



THE EFFECT OF HIGH TEMPERATURE ON THE FLAVONOID ACCUMULATION IN *ARTEMISIA* “HAIRY” ROOTS

Matvieieva Nadiia¹, Havryliuk Olesya²,
Duplij Volodymyr¹, Drobot Kateryna*¹

¹Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of the NASU, Acad. Zabolotnogo, Kyiv, Ukraine

²Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the NASU, Acad. Zabolotnogo, Kyiv, Ukraine

ВПЛИВ ПІДВИЩЕНОЇ ТЕМПЕРАТУРИ НА НАКОПИЧЕННЯ ФЛАВОНОЇДІВ У ТРАНСГЕННИХ КОРЕНЯХ РОСЛИН РОДУ *ARTEMISIA*

Матвєєва Надія¹, Гаврилюк Олеся²,
Дуплій Володимир¹, Дробот Катерина*¹

Received: 27. 10. 2018

Revised: 07. 11. 2018

Published: 12. 12. 2018

The aim of the work was to investigate the short-term effects of high temperature on the flavonoid accumulation in *Artemisia vulgaris* L. and *A. dracunculus* L. „hairy” roots. The roots were cultivated for one, two, and five days at +36 °C, then were grown at +24 °C for up to four weeks. The flavonoid content (expressed in rutin equivalent, RE) of ethanolic extracts was determined using a AlCl₃ method. “Hairy” root lines differed in their sensitivity to short-term high-temperature exposure. Both stimulation and inhibition of flavonoid accumulation, as well as no changes were observed in “hairy” root lines. Significant (1.7–6.4 times) decrease in the flavonoid content was observed in lines which characterized by a higher flavonoid content under standard conditions (+24 °C) without the temperature stress exposure. For both species, the average or strong negative correlation ($R^2 = 0.37... 0.85$) was observed for weight gain from the time of thermal stress. Thus, *A. vulgaris* and *A. dracunculus* “hairy” roots differed in the cellular metabolism activity. They differed in the ability of flavonoids synthesis and sensitivity to the short-term high temperature exposure. Such exposure can lead both to activation and inhibition of the synthesis of biologically active compounds, particularly, flavonoids.

Keywords: “hairy” roots, *Artemisia vulgaris* L., *Artemisia dracunculus* L., high temperature, flavonoid

Вступ

Генетична трансформація з використанням ґрунтових фітопатогенних бактерій *Agrobacterium rhizogenes*, яка є способом отримання «бородатих» коренів, приводить не тільки до зміни геному рослин, але й до значних змін у функціонуванні клітин

*Corresponding author: Kateryna Drobot, Zabolotnoho 148b str., Kyiv, Ukraine, 03143;
✉ katyadrobot@gmail.com

та їх біосинтетичної активності. Доведено, що наслідком перенесення *rol* генів *A. rhizogenes*, які є у Т-ДНК агробактеріальної плазміди (Huffman, 1984) та які здатні інтегруватися в геном рослин, є активація вторинного метаболізму (Bonhomme, 2000; Komarovská, 2010). Виявлено, що ці гени стимулюють синтез фітоалексинів (Bulgakov, 2011), впливають на синтез вторинних метаболітів у клітинах рослин (Bulgakov, 2008a), а також зменшують кількість активних форм кисню (ROS) (Bulgakov, 2008b), хоча механізм цього явища досі недостатньо з'ясований (Bulgakov, 2018). Отже, трансформування приводить до численних змін у функціонуванні клітин, і, таким чином, може впливати на адаптацію до дії стресових факторів.

Результатом дії абіотичних стресів, таких як низька або висока температура, нестача вологи, підвищений вміст солей у ґрунті, дія ультрафіолетового випромінювання є зміни у процесах біосинтезу та накопичування ряду сполук, що є як відповіддю на дію стресу, так і захисною реакцією клітин, яка дозволяє рослинам вижити за критичних умов (Gupta, 1993). Крім того, оскільки за дії стресу відбувається накопичення активних форм кисню (Choudhury, 2017; Mittler, 2015; Ramel, 2012), рослини можуть реагувати шляхом активізації синтезу природних антиоксидантів, зокрема, флавоноїдів (Bandurska, 2013; Brunetti, 2013). У процесі відповіді на дію стресів задіяні сполуки білкової природи, у тому числі регуляторні та сигнальні молекули (Grativol, 2012; Krasensky, 2012; Umezawa, 2004; Walter, 2011; Wang, 2009; Zhu, 2010; Zhu, 2016), а також сполуки небілкової природи, зокрема, з антиоксидантними властивостями (Ahmad, 2010). Вивчення цих процесів дозволяє охарактеризувати метаболічну відповідь трансформованих організмів на дію стресового фактору, визначити молекулярно-біологічні аспекти цього процесу, зокрема, виявити гени, які беруть участь у регулюванні адаптації рослин до дії стресових факторів, та регуляцію їх активності.

«Бородаті» корені рослин, отримані після трансформування *A. rhizogenes*, відрізняються не тільки наявністю перенесених до їх геному генів, але й функціональними характеристиками. Так, вони характеризуються високою швидкістю росту, незалежністю від наявності у середовищі регуляторів росту, специфічним фенотипом, що зумовлено активністю агробактеріальних генів (Павлова, 2013). Разом з тим, наявність цих генів також може призводити до появи специфічної відповіді на дію стресових факторів. Тому метою цієї роботи було визначення особливостей росту культур «бородатих» коренів рослин полину *A. vulgaris* та *A. dracunculus* за дії короткотривалого високотемпературного стресу, а також оцінка впливу таких умов вирощування на накопичення флавоноїдів.

Матеріали та методи досліджень

«Бородаті» корені рослин *A. vulgaris* та *A. dracunculus*, отримані нами раніше (Дробот, 2015; Drobot, 2016.), вирощували у стерильних умовах в чашках Петрі на живильному середовищі Мурасіге-Скуга (Murashige, 1962) зі зниженою удвічі концентрацією макросолей. Вплив підвищеної температури досліджували культивуванням коренів протягом 1, 2 та 5 діб за температури +36 °C та подальшого вирощування (загальна

тривалість до 4 тижнів) при температурі +24 °С. Контролем слугували корені, які вирощували за стандартних умов при температурі +24 °С протягом чотирьох тижнів. Приріст маси коренів визначали шляхом зважування. Концентрацію флавоноїдів (RE) визначали, використовуючи якісну реакцію з $AlCl_3$ (Pečal, 2014). Дані переставлені у вигляді середнього значення та довірчого інтервала на рівні значимості 95%. Порівняння середніх проводили за результатами дисперсійного аналізу та теста Тьюкі на рівні значимості 95%. Для з'ясування взаємозв'язку між величинами проводили кореляційно-регресійний аналіз і визначали коефіцієнт детермінації (R^2).

Результати та обговорення

Результати дослідження свідчать про наявність загальної тенденції до зменшення швидкості росту «бородатих» коренів двох видів полину при збільшенні часу культивування при +36 °С. Усі досліджувані зразки коренів *A. dracunculus* (№№1-3) були чутливими до підвищеної температури, оскільки вирощування за таких умов протягом 5 діб приводило до зменшення приросту маси відповідно у 3,1, 2,6 та 2,4 рази у порівнянні. Для *A. vulgaris* (№№1-3) це зменшення становило 1,8, 2,4 та 2,3 рази, проте однодобова теплова обробка приводила до підвищення приросту маси у ліній №1 та №2 у 1,2 та 1,9 рази. Для обох видів спостерігалася середня або сильна негативна кореляція ($R^2 = 0.38... 0.85$) приросту маси від часу теплового стресу.

Трансгенні корені двох видів полину при їх культивуванні за стандартних умов (+24 °С) відрізнялися за вмістом флавоноїдів (рис.1а, б). Зокрема, найбільшим вмістом сполук відрізнялися корені №2 *A. vulgaris* (12,45 мг РЕ.г⁻¹ СМ) та №3 *A. dracunculus* (2,93 мг РЕ.г⁻¹ СМ). Найменше флавоноїдів накопичували корені №1 та №2 *A. dracunculus* – відповідно 0,59 та 0,62 мг РЕ.г⁻¹ СМ. Вірогідно, причиною таких відмінностей для трансгенів утворених із одного батьківського генотипу є різне місце вбудовування перенесених генів і, відповідно, відмінності у функціонуванні змінених геномів.

Спостерігалось три типи реакції на тепловий стрес: толерантність *A. dracunculus* №2; стимулювання синтезу флавоноїдів внаслідок тієї чи іншої тривалості теплового стресу *A. dracunculus* №1 та *A. vulgaris* №1, №3; зниження концентрації флавоноїдів у *A. dracunculus* №3 та *A. vulgaris* №2. Останній тип реакції помічено у ліній, що мали відносно високу концентрацію флавоноїдів за стандартних умов. Про лінійну залежність концентрації флавоноїдів у «бородатих» коренях можна говорити тільки у випадках №2 *A. vulgaris*, де спостерігалась середня негативна кореляція ($R^2 = 0.64$), та №1 *A. dracunculus*, середня позитивна кореляція ($R^2 = 0.68$).

Вирощування при підвищеній температурі приводило у ряді варіантів (лінії №2 *A. vulgaris*, №3 *A. dracunculus*) до зменшення вмісту флавоноїдів. У той же час, такі умови активізували синтез флавоноїдів у коренях №1 *A. vulgaris*. Так, вміст досліджуваних сполук у цих коренях при дії підвищеної температури протягом однієї, двох та п'яти діб був більшим, ніж у контролі відповідно у 1.9 ($p < 0.05$), 1.1 та 1.7 ($p < 0.05$) рази. В інших випадках стимулюючий ефект спостерігався тільки в результаті певної тривалості дії фактору ($p < 0.05$). Так, для лінії №3 *A. vulgaris* це була 1 доба (2.3 рази), а для №1

A. dracunculus – 5 діб (2.3 рази). Треба відмітити слабку позитивну кореляцію вмісту флавоноїдів від приросту маси як для *A. vulgaris* ($R^2 = 0,27$), так і для *A. dracunculus* ($R^2 = 0.21$).

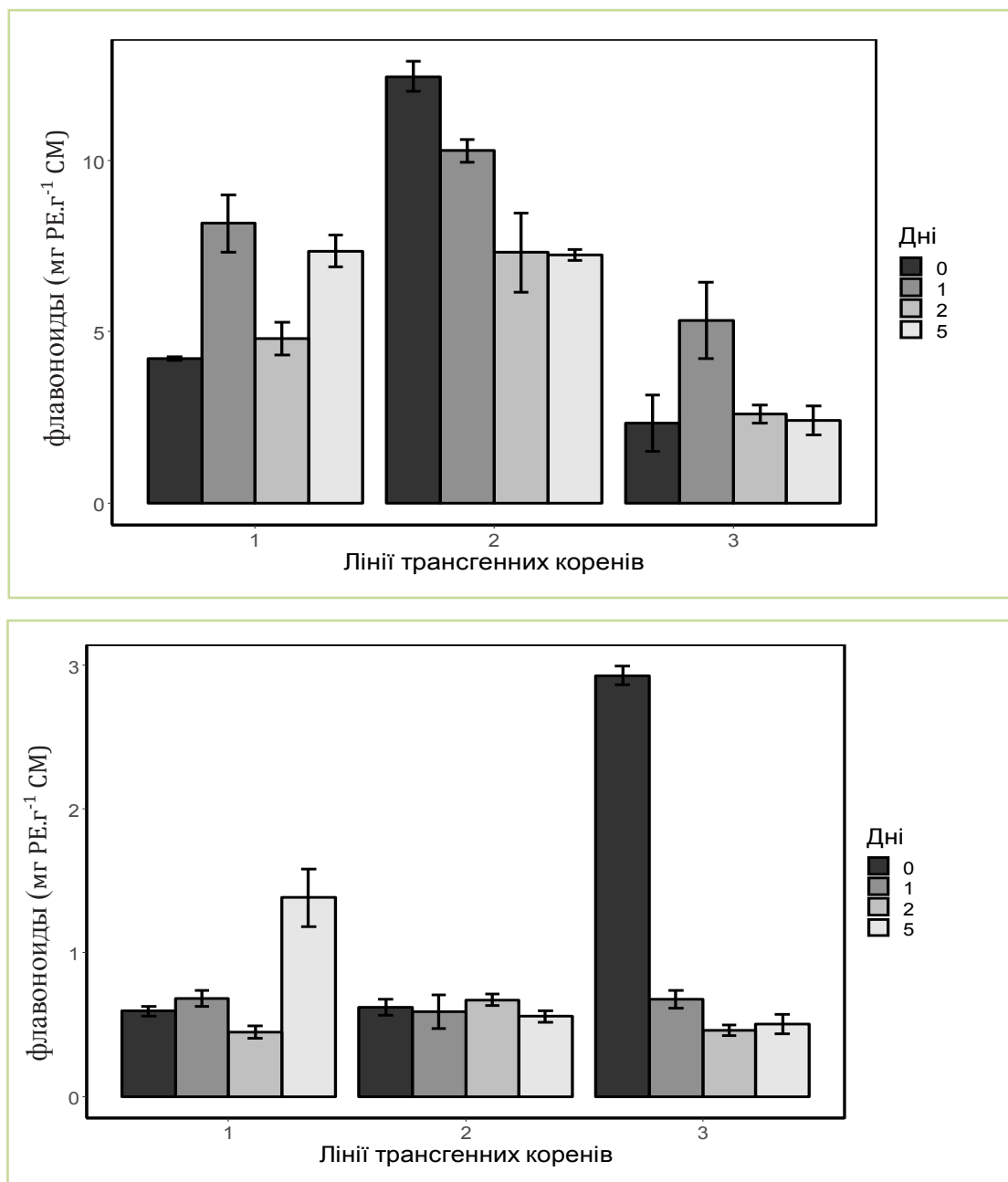


Рисунок 1 Вміст флавоноїдів у «бородатих» коренях *A. vulgaris* (а) та *A. dracunculus* (б) при їх вирощуванні за температури +36 °С протягом однієї, двох та п'яти діб

Отже, досліджувані зразки «бородатих» коренів рослин полину двох видів досить відрізнялися за їх чутливістю до короткотермінової дії підвищеної температури, що виражалося у зменшенні приросту біомаси та у більшості випадків вмісту флавоноїдів. Проте кількісні значення цих показників сильно різнилися як при вирощуванні «бородатих» коренів за нормальних умов, так і характером реакції на температурний стрес.

Висновки

Отже, генетична трансформація з використанням ґрунтових бактерій *Agrobacterium rhizogenes* веде до утворення «бородатих» коренів, що різняться за активністю клітинного метаболізму. Такі розбіжності виражаються у різній здатності коренів до синтезу флавоноїдів та різній чутливості трансформованих коренів до дії короткочасового температурного стресу. Результатом такої дії може бути як активізація, так і пригнічення метаболізму.

Література

- BANDURSKA, H., NIEDZIELA, J., CHADZINIKOLAU, T. 2013. Separate and combined responses to water deficit and UV-B radiation. In *Plant Sci.*, vol. 213, p. 98–105.
- BONHOMME, V., LAURAIN-MATTAR, D., LACOUX, J., FLINIAUX, M., JACQUIN-DUBREUIL, A. 2000. Tropane alkaloid production by hairy roots of *Atropa belladonna* obtained after transformation with *Agrobacterium rhizogenes* 15834 and *Agrobacterium tumefaciens* containing rol A, B, C genes only. In *J Biotechnol.*, vol. 81(2–3), p. 151–158.
- BRUNETTI, C., et al. 2013. Flavonoids as Antioxidants and Developmental Regulators: Relative Significance in Plants and Humans. In *Int J Mol Sci.*, vol. 14(2), p. 3540–3555.
- BULGAKOV, V. P. 2008a. Functions of rol genes in plant secondary metabolism. In *Biotechnol Adv.*, vol. 26, p. 318–324.
- BULGAKOV, V. P., et al. 2008b. Suppression of reactive oxygen species and enhanced stress tolerance in *Rubia cordifolia* cells expressing the *rolC* oncogene. In *Mol Plant Microbe Interact.*, vol. 21(12), p. 1561–1570.
- BULGAKOV, V. P., et al. 2011. Application of *Agrobacterium rol* genes in plant biotechnology: a natural phenomenon of secondary metabolism regulation. In *Genetic Transformation* [online]. Rijeka: IntechOpen, p. 261–270. ISBN 978-953-307-364-4 [cit. 2018–10–10]. Available at: <https://www.intechopen.com/books/genetic-transformation/application-of-agrobacterium-rol-genes-in-plant-biotechnology-a-natural-phenomenon-of-secondary-meta>
- BULGAKOV, V.P., et al. 2018. The *rolB* plant oncogene affects multiple signaling protein modules related to hormone signaling and plant defense. In *Sci Rep.*, vol. 8(1) p.2285–2292.
- CHOUDHURY, F.K., et al. 2017. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. In *Plant J.*, vol. 90(5), p. 856–867.
- DROBOT, K.O., SHAKHOVSKY, A. M., MATVIEIEVA, N. A. 2016. Tarragon (*Artemisia dracuncululus* L.) “hairy” root culture production. In *Biotech Acta*, vol. 9(2), p. 55–60.
- GRATIVOL, C., HEMERLY, A. S, FERREIRA, P. C. 2012. Genetic and epigenetic regulation of stress responses in natural plant populations. In *Biochim biophys Acta*, vol. 19 (2), p. 176–185.

- GUPTA, A. et al. 1993. Overexpression of Superoxide dismutase protects plants from oxidative stress Induction of ascorbate peroxidase in superoxide dismutase-overexpressing plants In *Plant Physiol.*, vol. 103(4), p. 1067–1073.
- HUFFMAN, G.A., WHITE, F.F., GORDON, M.P., NESTER, G.W. 1984. Hairy root inducing plasmid: physical map and homology to tumor-inducing plasmids. In *J. Bacteriol.*, vol. 157, p. 269–276.
- KOMAROVSKÁ, H., et al. 2010. Effect of the number of rol genes integrations on phenotypic variation in hairy root-derived *Hypericum perforatum* L. plants. In *Z Naturforsch C.*, vol. 65(11–12), p. 701–712
- KRASENSKY, J., JONAK, C. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. In *J Exp Bot.*, vol. 63(4), p. 1593–1608.
- MITTLER, R., BLUMWALD, E. 2015. The roles of ROS and ABA in systemic acquired acclimation. In *Plant Cell.*, 27(1), p. 64–70.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. In *Phys. Plant.*, vol. 15, p. 473–497.
- PEKAL, A., PYRZYNSKA, K. 2014. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. In *Food Anal. Methods*, vol. 7, p. 1776–1782.
- RAMEL, F., et al. 2012. Carotenoid oxidation products are stress signals that mediate gene responses to singlet oxygen in plants. In *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 109, p. 5535–5540.
- UMEZAWA, T. et al. 2004. SRK2C, a SNF1-related protein kinase 2, improves drought tolerance by controlling stress-responsive gene expression in *Arabidopsis thaliana*. In *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 101(49), p. 17306–17311.
- WALTER, P., RON, D. 2011. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. In *Science*. vol. 334, p. 1081–1086.
- WANG, X.Q. et al. 2009. Exploring the mechanism of *Physcomitrella patens* desiccation tolerance through a proteomic strategy. In *Plant Physiol.*, vol. 149(4), p. 1739–1750.
- ZHU, J. et al. 2010. A cellulose synthase-like protein is required for osmotic stress tolerance in *Arabidopsis*. In *Plant J.*, vol. 63, p. 128–140.
- ZHU, J. et al. 2016. Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. In *Cell.*, vol. 167, p. 313–324.
- AHMAD, P. et al. 2010. Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. In *Crit Rev Biotechnol.*, vol. 30(3), p. 161–175.
- ДРОБОТ, К. О., ШАХОВСЬКИЙ, А. М., МАТВЄЄВА, Н. А. 2015. Отримання культури «бородатих» коренів рослин полину звичайного з використанням *Agrobacterium rhizogenes* з геном *ipn-α2b* людини. В *Фактори експериментальної еволюції організмів*, том 17, с. 145–147.
- ПАВЛОВА, О. А., МАТВЄЄВА Т. В., ЛУТОВА Л. А. 2013. Rol-гени *Agrobacterium rhizogenes*. В *Екол. Генетика*, том 11(1), с. 59–68.