

ВПЛИВ ДЖЕРЕЛА АЗОТУ НА СИНТЕЗ ВТОРИННИХ МЕТАБОЛІТІВ СУСПЕНЗІЙНОЮ КУЛЬТУРОЮ СПАРЖІ ЛІКАРСЬКОЇ *ASPARAGUS OFFICINALIS* L.

А.О. СКУБА¹, А.Ф. ЛІХАНОВ¹, Л.М. БУЦЕНКО², Ю.В. КОЛОМІЄЦЬ¹

¹ Національний університет біоресурсів і природокористування України
03041, Україна, Київ, вул. Героїв Оборони, 15

² Національний університет харчових технологій
01033, Україна, Київ, вул. Володимирська, 68
E-mail: julyja12345@gmail.com

Спаржа лікарська містить унікальні сполуки, що можуть зупиняти розвиток ракових пухлин та навіть знищувати онкологічні клітини. Проте, до сьогодні недостатньо відомостей про особливості біосинтезу цих сполук та умови їх одержання. В наведеній роботі досліджено вплив джерела неорганічного азоту на ріст суспензійної культури спаржі лікарської, накопичення фенольних сполук в культурі та культуральній рідині, а також синтез сапонінів. Отримано калюсну та суспензійну культуру спаржі лікарської (*Asparagus officinalis* L.) в умовах *in vitro*. Для проведення подальших досліджень підібрано концентрації регуляторів росту 1 мг/л кінетину та 1,5 мг/л 2,4-Д. Найбільш швидкий ріст суспензійної культури встановлено на середовищі з концентрацією калій нітрату 1900 мг/л та амоній сульфату 250 мг/л. Окремі експлантати демонстрували спонтанну диференціацію калюсної тканини, що впливала на приріст маси калюсу та співвідношення концентрації екзофенолів до загальної маси експлантата. Найвищі концентрації ендо- та екзофенолів отримано на середовищі без джерел амонійного азоту. Визначено позитивний вплив середовища з концентрацією амоній сульфату 500 мг/л на синтез основних стероїдних сапонінів спаржі лікарської. В результаті проведеного дослідження розроблено модифіковане середовище МС, що сприяє накопиченню стероїдних сапонінів у суспензійній культурі спаржі лікарської.

Ключові слова. Спаржа лікарська, суспензійна культура, біологічно активні речовини, феноли, стероїдні сапоніни, джерело азоту.

Вступ. Сьогодні дослідницький інтерес до лікарських рослин фокусується на індивідуальних біологічно-активних речовинах (БАР), що проявляють фармакологічний ефект (Pachua et al, 2021). Наприклад, спаржа лікарська (*Asparagus officinalis* L.) досліджується як дже-

рело харчових волокон, вітамінів, сульфурвмісних сполук, фенолів, сапонінів. Пагони спаржі багаті антиоксидантами, такими як поліфеноли, флавоноїди та аскорбінова кислота, а також амінокислотами, тоді як коріння традиційно використовуються як лікарський продукт, головним чином через накопичення в них сапонінів, фруктанів і флавоноїдів (Döll et al, 2021). Стероїдні сапоніни відіграють важливу роль у біологічній та фармакологічній активності різних видів спаржі. Основними сапонінами, присутніми в більшості зелених і білих комерційних сортів (*Asparagus officinalis* L.), є аспаранін А, протодіосцин, сарсасапогенін і ямогенін (Pegiou et al, 2020). Широко проводяться дослідження щодо впливу стероїдних сапонінів спаржі на злоякісні пухлини (Hildah Mfengwana et al, 2020). Встановлено, що аспаранін А викликає цитотоксичну дію, апоптоз у клітинах гепатоми людини, раку товстої кишки, раку підшлункової залози, карциноми печінки, ендометріальної карциноми *in vitro* та *in vivo* (Ji et al, 2012; Jaramillo et al, 2016; MarElia et al, 2018; Yumi et al, 2019). Точна мішень аспараніну А досі не встановлена. Нею можуть виступати PI3K/AKT/mTOR та мітохондріальний шляхи, а також можуть бути задіяні цикліни в таких критичних точках клітинного циклу, як G₂/M чи G₀/G₁ (Liu et al, 2009; Zhang et al, 2020).

Попри вражаючу протиракову ефективність аспараніну А, лікарських засобів на його основі досі не розроблено. Для цього необхідне отримання високоякісної, стандартизованої, багатої на цільову сполуку сировини (Pachua et al, 2021). Оскільки спаржа є багаторічною рослиною, зазвичай потрібно близько трьох років, щоб спаржа, вирощена з насіння, була готова до збору врожаю. Таким чином, використання

калюсу або суспензійної клітинної лінії, отриманої із зеленої спаржі, для отримання аспараніну А є ефективним в часі за великомасштабного вирощування (Nakabayashi et al, 2019). Перевагами цього методу є незалежність від умов довкілля, чистота культури від мікроорганізмів, можливість багатотонажного виробництва, відносна простота екстракції цільових речовин (Encina et al, 2022).

Ключовим для регуляції синтезу вторинних метаболітів культурою рослинних клітин є розуміння біохімічних механізмів цього процесу. Феноли, якими особливо багаті сорти фіолетової спаржі, синтезуються через фенілпропаноїдний шлях (Guo et al, 2020; Kumar et al, 2023). Його активність, значною мірою, залежить від концентрації феніلالаніну, що пов'язана із загальною забезпеченістю рослини азотом (Fritz et al, 2006). З іншого боку, біосинтез похідних терпену стероїдних сапонінів може відбуватися двома шляхами, переважаним з яких є мевалонатний, хоча у пластидах функціонує метилеритріол-4-фосфатний (Upadhyay et al, 2018).

Нітроген не лише є головним макроелементом для рослини, а й бере участь в регуляції вторинного метаболізму (Asim et al, 2020). Зокрема, показано, що нітрат знижує активність ферментів ядра фенілпропаноїдного шляху PAL, C₄H, 4CL та усіх ферментів синтезу антоціанінів (Saad et al, 2018), тому керування біосинтезом сполук вторинного обміну за допомогою зміни джерела азоту є актуальним завданням біотехнології. Метою роботи було вивчити вплив нітратної та амонійної форм азоту на накопичення фенолів та сапонінів рідкою калусною культурою спаржі лікарської *Asparagus officinalis* L.

Матеріали та методи. В дослідженні використано спаржу лікарську *Asparagus officinalis* L. сорту «Erasmus» («Bejo Zaden», Нідерланди). Сорт відноситься до різновиду фіолетової спаржі лікарської. Оскільки спаржа є дводомною і чоловічі особини більш економічно вигідні, усі рослини даного сорту були чоловічими. Ізольована культура *in vitro* була отримана з насіння спаржі лікарської, стерилізованого 70%-ним водним розчином етанолу впродовж 1 хв та 0,75%-ним водним розчином гіпохлориту натрію впродовж 30 хв з наступним проми-

ванням тричі у дистильованій воді (Kolomiets et al, 2021). Асептичні умови створювались за загальноприйнятими методиками (Kolomiets et al, 2021). Для одержання ізольованої культури використано середовище Мурасіге-Скуга (МС) (Murashige et al, 1962) з половинним вмістом мікро- та макроелементів, збагачене 2 мг/л 6-бензиламінопурину (БАП). Через місяць культивування верхівки пагонів розміром 1–2 см пасирували для мікроклонального розмноження на середовище МС, збагачене 1 мг/л кінетину, або 1 мг/л індолілмасляної кислоти (ІМК) та 1 мг/л БАП, або 0,1 мг/л нафтилоцтової кислоти (НОК) та 0,5 мг/л БАП (Kolomiets et al, 2021). Рослинний матеріал культивувався у світловій кімнаті за температури $+26 \pm 2$ °С, відносної вологості повітря 60–70 % та 16-годинного фотоперіоду.

Калус, що спонтанно утворювався під час мікроклонального розмноження, використовували для подальших досліджень. Для напрацювання калусної культури використовували калусогенні середовища на основі МС. У першому варіанті середовище було збагачено 1 мг/л кінетину та 1,5 мг/л 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти (2,4-Д) (Pontaroli et al, 2005). Друге середовище, запропоноване нами, містило 0,1 мг/л БАП та 1 мг/л ІМК. Ефективність середовищ оцінювали візуально за рівнем дедиференціації калусу.

Для отримання цільових сполук було розроблено умови культивування спаржі лікарської в суспензійній культурі. На основі проведеного аналізу даних щодо основних живильних середовищ, було враховано, що частка амонійного азоту в широкоживаних лабораторних середовищах коливається від 0 % (середовища Вайта (Ahmad et al, 2018), Табачника-Кестера) до 51 % (середовище Мореля) (Kolomiets et al, 2021). Концентрації амонію було підібрано в цьому діапазоні так, щоб за можливості репрезентувати максимум співвідношень між амонійною та нітратною формами азоту. Амонійний азот додають до середовища у формах амоній нітрату, амоній сульфату та амоній фосфату. Для модифікування середовища МС було обрано амоній сульфат. Завдяки цьому одержано необхідні концентрації амонію не перевищуючи допустимих меж вмісту сульфат-йону. Такі середовища не пригнічували ріст культури че-

рез нестачу чи надлишок мінеральних поживних елементів. Досліджені середовища наведено в таблиці, де за контроль обрано стандартне середовище МС. Для підтримання дедиференціації калюсу застосовано 1 мг/л кінетин та 1,5 мг/л 2,4-Д. Дослід здійснено в трьохразовій повторності.

Суспензійну культуру одержували в колбах Ерленмейера з 30 мл живильного середовища. Фрагменти отриманого калюсу за мінімального пошкодження масою $0,74 \pm 0,21$ г переносили в колби з подальшим культивуванням у світловій кімнаті за тих самих умов, що і вихідний матеріал при постійному перемішуванні 80 об/хв на качалці. Через 7 діб калюс повторно зважували та використовували для визначення вторинних метаболітів. Для отримання екстрактів 100 мг калюсу піддавали мацерації і заливали 80 % метанолом ($v/v - 1/10$). Екстракцію проводили 12 год у темноті за кімнатної температури. Після цього суспензію центрифугували 10 хв (9000 об/хв), а надосадову рідину переносили в чисту пробірку. Отримані зразки зберігали в морозильній камері за -20°C .

З кожного варіанту обрано один типовий екземпляр калюсу, з якого брали шматочок морфогенної та неморфогенної тканини і поміщали в 100 мкл 0,1 М хлоридної кислоти (HCl). Мацерацію проводили в термостаті «Терміт» за 60°C впродовж 5 хв для неморфогенного калюсу та 10 хв для морфогенного. Відмивали від хлоридної кислоти дистильованою водою. Автофлуоресценцію калюсних клітин досліджували на давлених препаратах за допомогою системи багатоканальної флуоресцентної візуалізації (EVOS FL System, «Thermo Fisher Scientific», США) з використанням світ-

лофільтрів DAPI ($\lambda_{\text{exc}} = 357/44$ нм; $\lambda_{\text{em}} = 447/60$ нм), GFP ($\lambda_{\text{exc}} = 482/25$ нм; $\lambda_{\text{em}} = 524/24$ нм) та Texas Red ($\lambda_{\text{exc}} = 585/29$ нм; $\lambda_{\text{em}} = 628/32$ нм).

Біохімічне профілювання метанольних екстрактів калюсних тканин спаржі виконано методом високоефективної тонкошарової хроматографії (ВЕТШХ) на пластинках з силікагелем G60 («Merck», Німеччина). Розділення стероїдних сапонінів проводили в системі розчинників хлороформ-оцтова кислота-метанол-вода ($v/v/v/v - 60 : 32 : 12 : 8$). Для виявлення сапонінів хроматограму обробляли реагентом на основі анісового альдегіду з наступним нагріванням пластинки 5 хв за температури 105°C . Коефіцієнти утримання індивідуальних сполук (Rf) на хроматограмі визначали фотоденситометрично за використання комп'ютерної програми Sorbfil TLC Videodensitometer ver. 2.3.0. 2994 (JSC Sorbopolymer).

Визначення вмісту розчинних фенолів проводили за методом Фоліна і Чікольтеу в модифікації Синглтона і Россі (Singleton et al, 1965). В реакційні пробірки вносили 100 мкл досліджуваного екстракту чи культурального середовища та 500 мкл розведеного реактиву Фоліна-Чікольтеу. Через 3 хв додавали 400 мкл розчину карбонату натрію (75 г/л), для контролю екстракт замінювали дистильованою водою. Реакційну суміш добре перемішували та залишали на 2 год за кімнатної температури для проведення реакції. Потім розчин переносили в мікрокувети товщиною 10 мм та вимірювали оптичну густину при довжини хвилі 765 нм на однопроменевому UV-Vis-спектрофотометрі Optizen POP (Південна Корея). Концентрацію визначали за калібрувальним графіком.

Концентрація форм азоту в середовищах для суспензійного культивування спаржі лікарської (мг/л)

Варіант	МС	0	1	2	3	4
NH_4NO_3	1650	—	—	—	—	—
KNO_3	1900	1900	1900	1900	1900	1900
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	—	—	250	500	750	1000
NO_3^-	2445,4	1166,6	1166,6	1166,6	1166,6	1166,6
NH_4^+	371,3	—	68,2	136,4	204,6	272,7
N	1985,8	922,8	938,1	953,5	968,9	922,8
Частка NH_4^+	13 %	0 %	6 %	10 %	15 %	19 %

Статистичну обробку даних виконували в середовищі Jupyter Notebook мови програмування Python. Для оцінки значущості впливу типу калюсу та складу живильного середовища на досліджувані параметри застосовували двохфакторний дисперсійний аналіз (two-way ANOVA). Пост-хок тест Тьюкі був використаний для визначення різниці між групами. Кореляційний аналіз проведено з використанням критерію кореляції Пірсона. Дані на графіках наведені у вигляді стандартної похибки (SE). На рисунках рівень значущості позначено $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ у порівнянні з контролем.

Результати дослідження. Оскільки дана робота присвячена дослідженню впливу джерела азоту на параметри росту суспензійної культури спаржі лікарської, було, зокрема, вивчено характер росту та диференціації культури тканин, накопичення фенолів та сапонінів.

Для одержання культури калюсу було використано 2 живильних середовища МС, збагачених різними комбінаціями регуляторів росту. На обох середовищах 60–65 % експлантатів формували калюсні структури (рис. 1). Відповідно до рекомендацій Mishiba et al, Raimondi et al в подальших експериментах використано середовище з 1 мг/л кінетину та 1,5 мг/л 2,4-Д в якості регуляторів росту (Raimondi et al, 2001; Mishiba et al, 2006).

Отриманий калюс пасирували на рідке живильне середовище з різним вмістом азоту у нітратній та амонійній формах. Аналіз результатів культивування проведено через 7 діб (рис. 2). Було встановлено спонтанний перехід до диференціації у частини експлантатів, причиною чого могла бути дія фітогормонів, що накопичилися в культурі протягом попередніх культивувань. З іншого боку, між початковою масою калюсу та диференціацією встановлена слабка, але достовірна кореляція 0,486, $p < 0,05$.

Результати проведеного двофакторного дисперсійного аналізу свідчать про те, що і джерело азоту, і ступінь диференціації калюсу істотно впливають на приріст біомаси спаржі лікарської (рис. 3). Маса неморфогенного калюсу збільшувалась на 19–51 %, морфогенного – на 50–100 %. Експлантати, що мали зачатки диференційованих структур мали приріст маси від 28 до 99 % і статистично не відрізнялись від інших груп. Встановлено статистично значиму кор-

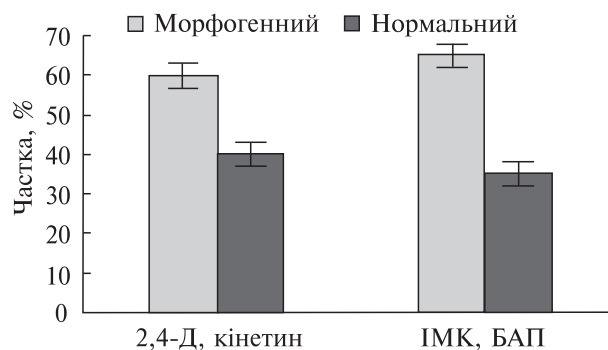


Рис. 1. Вплив регуляторів росту на розвиток калюсу спаржі лікарської

ляцію приросту маси та типу калюсу середньої сили 0,647, $p < 0,01$.

Найбільший приріст біомаси 99,5 % спостерігали за умов додавання 250 мг/л амоній сульфату. У варіантах з 500 мг/л та 1000 мг/л амоній сульфату отримано значення 55 і 53 % відповідно. Дещо менший приріст біомаси 47 % спостерігали на середовищі без відновлених форм азоту. Середовище з 750 мг/л амоній сульфату достовірної відмінності з контролем не мало.

Мікроскопічний аналіз показав, що в неморфогенних калюсах, які було отримано на живильному середовищі (0) без додавання $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ клітини були оводнені (частково вітрифіковані) і мали переважно ізодіаметричну форму 30–120 мкм в діаметрі (рис. 4, г–е). У протопластах цих клітин виявлені чисельні вклучення, ймовірно поліфенольної природи, з інтенсивною автофлуоресценцією в синьому, зеленому і червоному спектрах.

Калюси, які були вирощені на середовищі, що містило 750 мг/л $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (3) були більш компактними, щільними. Значна частина клітин мала прозенхімну форму. Ці клітини перетворювались на гідроцити (трахеїдоподібні елементи), які втратили здатність до проліферації. Їх лігніфіковані клітинні стінки мали яскраву автофлуоресценцію (рис. 4, а–в)

Джерело азоту є істотним фактором, що впливає на синтез фенолів суспензійною культурою спаржі лікарської. Концентрація фенолів у живильному середовищі була найвищою 2,07 мг/м у випадку наявності лише нітратної форми (рис. 5). Збільшення концентрації амонію пригнічувало виділення фенолів у середовище у порівнянні з контрольним середовищем

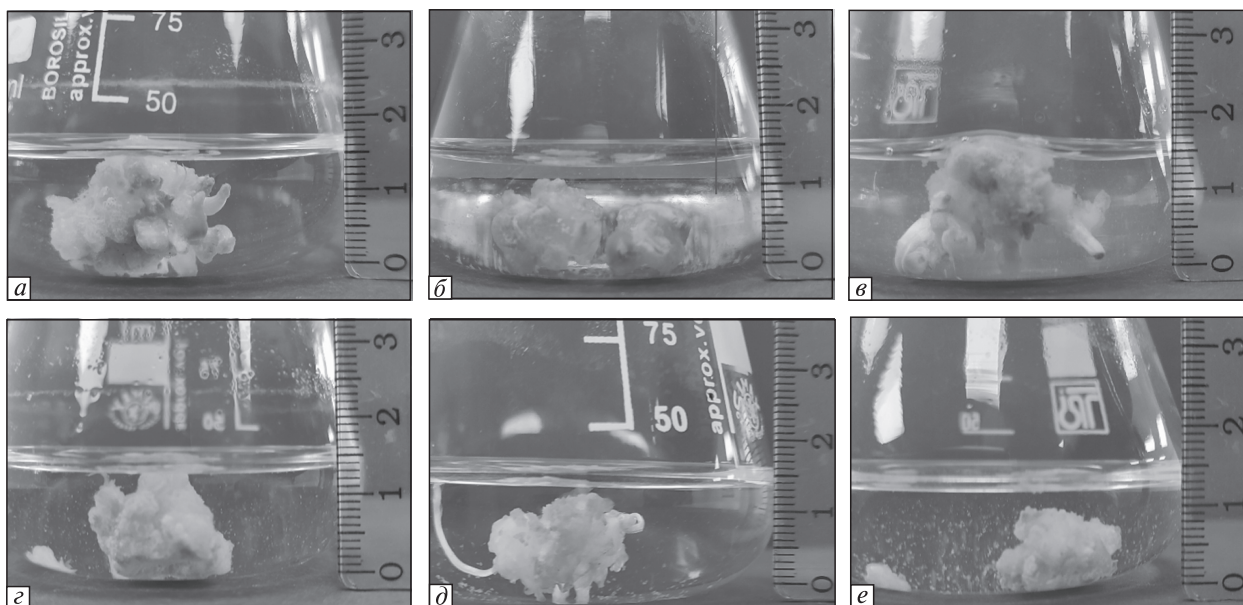


Рис. 2. Калюсна культура спаржі лікарської після 7 діб культивування на рідкому живильному середовищі: *a–d* – середовища 0–5 відповідно, *e* – середовище МС (контроль)

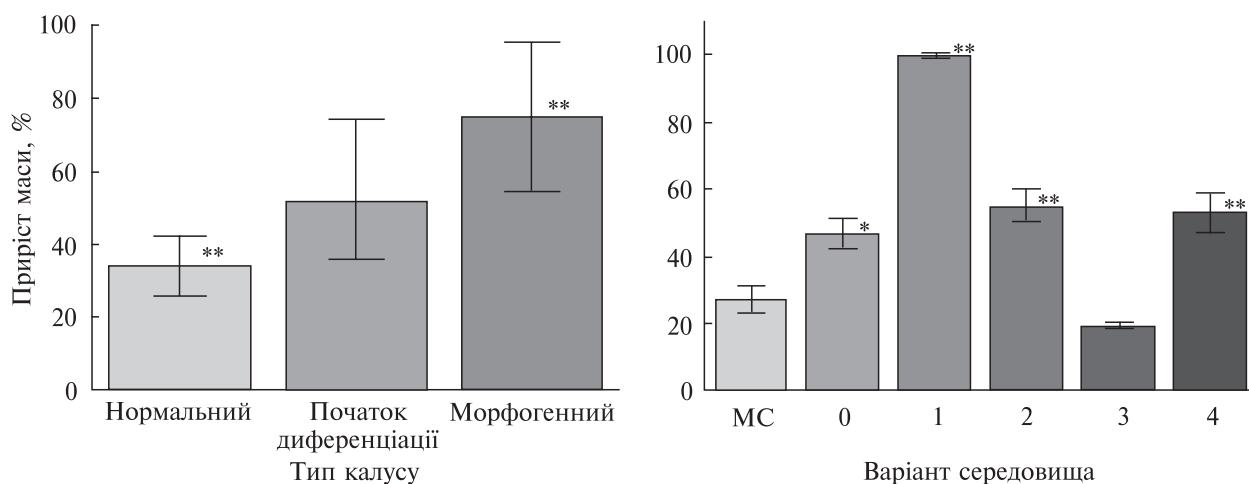


Рис. 3. Вплив типу калусу спаржі лікарської (*a*) та джерела азоту (*б*) на приріст маси

МС 2,03 мг/л. На середовищах 3 і 4 отримано 1,25 та 1,09 мг/мл екзофенолів відповідно. Визначено помірну кореляцію вмісту нітрату в живильному середовищі та концентрації екзо-метаболітів 0,578, $p < 0,01$.

Співвідношення між концентрацією екзо-метаболітів до маси калусу було найвищим (2,46) на середовищі без амонійного азоту і на 60 % перевищувало контроль (рис. 6). За умов додавання амонію до середовища спостерігали різ-

кий спад до 0,99 на середовищі 1. За подальшого збільшення концентрації сульфату амонію досліджуваний показник коливався від 1,07 на середовищі з 1000 мг/л амоній сульфату до 1,66 на середовищі з 500 мг/л амоній сульфату.

Концентрація фенолів в калюсних тканинах підвищувалась на середовищі без амоній сульфату та за вмісту цієї сполуки 250 та 750 мг/л до концентрації 5,32; 4,47 та 6,23 мг/л відповідно (рис. 5). В інших середовищах виявлено

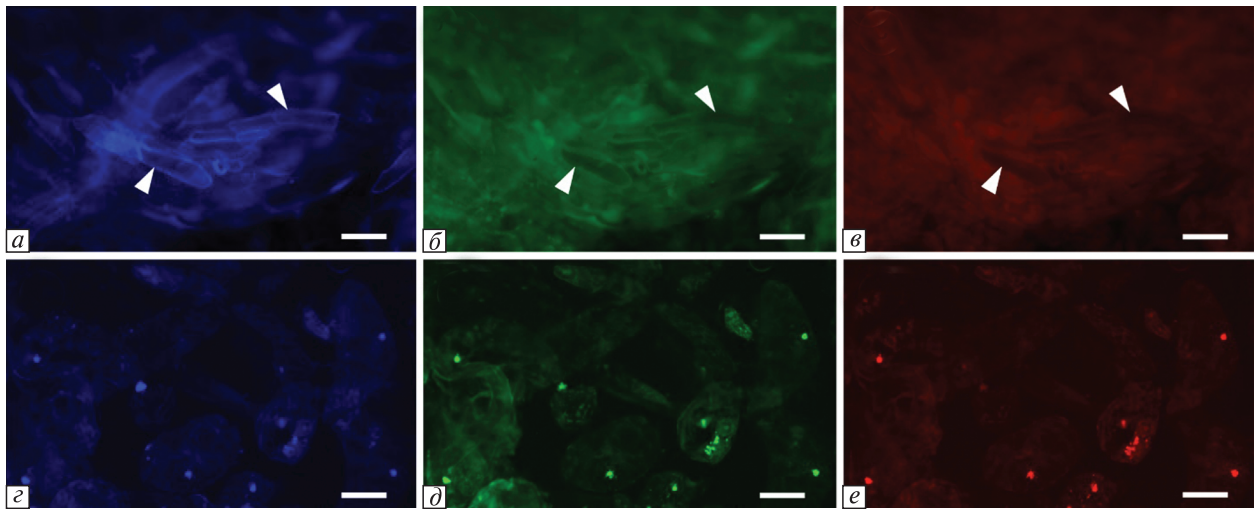


Рис. 4. Прозенхімні клітини калюсу спаржі, які перетворюються на трахеїдоподібні елементи – ЖС № 3 (а–в) та крупні ізодіаметричні оводнені клітини калюсу ЖС № 0 (г–е) у спектрах $\lambda_{\text{ем}} = 447/60$ нм (а, г), $\lambda_{\text{ехс}} = 482/25$ нм; $\lambda_{\text{ем}} = 524/24$ нм (б, д) та $\lambda_{\text{ехс}} = 585/29$ нм; $\lambda_{\text{ем}} = 628/32$ нм (в, е); планка – 50 мкм

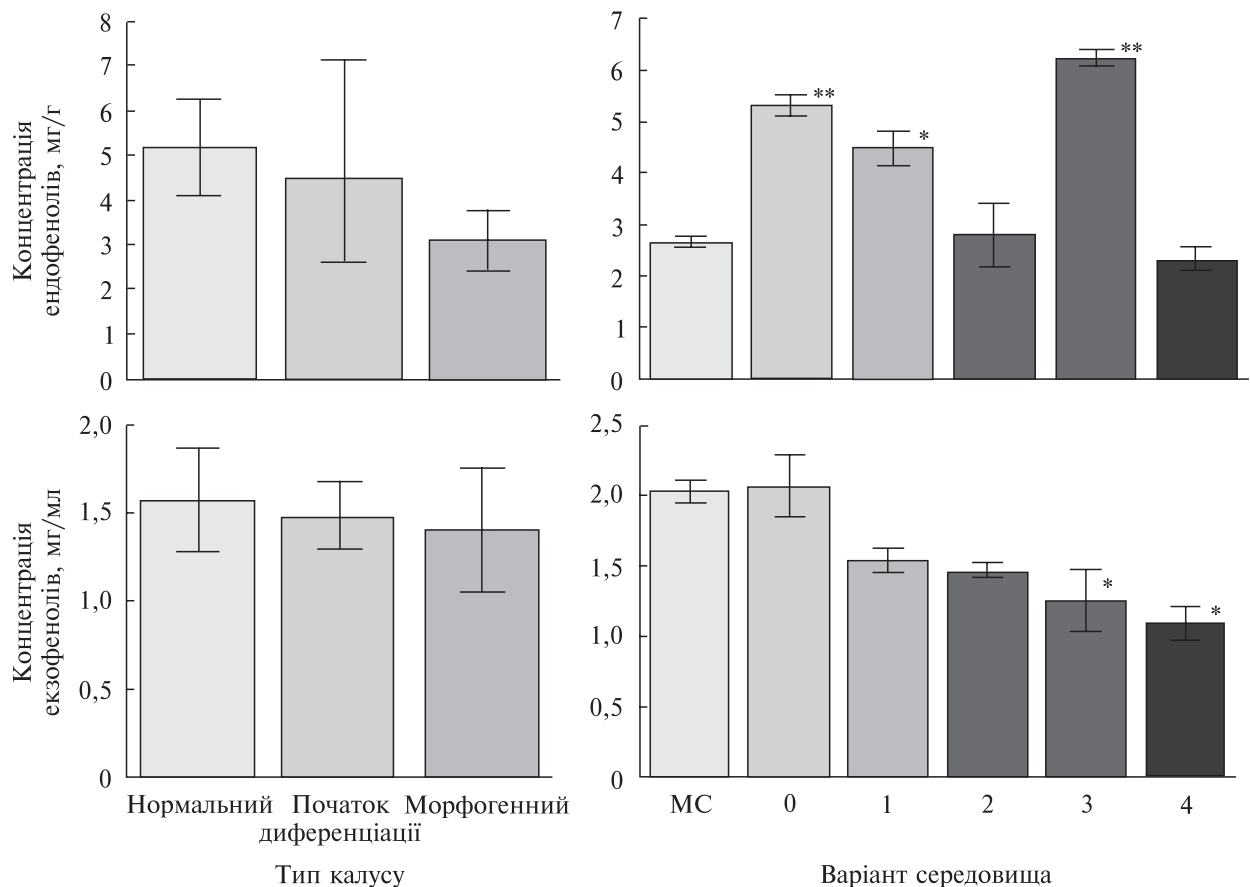


Рис. 5. Вплив диференціації калюсу спаржі лікарської (а, в) та складу середовища (б, г) на концентрацію ендифенолів (а, б) та екзофенолів (в, г) в культуральному середовищі

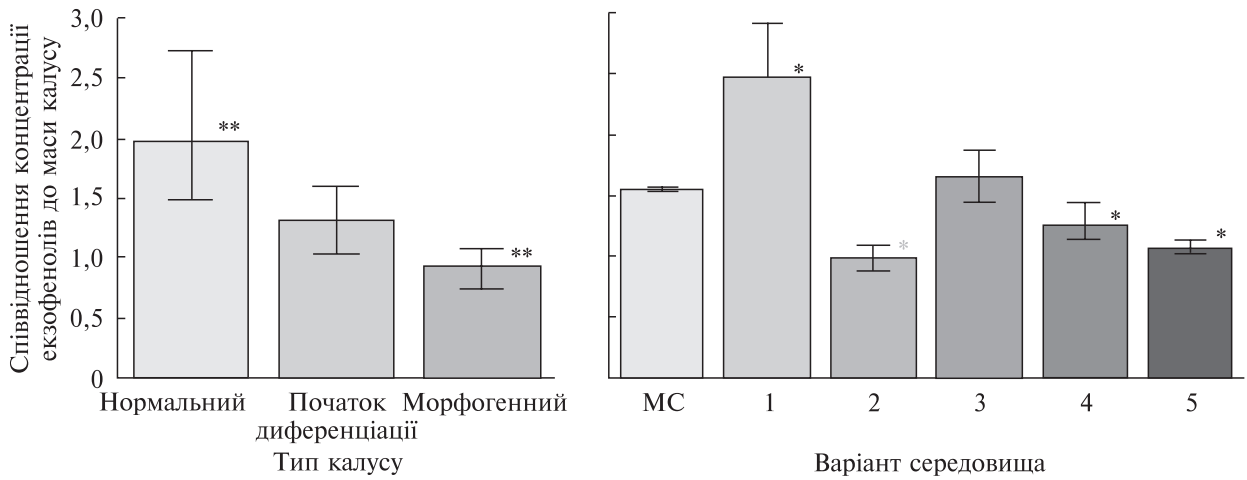


Рис. 6. Вплив диференціації калюсу спаржі лікарської (а) та складу середовища (б) на співвідношення концентрації екзофенолів до маси калюсу

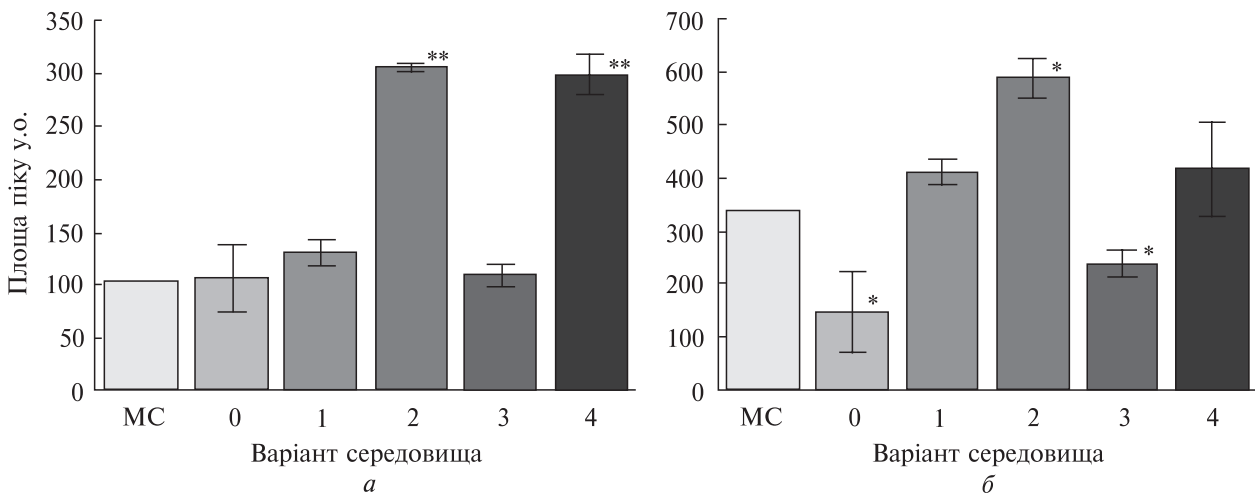


Рис. 7. Площа основних хроматографічних піків 1 (а) і 2 (б) сапонінів спаржі лікарської залежно від складу живильного середовища

синтез ендоефенолів на рівні контролю. Диференціація калюсу сприяла зменшенню співвідношення між екзофенолами та масою калюсу. У морфогенного калюсу цей показник становив 0,71–1,13, а в нормального 1,26–3,84.

Під час дослідження вмісту сапонінів в калюсних культурах спаржі методом вискоєфективної тонкошарової хроматографії встановлено присутність двох основних піків з коефіцієнтами утримання (R_f) 0,24 і 0,38. Найбільша площа першого піку була отримана на середовищах 2 і 4, які містять 500 та 1000 мг/л амоній сульфату (рис. 7). Калюс, що вирощувався на інших се-

редовищах, не показав відмінності з контролем. Найбільший пік другого сапоніну спостерігали також на середовищі 2, а концентрація амоній сульфату 750 мг/л та відсутність амонійних форм азоту пригнічували синтез цієї сполуки. Між величиною піків 1 і 2 встановлена помірна кореляція (0,672, $p < 0,01$). Також спостерігали два додаткові піки з коефіцієнтами утримання $R_f \sim 0,46$ та 0,54 відповідно. Синтез міночних сапонінів в концентраціях, які можливо було детектувати відбувався лише на середовищах 2 і 3, а також сапоніну з $R_f \sim 0,54$ на контрольному середовищі МС.

Встановлено негативну кореляцію між концентрацією екзофенолів та площею 1-го піку на денситограмі на рівні $-0,846$, $p < 0,01$. Взаємодія між цими показниками, можливо, свідчить, що стероїдні сапоніни як амфифільні та поверхнево-активні сполуки змінюють проникність клітинних мембран та полегшують переміщення фенолів між компартментами та їх секрецію.

Обговорення. Зростаючі потреби в розробці нових лікарських засобів для лікування раку розкривають широкі перспективи для одержання вторинних метаболітів спаржі лікарської в культурі *in vitro*. В цьому аспекті вплив джерела азоту в складі живильного середовища на приріст калюсної маси і синтезу БАР має особливе значення.

Синтез фенольних сполук у неморфогенному калюсі є необхідним для формування вторинних клітинних стінок, а також як компонент антиоксидантної системи клітин. Вже на першій стадії диференціації клітин у калюсних тканинах з'являються гідроцити (або трахеїдоподібні елементи), які мають кільчасте або спіральне потовщення клітинних стінок. У морфогенних калюсах кількість таких клітин зростає. Трахеїдоподібні елементи прискорюють латеральний перенос макро- і мікроелементів, а також цукрів з живильного середовища у глибокі внутрішні шари калюсної тканини. Частка зв'язаних з клітинними стінками і структурованих поліфенолів, які входять до складу лігнінів у морфогенному калюсі також росте. Це підтверджує яскрава автофлуоресценція клітин у блакитному спектрі (рис. 4, а). Основний ефект інтенсивної автофлуоресценції пов'язаний саме з лігніном, який обумовлює здерев'яніння клітин. Інші полісахаридні компоненти клітинної стінки мають відносно менший внесок в інтенсивність флуоресценції (Donaldson et al, 2010).

Основними фенольними мономерами, що входять у склад лігніну спаржі є р-кумарова кислота і ферулова кислота. У дещо меншій кількості виявлено ванілін, ванілінову кислоту, 4-гідроксибензойну кислоту та 4-гідроксибензальдегід (Schäfer et al, 2016). Про зв'язок між вмістом фенольних сполук і активністю процесів диференціації клітин свідчать показники співвідношення концентрації екзофенолів до маси калюсу (рис. 6). Відкладання лігніну, як нерегулярного поліфенілпропаноїдного по-

лімеру, залежить від синтезу компонентів лігніну і активності ферментів, які забезпечують їхню полімеризацію. Крім того на швидкість відкладання лігніну в клітинах спаржі впливає концентрація кисню (Pu et al, 2023) та режим освітленості (Ma et al, 2023). У рослин спаржі за умов затінення знижується вміст коричної кислоти, кавової кислоти, ферулової кислоти та синапілового спирту, що призводить до зниження в клітинах вмісту лігніну (Ma et al, 2023).

У процесі культивування калюсних тканин *in vitro* частина продуктів фенольного синтезу виділялась у живильне середовище. Кількість таких екзометаболітів обернено залежала від концентрації сульфату амонію. Цей зв'язок вказує на те, що дефіцит нітрогену стимулює накопичення в клітинах продуктів фенілпропаноїдного синтезу. Така специфіка метаболізму рослин можливо пов'язана з тим, що у природних умовах феноли, які потрапляють у ґрунт здатні зв'язуватись з білками і через це уповільнювати процеси вимивання нітрогену водою. Імобілізовані таким чином білки та інші азотовмісні речовини довше зберігаються у ризосфері і забезпечують ґрунтові мікроорганізми і рослини нітрогеном. Чіткий тренд до зменшення кількості екзофенолів за умов підвищення концентрації азоту в середовищі показана на рисунку 5. Також зменшення показника співвідношення концентрації екзофенолів до маси калюсу за умов збільшення у живильному середовищі кількості сульфату амонію вказує на те, що процеси диференціації клітин і утворення елементів провідної системи залежать від балансу живлення рослин нітрогеном.

Водночас, реакція рослин на зміну джерела та концентрації доступного азоту сильно варіює залежно від видових особливостей. Наприклад, ріст кукурудзи найбільш інтенсивний за умов присутності 5 mM NO_3^- або $2,5 \text{ mM NO}_3^- + 2,5 \text{ mM NH}_4^+$, а рослини, які жили лише NH_4^+ , показували найменший приріст біомаси коренів та листя (Prinsi et al, 2018). Рослини *Cyclocaria paliurus* гинули за вирощування на живильному розчині з амонієм в концентрації у перерахунку на азот 238 мг/л . Найбільш активний ріст спостерігався в умовах рівної кількості амонійного та нітратного азоту в середовищі (Qin et al, 2020). Суспен-

зійна культура нагідок лікарських *Calendula officinalis* швидко проліфувала на середовищі, де джерелом азоту є нітрат калію та едамін. З іншого боку, культури бородатих коренів цієї рослини найкраще росли на контрольному середовищі 1/2 МС або на середовищі лише з нітратом калію. Використання нітрату амонію пригнічувало ріст обох культур (Długosz et al, 2018).

Відомо, що нестача азоту у формі нітрату суттєво збільшує концентрацію більшості досліджених фенольних сполук тютюну *Nicotiana tabacum*, крім ферулової кислоти, лігніфікацію клітин, транскрипцію генів ядра фенілпропаноїдного синтезу *PAL1*, *C4H*, *4CL* (Fritz et al, 2006). Жоден з цих генів не активувався в мутантних рослинах Nia30(145), що мають ослаблену здатність відновлювати нітрат. У спаржі індукція синтезу фенолів на досліджених середовищах № 0 та № 1, можливо, пояснюється саме зниженим вмістом азоту та нітрату зокрема. В дослідженні Huang et al. продемонстровано, що джерело азоту впливає на накопичення фенольних метаболітів та транскрипційні профілі у чаю *Camellia sinensis* L. Варто зазначити, що амоній, як джерело азоту сприяв біосинтезу С-зв'язаних глікозидів, які є більш цінними для людини (Huang et al, 2018).

Для суспензійної культури нагідок лікарських лише тип експлантата був істотним, а склад середовища майже не впливав на накопичення сапонінів. Культура бородатих коренів *Calendula officinalis* продукувала сапоніни та виділяла їх в культуральне середовище в найбільшій мірі за відсутності амонійних форм азоту. Стандартне середовище 1/2 МС також показало високі результати (Długosz et al, 2018). Qin J et al показали, що синтез терпенів посилюється в стресових для рослин умовах. У рослинах *Cyclocaria paliurus* вищі концентрації терпенових сполук, що мають спільні шляхи синтезу із сапонінами, спостерігаються за присутності в середовищі або лише нітрату, або лише амонію. Аналогічні ефекти було отримано і для транскрипції ферментів мевалонатного та метилеритріол-4-фосфатного шляхів (Qin et al, 2020). В нашому дослідженні цей ефект не спостерігали, оскільки концентрації азотних сполук обрано в межах оптимальних.

Висновки. Таким чином, в роботі досліджено вплив різних джерел азоту на ріст калюсної культури спаржі лікарської (*A. officinalis* L.) та накопичення нею вторинних метаболітів. Вперше отримано калюсну та суспензійну культуру спаржі лікарської в умовах *in vitro* для синтезу вторинних метаболітів. Розроблено модифіковане середовище на основі МС з калій нітратом 1900 мг/л та амоній сульфатом 500 мг/л в якості джерел азоту, яке підвищує синтез двох основних сапонінів у 2,9 та 1,7 разів відповідно та сприяє синтезу міnorних сапонінів.

Дотримання етичних стандартів. Ця стаття не містить будь-яких досліджень за участю людей або тварин в якості об'єктів дослідження.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Фінансування. Це дослідження не отримувало будь-якого конкретного гранту від фінансуючих установ у державному, комерційному або некомерційному секторах.

EFFECT OF THE NITROGEN SOURCE ON THE SYNTHESIS OF SECONDARY METABOLITES BY SUSPENSION CULTURE OF MEDICINAL ASPARAGUS *ASPARAGUS OFFICINALIS* L.

A.O. Skuba, A.F. Likhanov,
L.M. Butsenko, Yu.V. Kolomiiets

National University of Life
and Environmental Sciences of Ukraine
National University of Food Technologies

E-mail: julyja12345@gmail.com

Garden asparagus contains unique compounds that can stop the development of cancerous tumors and even destroy cancer cells. However, there is still insufficient information about the features of the biosynthesis of these compounds and the conditions for their production. In this paper, the influence of an inorganic nitrogen source on the growth of a suspended culture of garden asparagus, the accumulation of phenolic compounds in the culture and culture liquid, as well as the synthesis of saponins is studied. A callus and suspension culture of garden asparagus *Asparagus officinalis* L. was obtained under *in vitro* conditions. For further studies, the concentrations of growth regulators 1 mg/l of kinetin and 1.5 mg/l of 2,4-D were selected. The fastest growth of the suspension culture was established on a medium with a concentration of potassium nitrate 1,900 mg/l and ammonium sulfate 250 mg/l. Individual explants

showed spontaneous differentiation of callus tissue, which affected the increase in the mass of callus and the ratio of the concentration of exo-phenols to the total mass of the explant. The highest concentrations of endo- and exo-phenols were obtained on a medium without ammonium nitrogen sources. A positive effect of a medium with an ammonium sulfate concentration of 500 mg/l on the synthesis of the main steroid saponins of *Asparagus officinalis* L. was determined. As a result of the study, a modified MS medium was developed that promotes the accumulation of steroid saponins in a suspension culture of garden asparagus.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Ahmad N, Rab A, Ahmad N (2018) Differential pH-Induced Biosynthesis of Steviol Glycosides and Biochemical Parameters in Submerge Root Cultures of *Stevia rebaudiana* (Bert.). *Sugar Tech* 20:734–744. <https://doi.org/10.1007/s12355-018-0589-z>
- Asim M, Ullah Z, Xu F, An L, Aluko OO, Wang Q, Liu H (2020) Nitrate Signaling, Functions, and Regulation of Root System Architecture: Insights from *Arabidopsis thaliana*. *Genes* 11(6):633. <https://doi.org/10.3390/genes11060633>
- Długosz M, Markowski M, Pączkowski C (2018) Source of nitrogen as a factor limiting saponin production by hairy root and suspension cultures of *Calendula officinalis* L. *Acta Physiol Plant* 40:35. <https://doi.org/10.1007/s11738-018-2610-2>
- Döll S, Djalali Farahani-Kofoet R, Zrenner R, Henze A, Witzel K (2021) Tissue-specific signatures of metabolites and proteins in asparagus roots and exudates. *Horticulture Research*, 8:86 <https://doi.org/10.1038/s41438-021-00510-5>
- Donaldson L, Radotić K, Kalauzi A, Djikanović D, Jeremić M (2010) Quantification of compression wood severity in tracheids of *Pinus radiata* D. Don using confocal fluorescence imaging and spectral deconvolution. *J Struct Biol* 169(1):106–115. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2009.09.006>
- Encina CL, Regalado JJ (2022) Aspects of In Vitro Plant Tissue Culture and Breeding of Asparagus: A Review. *Horticulturae* 8(5):439. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8050439>
- Fritz C, Palacios-Rojas N, Feil R, Stitt M (2006) Regulation of secondary metabolism by the carbon-nitrogen status in tobacco: Nitrate inhibits large sectors of phenylpropanoid metabolism. *Plant J* 46(4):533–548. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2006.02715.x>
- Guo Q, Wang N, Liu H, Li Z, Lu L, Wang C (2020) The bioactive compounds and biological functions of *Asparagus officinalis* L. – A review. *J Funct Foods* 65:103727. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103727>
- Hildah Mfengwana P-M-A, Sitheni Mashele S (2020) Medicinal Properties of Selected Asparagus Species: A Review. *Intech Open*. doi: 10.5772/intechopen.87048
- Huang H, Yao Q, Xia E, Gao L (2018) Metabolomics and Transcriptomics Analyses Reveal Nitrogen Influences on the Accumulation of Flavonoids and Amino Acids in Young Shoots of Tea Plant (*Camellia sinensis* L.) Associated with Tea Flavor. *J Agric Food Chem* 66(37):9828–9838. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01995>
- Jaramillo S, Muriana FJG, Guillen R, Jimenez-Araujo A, Rodriguez-Arcos R, Lopez S (2016) Saponins from edible spears of wild asparagus inhibit AKT, p70S6K, and ERK signalling, and induce apoptosis through G0/G1 cell cycle arrest in human colon cancer HCT-116 cells. *J Funct Foods* 26:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.07.007>
- Ji Y, Ji C, Yue L, Xu H (2012) Saponins Isolated from Asparagus Induce Apoptosis in Human Hepatoma Cell Line HepG2 Through a Mitochondrial-Mediated Pathway. *Curr Oncol* 19(11):1–9. <https://doi.org/10.3747/co.19.1139>
- Kolomiiets Yu, Skuba A (2021) Optimization of biotechnological process of clonal micropropagation *in vitro* of *Asparagus officinalis* L. *Biol Syst Theory Innov* 12(3):24–33. <https://doi.org/10.31548/biologiya2021.03.003>
- Kumar K, Debnath P, Singh S, Kumar N (2023) An Overview of Plant Phenolics and Their Involvement in Abiotic Stress Tolerance. *Stresses* 3:570–585. <https://doi.org/10.3390/stresses3030040>
- Liu W, Huang X-F, Qi Q, Dai Q-S, Yang L, Nie F-F, Lu N, Gong D-D, Kong L-Y, Guo Q-L (2009) Asparanin A induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 381(4):700–705. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.02.124>
- Ma J, Li X, He M, Li Y, Lu W, Li M, Sun B, Zheng Y (2023) A Joint Transcriptomic and Metabolomic Analysis Reveals the Regulation of Shading on Lignin Biosynthesis in Asparagus. *Int J Mol Sci* 24:1539. <https://doi.org/10.3390/ijms24021539>
- MarElia CB, Sharp AE, Shemwell TA, Zhang YC, Burkhardt BR (2018) *Anemarrhena asphodeloides* Bunge and its constituent timosaponin-AIII induce cell cycle arrest and apoptosis in pancreatic cancer cells. *FEBS Open Bio* 8(7):1155–1166. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12457>
- Mishiba KI, Tawada KI, Mii M (2006) Ploidy distribution in the explant tissue and the calluses induced during the initial stage of internode segment culture of *Asparagus officinalis* L. *Vitr Cell Dev Biol – Plant* 42(1):83–88. <https://doi.org/10.1079/IVP2005724>
- Murashige T, Skoog F (1962) A Revised Medium for

- Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant* 15(3):473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nakabayashi R, Nishizawa T, Mori T, Sudo H, Fujii I, Asano T, Saito K (2019) Producing the sulfur-containing metabolite asparaptine in *Asparagus* calluses and a suspension cell line. *Plant Biotechnol (Tokyo)*. 36(4):265–267. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.19.1002a>
- Pachua L, Laldinchhana Roy PK, Zothantluanga JH, Ray S, Das S (2021) Encapsulation of bioactive compound and its therapeutic potential. *Bioactive Natural Products for Pharmaceutical Applications* 140:687–714. https://doi.org/10.1007/978-3-030-54027-2_20
- Pegiou E, Mumm R, Acharya P, de Vos RCH, Hall RD (2020) Green and White Asparagus (*Asparagus officinalis*): A Source of Developmental, Chemical and Urinary Intrigue. *Metabolites* 10(1):17. <https://doi.org/10.3390/metabo10010017>
- Pontaroli AC, Camadro EL (2005) Somaclonal variation in *Asparagus officinalis* plants regenerated by organogenesis from long-term callus cultures. *Genet Mol Biol* 28(3):423–430. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572005000300015>
- Prinsi B, Espen L (2018) Time-course of metabolic and proteomic responses to different nitrate/ammonium availabilities in roots and leaves of maize. *Int J Mol Sci* 19(8):2022. <https://doi.org/10.3390/ijms19082202>
- Pu Y, Zhou Q, Yu L, Li C, Dong Y, Yu N, Chen X (2020) Longitudinal analyses of lignin deposition in green asparagus by microscopy during high oxygen modified atmosphere packaging. *Food Packaging and Shelf Life*. 25:100536. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2020.100536>
- Qin J, Yue X, Shang X, Fang S (2020) Nitrogen Forms Alter Triterpenoid Accumulation and Related Gene Expression in *Cyclocarya paliurus* (Batalin) Il-jinsk. Seedlings. *Forests* 11(6):631. <https://doi.org/10.3390/f11060631>
- Raimondi JP, Camadro EL, Babinec FJ (2001) Somatic embryogenesis in *Asparagus officinalis* L. cv. Argenteuil: interactions between genotype, explant type and growth regulators on callus induction, growth and embryogenic differentiation. *Biocell* 25(2):147–154. <https://doi.org/10.1007/s00000-005-5039-5>
- Schäfer J, Wagner S, Trierweiler B, Bunzel M (2016) Characterization of Cell Wall Components and Their Modifications during Postharvest Storage of *Asparagus officinalis* L.: Storage-Related Changes in Dietary Fiber Composition. *J Agric Food Chem* 64(2):478–486. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05575>
- Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Vitic.* 16(3):144–158. <https://doi.org/10.5344/ajev.1965.16.3.144>
- Upadhyay S, Jeena GS, Shikha, Shukla RK (2018) Recent advances in steroidal saponins biosynthesis and *in vitro* production. *Planta* 248(3):519–544. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2911-0>
- Yumi K, Kang-Hoon K, In-Seung L, Young PJ, Yun-Cheol N, Won-Seok C, Hyeung-Jin J (2019) Apoptosis and G2/M cell cycle arrest induced by a timosaponin A3 from *Anemarrhena asphodeloides* Bunge on AsPC-1 pancreatic cancer cells. *Phyto-medicine* 56:48–56. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.08.006>
- Zhang F, Zhang Y-Y, Sun Y-S, Ma R-H, Thakur K, Zhang J-G, Wei Z-J (2020) Asparanin A from *Asparagus officinalis* L. induces G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis in human endometrial carcinoma Ishikawa cells via mitochondrial and PI3K/AKT signaling pathways. *J Agric Food Chem* 68(1):213–224. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b07103>

Надійшла в редакцію 25.09.23

Після доопрацювання 15.10.23

Прийнята до друку 18.01.24