріалу впливають на ріст і розвиток отриманих трансгенних коренів. Однак швидкість їхнього росту може залежати

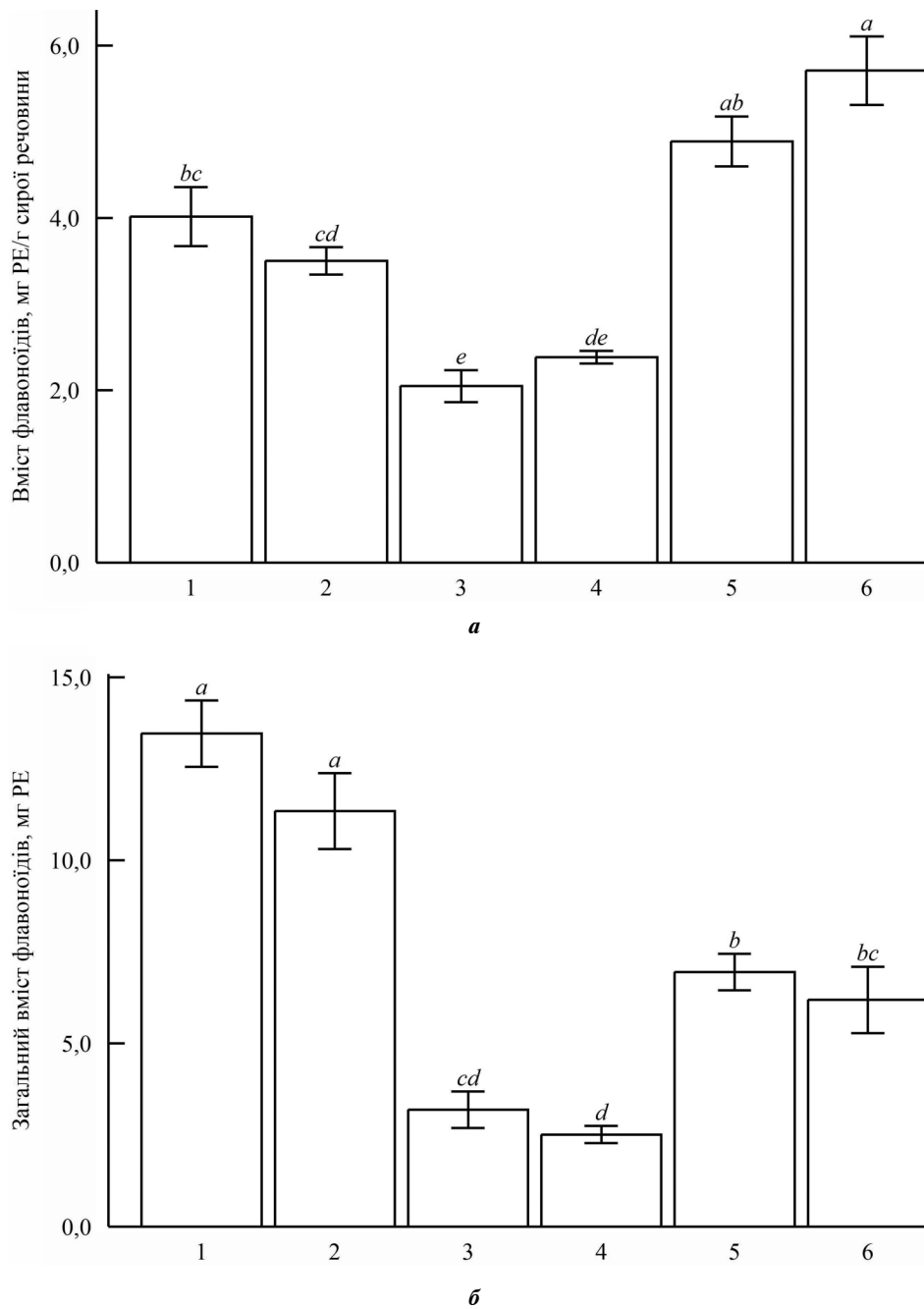


Рис. 3. Питомий (а) та загальний (б) вміст флавоноїдів у бородатих коренях полину *A. annua* (1, 2), *A. ludoviciana* (3, 4), *A. tilesii* (5, 6)

і від активності перенесених до геному рослин після кокультивування з бактеріями *Agrobacterium (Rhizobium) rhizogenes* бактеріальних *rol* генів Rі-плазмід. Зокрема, ген *rolB* є одним із таких генів, знайдених у ділянці Т-ДНК Rі-плазмід і залучених до так званого синдрому «hairy» root, що характеризується надмірним розростанням кореня рослини [17].

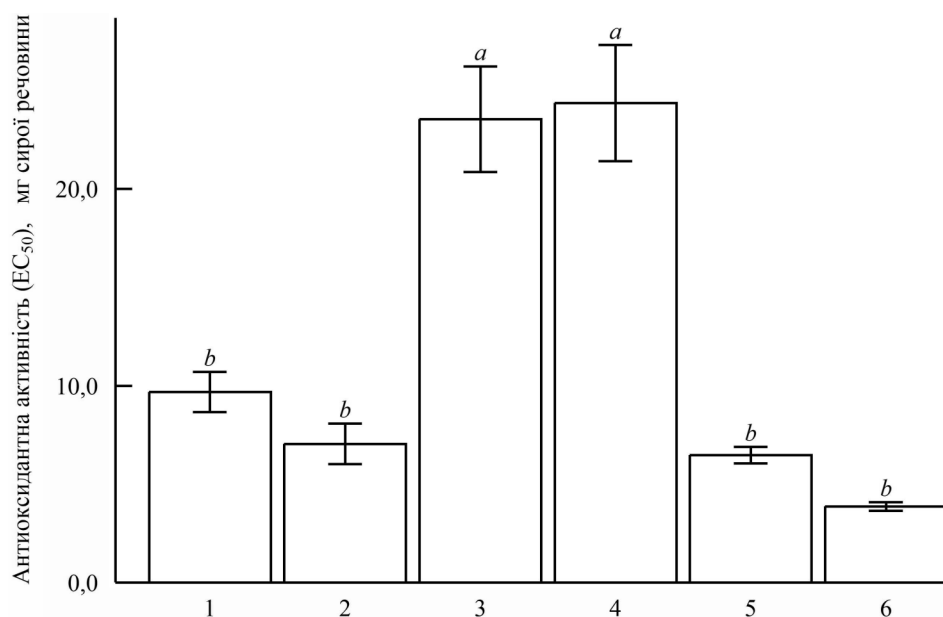


Рис. 4. Антиоксидантна активність екстрактів з бородатих коренів *A. annua* (1, 2), *A. ludoviciana* (3, 4), *A. tilesii* (5, 6)

Саме *rolB* ген є головним відповідальним за індукцію коренів на експлантатах. Встановлено також, що підвищена чутливість до ауксину, опосередкована *rolB*, може змінювати фізіологічні особливості (у тому числі швидкість росту й біосинтетичну активність) та розвиток рослин [12]. Експериментами показано, наприклад, залежність росту «бородатих» коренів *Trifolium alexandrinum* L. від рівня експресії *rolB* гена [18]. Трансформовані корені також можуть характеризуватися змінами у вторинному метаболізмі завдяки наявності та активності *rol* генів, що було підтверджено численними дослідженнями [19–21]. Такі відмінності стосуються як синтезу природних для рослин метаболітів, зокрема поліфенолів, так і рівня біологічної активності, у якій беруть участь ці метаболіти. Наприклад, встановлено, що трансформація з використанням *A. rhizogenes* може значно стимулювати продукування флавоноїдів у «бородатих» коренях [22, 23], а також підвищувати рівень антиоксидантної активності [24, 25]. Водночас різні лінії трансгенних коренів (окремі трансформаційні події) можуть відрізнятися за морфологією, швидкістю росту та біосинтетичною активністю. Це може бути пов'язано як з рівнем активності перенесених генів *A. rhizogenes*, так і з місцем вбудовування цих генів та кількістю їхніх копій. Таку варіабельність за різними параметрами можна використати для відбору ліній трансформованих коренів, які становлять найбільший інтерес як продуценти біологічно активних сполук природного походження. Саме тому використання *A. rhizogenes*-опосередкованої трансформації відкриває новий шлях у сільському господарстві та медицині [26, 27].

Таким чином, проведене дослідження виявило особливості росту «бородатих» коренів рослин *A. annua*, *A. ludoviciana* та *A. tilesii*. Зокрема, корені трьох видів різнилися за швидкістю росту, вмістом

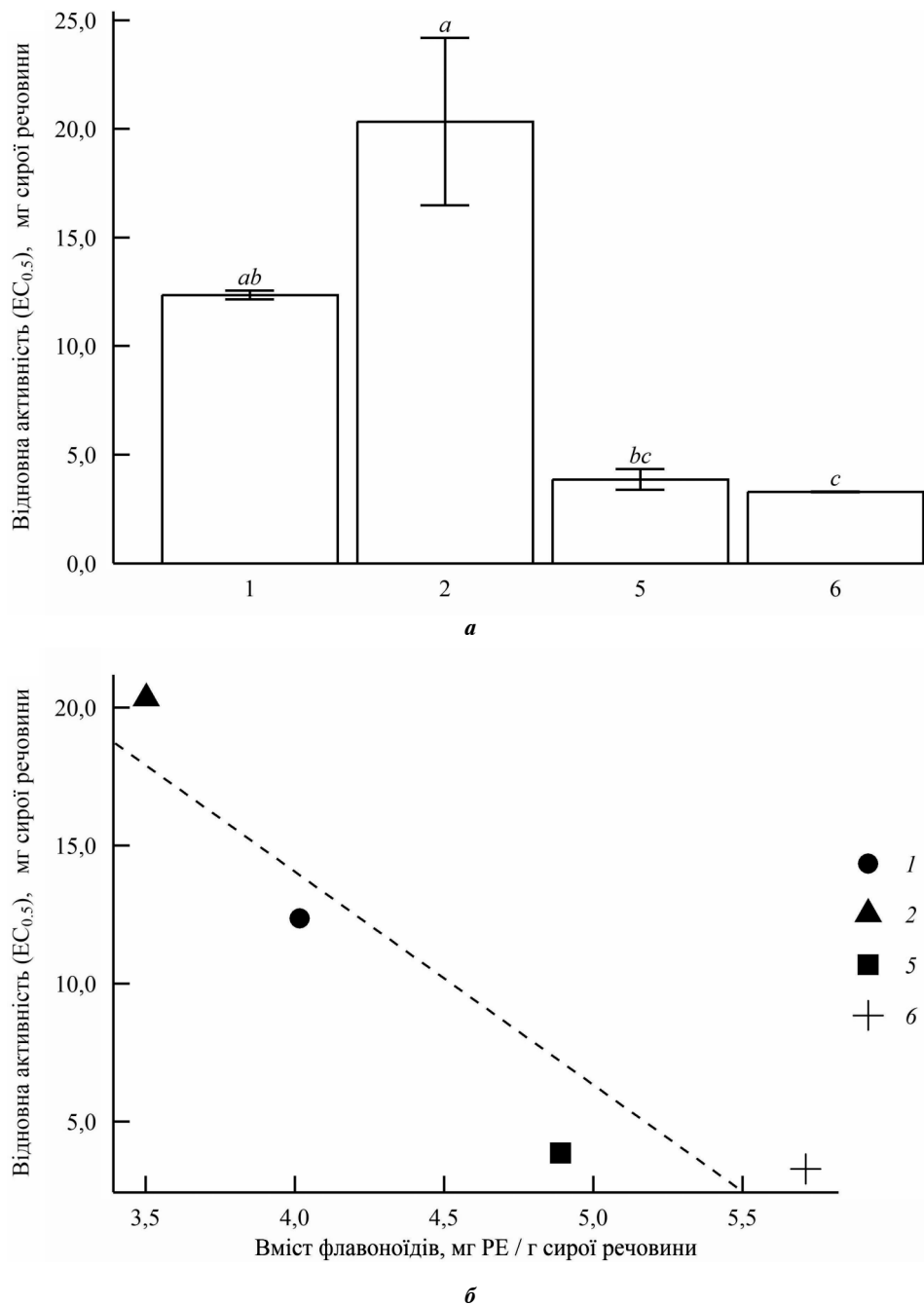


Рис. 5. Відновна активність (а) та кореляційна залежність відновної активності від вмісту флавоноїдів (б) у екстрактах з бородатих коренів *A. annua* (1, 2), *A. tilesii* (5, 6)

флавоноїдів і рівнем антиоксидантної активності. Приріст маси сирої речовини «бородатих» коренів *A. annua* був у 2,1—3,2 раза більшим, ніж приріст маси коренів *A. ludoviciana*, та у 2,3—3,1 раза більший, ніж у коренів *A. tilesii*. Корені з найбільшою швидкістю росту та середнім питомим вмістом флавоноїдів відрізнялися найвищим загальним вмістом флавоноїдів. Оскільки «бородаті» корені з високим пи-

томим вмістом флавоноїдів мали і високий рівень антиоксидантної активності, можна припустити значну роль саме флавоноїдів у прояві такої активності. Отже, використані у дослідженні лінії «борода-тих» коренів *A. annua*, які характеризувались швидким ростом та найбільшим загальним вмістом флавоноїдів з високою антиоксидантною активністю, можуть бути використані як природне джерело антиоксидантів.

Робота виконана частково за грантами НАН України № 0120U100849 та Вишеградського фонду № 52300061.

REFERENCES

1. Czechowski, T., Rinaldi, M.A., Famodimu, M.T., Veelen, M. Van, Larson, T.R., Winzer, T., Rathbone, D.A., Harvey, D., Horrocks, P. & Graham, I.A. (2019). Flavonoid Versus Artemisinin Anti-malarial Activity in *Artemisia annua* Whole-Leaf Extracts. *Front. Plant Sci.*, 10, 984. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00984>
2. Mojarab, M., Naderi, R. & Afshar, F.H. (2015). Screening of Different Extracts from *Artemisia* Species for Their Potential Antimalarial Activity. *Iran. J. Pharmac. Res.*, 14, No. 2, pp. 603-608. <https://doi.org/10.22037/IJPR.2015.1653>
3. Skowrya, M., Gallego, M.G., Segovia, F. & Almajano, M.P. (2014). Antioxidant Properties of *Artemisia annua* Extracts in Model Food Emulsions. *Antioxidants*, 3, No. 1, pp. 116-128. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX3010116>
4. Wang, Q., Jin, J., Dai, N., Han, N., Han, J. & Bao, B. (2016). Anti-inflammatory effects, nuclear magnetic resonance identification, and high-performance liquid chromatography isolation of the total flavonoids from *Artemisia frigida*. *J. Food Drug Analysis*, 24, No. 2, pp. 385-391. <https://doi.org/10.1016/J.JFDA.2015.11.004>
5. Kolesar, J.M. & Seeberger, P.H. (2022). Editorial: Anticancer Potential of *Artemisia annua*. *Front. Oncol.*, 12, 853406. <https://doi.org/10.3389/FONC.2022.853406>
6. Singh, N.B., Devi, M.L., Biona, T., Sharma, N., Das, S., Chakravorty, J., Mukherjee, P.K. & Rajashekar, Y. (2023). Phytochemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil from the Leaves of *Artemisia vulgaris* L. *Molecules*, 28, No. 5, pp. 2279. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES28052279>
7. Palacios-Espinosa, J.F., Núñez-Aragón, P.N., Gomez-Chang, E., Linares, E., Bye, R., & Romero, I. (2021). Anti-*Helicobacter pylori* Activity of *Artemisia ludoviciana* subsp. *mexicana* and Two of Its Bioactive Components, Estafiatin and Eupatilin. *Molecules*, 26, No. 12, 3654. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26123654>
8. Anaya-Eugenio, G.D., Rivero-Cruz, I., Rivera-Chávez, J. & Mata, R. (2014). Hypoglycemic properties of some preparations and compounds from *Artemisia ludoviciana* Nutt. *J. Ethnophar.*, 155, No. 1, pp. 416-425. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2014.05.051>
9. Duplij, V.P. & Matvieieva, N.A. (2019). Features of the dynamics of flavonoid accumulation in *Artemisia tilesii* Ledeb. *Fiziol. rast. genet.*, 51, No. 4, pp. 308-314. <https://doi.org/10.15407/FRG2019.04.308> [in Ukrainian].
10. Skorokhod, I.O., Bohdanovych, T.A. & Matvieieva, N.A. Phenolcarboxylic acids in *Artemisia tilesii* Ledeb. «hairy» roots. Modern achievements of pharmaceutical technology. Kharkiv: NUPh.
11. Christey, M.C. & Braun, R.H. (2005). Production of hairy root cultures and transgenic plants by *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation. *Humana Press*, pp. 47-60. <https://doi.org/10.1385/1-59259-827-7:047>
12. Bulgakov, V.P. (2008). Functions of rol genes in plant secondary metabolism. *Biotechnol. Adv.*, 26, No. 4, pp. 318-324. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2008.03.001>
13. Pękal, A. & Pyrzynska, K. (2014). Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Analyt. Methods*, 7, No. 9, pp. 1776-1782. <https://doi.org/10.1007/S12161-014-9814-X>

14. Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT — Food Sci. Technol.*, 28, No. 1, pp. 25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
15. Matvieieva, N.A., Morgun, B.V., Lakhneko, O.R., Duplij, V.P., Shakhovsky, A.M., Ratushnyak, Y.I., Sidorenko, M., Mickevicius, S. & Yevtushenko, D.P. (2020). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation enhances the antioxidant potential of *Artemisia tilesii* Ledeb. *Plant Physiol. Biochem.*, 152, pp. 177-183. <https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2020.04.020>
16. Bohdanovych, T.A., Shakhovsky, A.M., Duplij, V.P., Ratushnyak, Y.I., Kuchuk, M.V., Poyedinok, N.L. & Matvieieva, N.A. (2021). Effects of Genetic Transformation on the Antioxidant Activity of «Hairy» Roots of *Althaea officinalis* L., *Artemisia vulgaris* L., and *Artemisia tilesii* Ledeb. *Cytol. Genet.*, 55, No. 6, pp. 531-539. <https://doi.org/10.3103/S0095452721060037>
17. Mauro, M.L. & Bettini, P.P. (2021). *Agrobacterium rhizogenes* rolB oncogene: An intriguing player for many roles. *Plant Physiol. Biochem.*, 165, pp. 10-18. <https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2021.04.037>
18. Tanaka, N., Fujikawa, Y., Aly, M.A.M., Saneoka, H., Fujita, K. & Yamashita, I. (2001). Proliferation and rol gene expression in hairy root lines of Egyptian clover. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, 66, No. 3, pp. 175-182. <https://doi.org/10.1023/A:1010648124872>
19. Gai, Q.Y., Jiao, J., Luo, M., Wang, W., Gu, C.B., Fu, Y.J. & Ma, W. (2016). Tremendous enhancements of isoflavonoid biosynthesis, associated gene expression and antioxidant capacity in *Astragalus membranaceus* hairy root cultures elicited by methyl jasmonate. *Process Biochem.*, 51, No. 5, pp. 642-649. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2016.01.012>
20. Chandra, S. (2012). Natural plant genetic engineer *Agrobacterium rhizogenes*: Role of T-DNA in plant secondary metabolism. *Biotechnol. Lett.*, 34, No. 3, pp. 407-415. <https://doi.org/10.1007/S10529-011-0785-3>
21. Chandra, S. & Chandra, R. (2011). Engineering secondary metabolite production in hairy roots. *Phytochem. Rev.*, 10, No. 3, pp. 371-395. <https://doi.org/10.1007/S11101-011-9210-8>
22. Ho, T.T., Lee, J. Du, Ahn, M.S., Kim, S.W. & Park, S.Y. (2018). Enhanced production of phenolic compounds in hairy root cultures of *Polygonum multiflorum* and its metabolite discrimination using HPLC and FT-IR methods. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 102, No. 22, pp. 9563-9575. <https://doi.org/10.1007/S00253-018-9359-9>
23. Gai, Q.Y., Jiao, J., Luo, M., Wei, Z.F., Zu, Y.G., Ma, W. & Fu, Y.J. (2015). Establishment of Hairy Root Cultures by *Agrobacterium Rhizogenes* Mediated Transformation of *Isatis Tinctoria* L. for the Efficient Production of Flavonoids and Evaluation of Antioxidant Activities. *PLOS ONE*, 10, No. 3, e0119022. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0119022>
24. Malarz, J., Michalska, K., Yudina, Y. V. & Stojakowska, A. (2022). Hairy Root Cultures as a Source of Polyphenolic Antioxidants: Flavonoids, Stilbenoids and Hydrolyzable Tannins. *Plants*, 11, No. 15, pp. 1950. <https://doi.org/10.3390/PLANTS11151950>
25. Tusevski, O., Vinterhalter, B., Krstić Milošević, D., Soković, M., Ćirić, A., Vinterhalter, D., Zdravković Korać, S., Petreska Stanoeva, J., Stefova, M. & Gadzovska Simic, S. (2017). Production of phenolic compounds, antioxidant and antimicrobial activities in hairy root and shoot cultures of *Hypericum perforatum* L. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, 128, No. 3, pp. 589-605. <https://doi.org/10.1007/S11240-016-1136-9>
26. Gutierrez-Valdes, N., Häkkinen, S.T., Lemasson, C., Guillet, M., Oksman-Caldentey, K.M., Ritala, A. & Cardon, F. (2020). Hairy Root Cultures — A Versatile Tool With Multiple Applications. *Front. Plant Sci.*, 11, p. 33. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2020.00033>
27. Shi, M., Liao, P., Nile, S.H., Georgiev, M.I. & Kai, G. (2021). Biotechnological Exploration of Transformed Root Culture for Value-Added Products. *Trends Biotechnol.*, 39, No. 2, pp. 137-149. <https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2020.06.012>

Received 15.04.2024

GROWTH CHARACTERISTICS, FLAVONOIDS CONTENT, AND BIOACTIVITY OF *ARTEMISIA ANNUA*, *A. TILESII*, AND *A. LUDOVICIANA* «HAIRY» ROOT EXTRACTS

N. Matvieieva¹, V. Duplij¹, T. Bohdanovych¹, V. Horčinová-Sedláčková²

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

148 Akademika Zabolotny St., Kyiv, 03143, Ukraine

e-mail: duplijv@icbge.org.ua

²Slovak University of Agriculture in Nitra

2 Trieda Andreja Hlinku, Nitra, 94976, Slovak Republic

The *Artemisia* genus plants has long been known as medicinal because they synthesize numerous valuable biologically active compounds with antioxidant, anti-inflammatory, anti-malarial, and antitumor properties. Genetic transformation using *Agrobacterium rhizogenes* makes it possible to obtain «hairy» root cultures characterized by rapid growth, independence from the presence of growth regulators in the medium, and negative geotropism. Due to activity of bacterial *rol* genes transferred to the plant genome, «hairy» roots can synthesize biologically active compounds in higher quantities than the original plants, since the *rol* genes themselves are inducers of secondary plant metabolism. In the work the growth and accumulation of flavonoids in the «hairy» roots of *A. annua*, *A. tilesii*, and *A. ludoviciana* plants were compared. The transgenic roots of three plant species differed in terms of growth rate, flavonoid content, and level of antioxidant and reducing activity. The increase in weight of transgenic *A. annua* roots was 2.1–3.2 times higher than that of *A. ludoviciana* roots, and 2.3–3.1 times higher than that of *A. tilesii* roots. The highest total flavonoids content was detected in the roots with the highest growth rate and average specific content of flavonoids. Since the antioxidant and reducing activities depended on the specific content of flavonoids in the extracts from the «hairy» roots of plants of the studied species, we can assume a significant role of flavonoids in the manifestation of such activity. Thus, the *A. annua* «hairy» root lines used in the study, characterized by rapid growth and the highest total flavonoids content with high antioxidant activity, may be a natural source of antioxidants.

Key words: *Artemisia annua* L., *Artemisia tilesii* Ledeb., *Artemisia ludoviciana* L., «hairy» roots, flavonoids, antioxidant activity.

ORCID

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

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

Т. БОГДАНОВИЧ — Taisa Bohdanovych <https://orcid.org/0000-0002-1834-523X>

В. ХОРЧИНОВА-СЕДЛЯЧКОВА — Vladimíra Horčinová-Sedláčková
<https://orcid.org/0000-0002-5844-8938>