

МАТВЄЄВА Н. А.<sup>1,2</sup>, ГАВРИЛЮК О. А.<sup>2</sup>, ДУПЛІЙ В. П.<sup>1✉</sup><sup>1</sup> Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Україна, 03143, м. Київ, вул. Заболотного, 148<sup>2</sup> Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України, Україна, 03143, м. Київ, вул. Заболотного, 154✉ [duplijv@icbge.org.ua](mailto:duplijv@icbge.org.ua), (068) 373-65-40**ВПЛИВ ВАНАДІЮ (IV) НА РІСТ «БОРОДАТИХ» КОРЕНІВ *ARTEMISIA TILESII* LEDEB.**

Визначення впливу токсичних металів на рослини становить значний інтерес, оскільки забруднення навколишнього середовища токсикантами, зокрема металами, є загрозою для безпеки сільського господарства та здоров'я населення. Ванадій – ультрамікроелемент, який у незначній кількості накопичується в рослинах. Водночас ванадій належить до токсичних металів. Підвищена його кількість у ґрунті призводить до пригнічення росту рослин. **Мета.** Метою роботи було визначення особливостей впливу сполуки ванадію (IV) (нейтральний розчин [V<sup>4+</sup>·cit]) у модельній системі *in vitro* та порівняння цього впливу на культуру «бородатих» коренів та рослини *Artemisia tilesii* Ledeb. **Методи.** Пагони рослин та трансгенні корені культивували на агаризованому живильному середовищі МС зі сполукою ванадію (IV) у концентрації 1, 5, 10, 50 та 100 мг/л за температури +24°C. Приріст маси коренів визначали через 4 тижні. **Результати.** Встановлено, що ванадій (IV) у концентрації 50 мг/л повністю інгібував формування коренів та призводив до загибелі пагонів. Трансгенні корені окремих ліній виживали навіть за наявності ванадію у концентрації 100 мг/л. **Висновки.** «Бородаті» корені виявилися значно стійкішими до ванадію (IV), ніж контрольні рослини, що, вірогідно, можна пояснити трансформацією, перенесенням агробактеріальних генів та змінами у вторинному метаболізмі.

**Ключові слова:** ванадій (IV), *Artemisia tilesii* Ledeb., «бородаті» корені.

Дослідження дії токсичних металів на рослини проводиться протягом багатьох років. Ці роботи спрямовані передусім на встановлення механізмів шкодочинної дії металів, визначення токсичних концентрацій та можливих механізмів захисту рослин [1–4]. Ванадій є металом V групи періодичної системи та належить до так званих розсіяних елементів, які не трапляються у літосфері у вільній формі. Оскільки цей хіміч-

ний елемент знайшов широке застосування у металургії, зокрема для отримання сталі та різних сплавів, розроблено способи його видобутку з різних природних мінералів. Знаходять застосування похідні ванадію (V), однак цей метал може утворювати сполуки і у валентності (IV), (III) та (II), причому VO та V<sub>2</sub>O<sub>3</sub> є основними оксидами, VO<sub>2</sub> – амфотерним, а V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> – кислотним. Відомо, що ванадій є токсичним для рослин. Так, наявність сполуки NH<sub>4</sub>VO<sub>3</sub> у концентрації 40 мг/кг призводила до пригнічення росту рослин китайської зеленої гірчиці та томатів. Підвищення вмісту ванадію у субстраті інгібувало ріст стебла, викликало зменшення ваги коренів та плодів [5]. Досліджено процес впливу сполуки ванадію (V) на рослини за використання різних ґрунтів [6]. Під час вирощування рослин на ґрунті, який містить ванадій, відбувається його накопичення у рослинах. Так, за перевищення концентрації 250 мг/кг у ґрунті відбувалося його накопичення переважно у коренях та часткове транспортування (<20 %) до надземної частини рослин сої [7].

Слід зазначити, що практично всі наведені дослідження було проведено з використанням сполук п'ятивалентного ванадію, який вважається найбільш токсичним. Водночас становить інтерес визначення впливу сполуки ванадію (IV) (V(IV)) на рослини, проте такі дослідження досі не проводилися. Крім того, використання культур «бородатих» коренів, отриманих шляхом трансформації з використанням ґрунтових фітопатогенних бактерій *Agrobacterium rhizogenes*, дозволяє провести не тільки порівняння виживаності таких культур та коренів контрольних нетрансформованих рослин, але й встановити вплив генетичної трансформації на вторинний метаболізм в умовах абіотичного стресу, спричиненого наявністю токсичного металу у середовищі. Такі дослідження можуть базуватися на тому факті, що перенесення *rol* генів *A. rhizogenes*, які є індукторами змін вторинного

метаболізму [8–11], можуть призводити до активізації синтезу у клітинах трансформованих коренів сполук з антиоксидантними або відновлювальними властивостями.

Проведені дослідження в умовах *in vivo* не можуть коректно відобразити дію токсичного металу на рослини, оскільки наявні у ґрунті мікроорганізми також вступають у взаємодію зі сполуками ванадію, накопичуючи або інактивуючи їх [6, 12]. Система тестування *in vitro* дозволяє провести аналіз виживаності рослин у присутності токсичних сполук, уникаючи детоксикації цих сполук мікроорганізмами. У наших дослідженнях було проведено визначення особливостей впливу сполуки ванадію (IV) на ріст рослин та «бородатих» коренів полину.

### Матеріали і методи

Вихідним матеріалом для досліджень слугували п'ять ліній «бородатих» коренів рослин *Artemisia tilesii* Ledeb., що були отримані нами раніше шляхом *A. rhizogenes*-опосередкованої трансформації, штам А4 [13], а також контрольні нетрансформовані рослини, культивовані *in vitro*. «Бородаті» корені вирощували протягом 4 тижнів у стерильних умовах за температури +24°C на чашках Петрі з використанням середовища Мурасіге та Скуга [14] зі зниженою удвічі концентрацією макросолей (1/2МС), до якого додавали нейтральний розчин цитрату ванадію [ $V^{4+}$  cit] у кінцевій концентрації за V(IV) у середовищі 1, 5, 10, 50 та 100 мг/л. Приріст маси визначали шляхом прямого зважування. Для визначення впливу токсичної сполуки на рослини відділяли пагони вирощуваних у стерильних умовах рослин та культивували їх на середовищі 1/2МС зі сполукою ванадію у тих самих концентраціях, визначаючи масу сформованих коренів та приріст маси пагонів.

### Результати та обговорення

Підвищення концентрації V(IV) інгібувало ріст пагонів, викликаючи пожовтіння та відмирання листків (рис. 1), причому така реакція була дозозалежною. Зокрема, приріст маси пагонів на середовищі з V (IV) у концентрації 1 мг/л був на 37 % менший, ніж у контролі, на середовищі з 5 мг/л V(IV) на 61 % менший, а за збільшення вмісту сполуки металу спостерігалася загибель рослин (рис. 2). Маса коренів, які формувалися на пагонах за наявності у середовищі 1 та 5 мг/л V(IV) була на 66 та 79 % мен-

ша, ніж у контролі, а за збільшення вмісту ванадію корені не утворювалися. Отже, V(IV) навіть у концентрації 1 мг/л значно інгібував ріст рослин в умовах *in vitro*.

«Бородаті» корені усіх п'яти ліній були значно стійкіші до дії токсичного металу, ніж контрольні рослини (рис. 2, 3). Так, ріст коренів лінії № 1 за культивування цих коренів на середовищі з 1 та 5 мг/л V(IV) суттєво не відрізнявся від росту за контрольних умов (середовище без металу). Збільшення концентрації V(IV) до 10 та 50 мг/л призводило до зменшення приросту маси відповідно на 36 та 69 % у порівнянні з контролем. Аналогічною була реакція коренів лінії № 2. Водночас корені лінії № 5 виявилися більш чутливими до токсичного металу, що виражалось у зменшенні приросту маси на 25 % у порівнянні з контролем вже за концентрації V(IV) у середовищі 5 мг/л. Слід також відзначити здатність коренів ліній №№ 10, 5 та 58 до росту навіть за наявності V(IV) у концентрації 100 мг/л, причому зменшення приросту маси лінії № 10 у порівнянні з контролем становило лише 33 % (рис. 2).

Відомо, що корені відіграють дуже важливу роль у взаємодії рослин із токсичними сполуками, оскільки вони безпосередньо контактують із ґрунтом та забруднювачами, які там знаходяться. Саме тому важливим є розуміння біохімічних та фізіологічних процесів, що відбуваються під час росту рослин в умовах абіотичного стресу, спричиненого наявністю токсичних металів. У таких дослідженнях адекватною моделлю є культура «бородатих» коренів, які можна субкультивувати тривалий час, а також вирощувати в умовах *in vitro*. Трансгенні корені можуть слугувати не тільки моделлю для фізіолого-біохімічних досліджень, але й бути використані для фітореMediaції, оскільки мають здатність до швидкого росту, накопичення металів і, таким чином, вилучення їх з середовища [15].

Використання асептичних умов унеможливує втручання у процеси детоксикації мікроорганізмів з ґрунтових мікробних угруповань. Наприклад, у роботі [16] вивчали механізми акумулювання хрому «бородатими» коренями *Brassica napus*. Було проведено дослідження щодо вивчення дії цинку на рослини з використанням «бородатих» коренів *Solanum nigrum* та визначено концентраційний діапазон стійкості до цього металу, а також відмінності у чутливості різних трансгенних ліній [17].



Рис. 1. Ріст пагонів та коренів контрольних рослин *A. tilesii* на середовищах із різними концентраціями (А – 0, Б – 1, В – 10 мг/л) ванадію (IV).

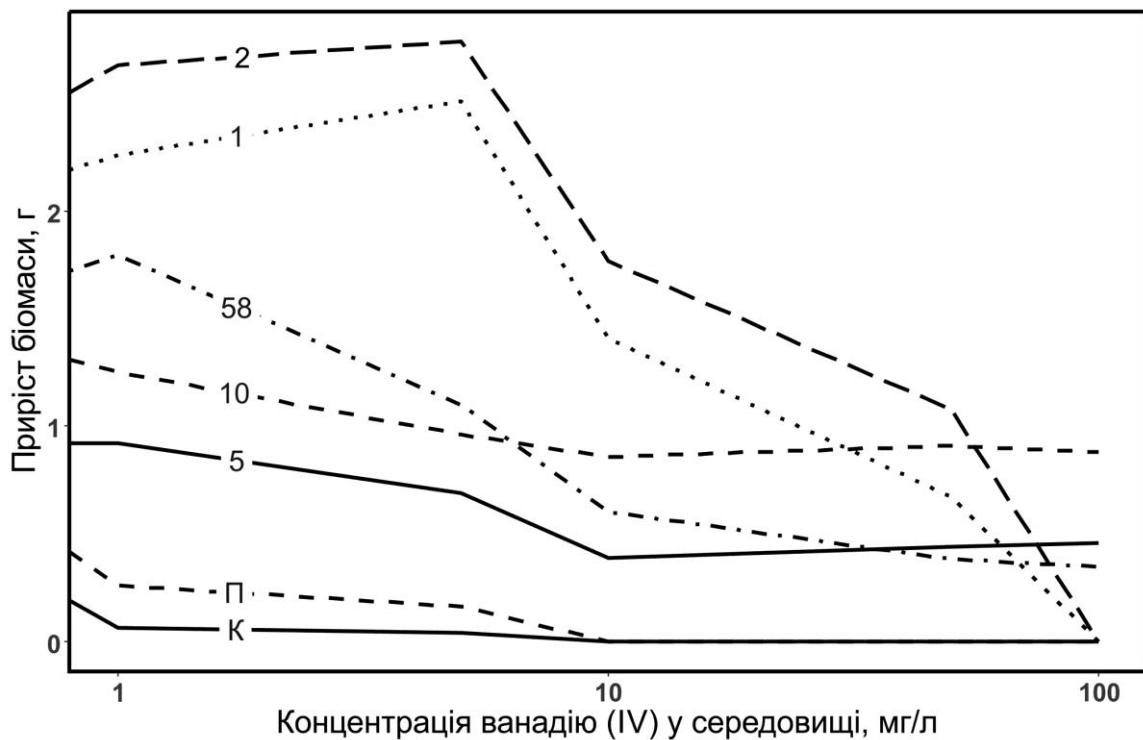


Рис. 2. Приріст біомаси «бородатих» коренів *A. tilesii* лінії №№ 2, 1, 58, 10, 5, а також пагонів (II) та коренів (K) контрольних рослин за вирощування на живильному середовищі зі сполукою V(IV).

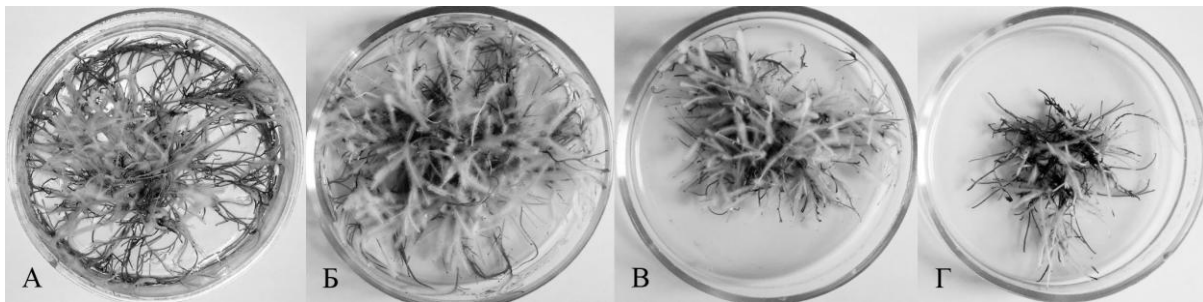


Рис. 3. Пригнічення росту «бородатих» коренів *A. tilesii* лінії № 1 за дії токсичного ванадію (IV) в концентраціях 0 (А), 5 (Б), 10 (В) та 50 мг/л (Г).

Наші дослідження, проведені на моделі «бородатих» коренів полину, показали значно більшу стійкість цих коренів порівняно з контрольними рослинами, а також виявили відмінності у чутливості різних ліній до токсичної дії сполуки ванадію (IV).

### Висновки

Результати роботи дають підставу стверджувати, що «бородаті» корені *Artemisia tilesii* характеризуються значно більшою стійкістю до

токсичної сполуки ванадію (IV). Крім того, виявлено відмінності у чутливості до цієї сполуки різних ліній коренів, отриманих із використанням *A. rhizogenes*-опосередкованої трансформації.

*Автори висловлюють вдячність зав. відділу біології екстремофільних мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України д. т. н. Таширеву О. Б. за консультативну допомогу.*

### References

- Kochian L. V., Pence N.S., Letham D.L.D., Pineros M.A., Magalhaes J.V., Hoekenga O.A., Garvin D.F. Mechanisms of metal resistance in plants: Aluminum and heavy metals. *Plant and Soil*. 2002. Vol. 247, No. 1. P. 109–119.
- Amin H., Arain B.A., Abbasi M.S., Amin F., Jahangir M., Soomro N. Evaluation of chromium phyto-toxicity, phyto-tolerance, and phyto-accumulation using biofuel plants for effective phytoremediation. *International Journal of Phytoremediation*. 2019. P. 1–12.
- Fourati E., Vogel-Mikulc K., Bettaieb T., Kaviini A., Kelemen M., Vavretin P., Pelicon P., Abdelly C., Ghnaya T. Physiological response and mineral elements accumulation pattern in *Sesuvium portulacastrum* L. subjected *in vitro* to nickel. *Chemosphere*. 2019. Vol. 219. P. 463–471.
- Singh P., Singh I., Shah K. Reduced Activity of Nitrate Reductase Under Heavy Metal Cadmium Stress in Rice: An *in silico* Answer. *Frontiers in Plant Science*. 2019. Vol. 9. P. 1948.
- Vachirapatama N., Jirakiattikul Y., Dicoski G., Townsend A.T., Haddad P.R. Effect of vanadium on plant growth and its accumulation in plant tissues. *Songklanakar Journal of Science and Technology*. 2011. Vol. 33, No. 3. P. 255–261.
- Larsson M.A., Baken S., Gustafsson J.P., Hadialhejazi G., Smolders E. Vanadium bioavailability and toxicity to soil microorganisms and plants. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2013. Vol. 32, No. 10. P. 2266–2273.
- Yang J., Wang M., Jia Y., Gou M., Zeyer J. Toxicity of vanadium in soil on soybean at different growth stages. *Environmental Pollution*. 2017. Vol. 231. P. 48–58.
- Ismail H., Dilshad E., Waheed M.T., Mirza B. Transformation of Lettuce with rol ABC Genes: Extracts Show Enhanced Antioxidant, Analgesic, Anti-Inflammatory, Antidepressant, and Anticoagulant Activities in Rats. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2017. Vol. 181, No. 3. P. 1179–1198.
- Dilshad E., Ismail H., Haq I., Cusido R.M., Palazon J., Ramirez-Estrada K., Mirza B. Rol genes enhance the biosynthesis of antioxidants in *Artemisia carvifolia* Buch. *BMC Plant Biology*. 2016. Vol. 16, No. 1. P. 125.
- Dilshad E., Zafar S., Ismail H., Waheed M.T., Cusido R.M., Palazon J., Mirza B. Effect of Rol Genes on Polyphenols Biosynthesis in *Artemisia annua* and Their Effect on Antioxidant and Cytotoxic Potential of the Plant. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2016.
- Chandra S. Natural plant genetic engineer *Agrobacterium rhizogenes*: Role of T-DNA in plant secondary metabolism. *Biotechnology Letters*. 2012. Vol. 34, No. 3. P. 407–415.
- Xiao X. yuan, Wang M. wei, Zhu H. wen, Guo Z. hui, Han X. qing, Zeng P. Response of soil microbial activities and microbial community structure to vanadium stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2017. Vol. 142. P. 200–206.
- Drobot K.O., Matvieieva N.A., Shakhovskiy A.M. Features of *Agrobacterium rhizogenes*-mediated genetic transformation of *Artemisia vulgaris* L., *Artemisia annua* L. and *Ruta graveolens* L. medicinal plants. *Factors in experimental evolution of organisms*. 2016. Vol. 19. P. 117–120.
- Murashige T., Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962. Vol. 15, No. 3. P. 473–497.
- Agostini E., Talano M.A., González P.S., Oller A.L.W., Medina M.I. Application of hairy roots for phytoremediation: What makes them an interesting tool for this purpose? *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013. Vol. 97, No. 3. P. 1017–1030.
- Ontacon O.M., González P.S., Ambrosio L.F., Paisio C.E., Agostini E. Rhizoremediation of phenol and chromium by the synergistic combination of a native bacterial strain and *Brassica napus* hairy roots. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 2014. Vol. 88. P. 192–198.
- Subroto M.A., Priambodo S., Indrasti N.S. Accumulation of zinc by hairy root cultures of *Solanum nigrum*. *Biotechnology*. 2007. Vol. 6, No. 3. P. 344–348.

**MATVIEIEVA N. A.<sup>1,2</sup>, GAVRYLIUK O. A.<sup>2</sup>, DUPLIJ V. P.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of the NASU, Ukraine, 03143, Kyiv, Acad. Zabolotnogo str., 148*

<sup>2</sup> *Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the NASU, Ukraine, 03143, Kyiv, Acad. Zabolotnogo str., 154*

### **EFFECT OF VANADIUM (IV) ON THE GROWTH OF *ARTEMISIA TILESII* LEDEB. “HAIRY” ROOT CULTURE**

**Aim.** Determination of the effect of toxic metals on plants is of considerable interest, since contamination of the environment with toxicants is a threat to the safety of agriculture and human health. Vanadium increased content in soil leads to the suppression of plant growth. The aim of the work was to determine the peculiarities of the influence of V(IV) (neutral solution [V<sup>4+</sup> cit]) on *Artemisia tilesii* Ledeb plants in the *in vitro* model system and to compare this effect on the growth of “hairy” root culture and plants. **Methods.** Plant shoots and transgenic roots were cultivated on a solidified Murashige and Skoog medium with V(IV) at 1, 5, 10, 50 and 100 mg/L. Mass increase was measured after 4 weeks. **Results.** It was found that V(IV) at 50 mg/L concentration completely inhibited root formation and led to shoot death. Transgenic roots survived even at 100 mg/L of vanadium. **Conclusions.** The results of the work demonstrated that *A. tilesii* “hairy” roots were characterized by greater resistance to V(IV) than control plants. In addition, differences in the sensitivity of different root lines to this compound were detected. This fact probably could be explained by the transformation, the transfer of agrobacterial genes, and changes in the secondary metabolism in transgenic roots. **Keywords:** vanadium(IV), *Artemisia tilesii* Ledeb., “hairy” root culture.