

ОТРИМАННЯ ТРАНСГЕННИХ КОРЕНІВ *S. ALTISSIMA* L. ТА *S. ALBIDA* L. ДЛЯ НАКОПИЧЕННЯ ВИСОКОГО ВМІСТУ ФЛАВОНОЇДІВ

Кощавко К.С.¹, Лучаківська Ю.С.^{1,2}, Коваль І.В.³

¹ Київський Палац дітей та юнацтва, [kseniako05@gmail.com](mailto:kсениako05@gmail.com)

² Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України

³ Національний ботанічний сад ім. М.М. Гришка НАН України

Біохімічні дослідження лікарських рослин, які є джерелом комплексу цінних біологічно активних сполук, є одним з етапів пошуку перспективних видів і визначення можливостей їх практичного використання є дослідження хімічного складу.

У пошуках нових джерел сировини з фармакологічними властивостями активно досліджуються рослини роду *Scutellaria* L. [1, 2]. Останні широко застосовуються в народній медицині завдяки високому вмісту флавоноїдів, дубильних речовин та характеризуються протипухлинними, противірусними, протизапальними, антиоксидантними, антибактеріальними властивостями.

Зважаючи на літературні дані щодо високого вмісту флавоноїдів у коренях рослин роду *Scutellaria* L. [3], нас зацікавила можливість отримання та біохімічний аналіз екстрактів культури трансгенних коренів шоломниці, адже це б дозволило збільшити об'єми біомаси, яка може бути використана в якості лікарської сировини.

Метою нашої роботи було отримати культуру трансгенних коренів видів *S. albida* та *S. altissima* та проаналізувати вміст флавоноїдів у екстрактах отриманих культур.

Рослини шоломниці вводили в культуру *in vitro* шляхом поверхневої стерилізації насіння двох видів роду *Scutellaria* L. (*S. albida*, *S. altissima*). Рослини культивували при кімнатній температурі, 16-годинному фотоперіоді на живильному середовищі Мурасіге – Скуга [4]. Для подальшої генетичної трансформації використовували рослини віком від 6 до 12 тижнів.

Для отримання культури трансгенних коренів використовували агропіновий штам А4 *Agrobacterium rhizogenes*. Нічну бактеріальну суспензійну культуру отриману у рідкому живильному середовищі LB на термошейкері (200об./хв.), центрифугували протягом 10 хв. (4000об./хв.), надалі осад ресуспендували у рідкому живильному середовищі MS з додаванням 100 мкМ ацетосирингона. Рослинні експланти *S. albida* та *S. altissima* культивували з бактеріальною суспензією на орбітальному шейкері (150об./хв.), протягом 48 годин при 28°C. В подальшому експланти переносили на агаризоване живильне середовище MS з додаванням 400 мг/л антибіотику цефотаксиму для елімінації бактерій. Через три тижні після трансформації спостерігали утворення коренів на рослинних експлантах *S. altissima*, що характеризувалися R1-фенотипом (швидким ростом, відсутністю геотропізму та характерною опушеністю) (рис. 1.). На експлантах рослин *S. albida* коренеутворення не спостерігалось.



Рис. 1. Ініціація коренетворення на гіпокотильних експлантах *S. altissima*

Для підтвердження трансгенної природи отриманих корневих культур проводили молекулярно-генетичний аналіз за допомогою методу ПЛР (розмір фрагменту 780 п.н., нуклеотидна послідовність праймерів: 5'-atggatcccaaatgctattcctccacga-3', 5'-ttaggcttcttcttcaggttactgcagc-3') (рис. 2.).

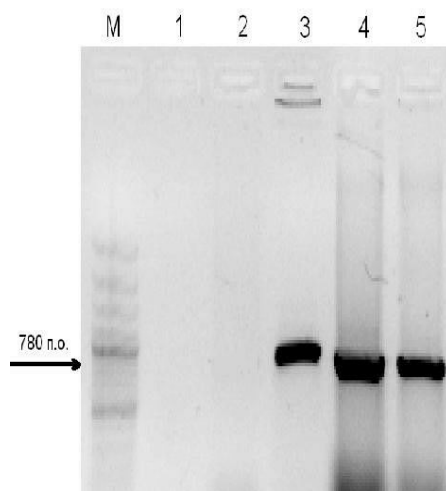


Рис. 2. Електрофореграма ПЛР-аналізу на присутність *rolB* гену (б): М– Маркер (1 kb Plus DNALadder, Fermentas), 1 – негативний контроль (проба без ДНК), 2 – негативний контроль (ДНК не трансформованої рослини), 3 – позитивний контроль (плазмідна ДНК (A4)), 4-5 – ДНК аналізованих зразків культури „бородатих” коренів

ПЛР-аналіз дозволив виявити присутність агробактеріального *rolB* гену, що підтверджує трансгенну природу отриманої кореневої культури.

Для визначення вмісту флавоноїдів у культурі трансгенних коренів та коренів інтактних рослин використовували спектрофотометричний метод з перерахунком на рутин, основою якого є властивість флавоноїдів утворювати забарвлений комплекс із спиртовим розчином хлориду алюмінію[5] (рис. 3.).

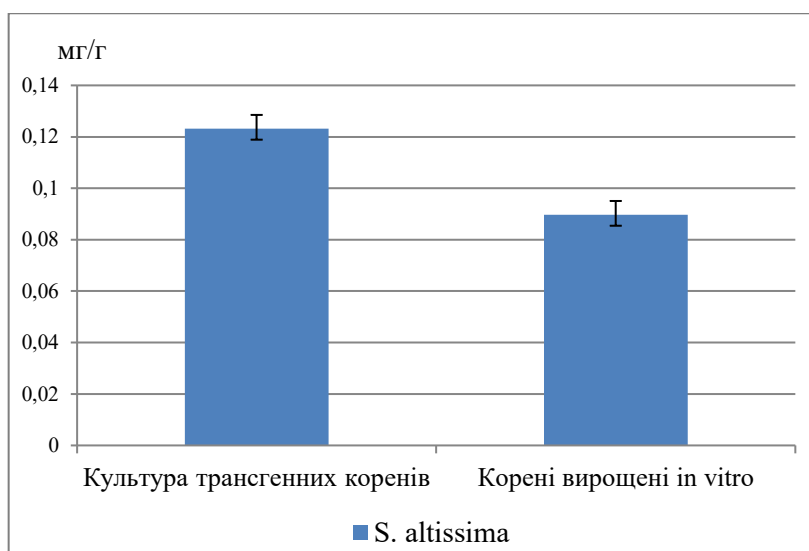


Рис.3. Вміст флавоноїдів в екстрактах трансгенних коренів та коренів рослин, вирощених в умовах *in vitro*

Виявлено достовірно більш високий вміст флавоноїдів для культури Ri-коренів, ніж для коренів рослин вирощених в умовах *in vitro* виду *S. altissima*.

Таким чином, отримані нами дані дозволяють зробити висновок, що фармакологічно перспективною можна вважати культуру трансгенних коренів виду *Scutellaria altissima* L., що характеризувалася високим вмістом флавоноїдів.

Список використаної літератури:

1. Cole IB *et al.* Comparisons of *Scutellaria baicalensis*, *Scutellaria lateriflora* and *Scutellaria racemosa*: genome size, antioxidant potential and phytochemistry. *Planta Med.* 2008. Mar. Vol.74, No.4. P. 474-481.
2. Гусева О. О. Морфогенез видів роду *Scutellaria* L. та структура їх ценопопуляцій у Сибірі. Новосибірськ, 2019. С. 234.
3. Nurul Islam M., Downey F. & Ng C.K.Y. Comparative analysis of bioactive phytochemicals from *Scutellaria baicalensis*, *Scutellaria lateriflora*, *Scutellaria racemosa*, *Scutellaria tomentosa* and *Scutellaria wrightii* by LC-DAD-MS. *Metabolomics* 7. 2011. P.446–453.
4. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol.Plant.* 1962, Vol.15(3). P. 473–97.
5. Pełkal, A., Pyrzyńska, K. Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. *Food Analytical Methods.* – 2014, Vol.7. P. 1776–1782.