

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОБЪЕКТОВ КОЛЛЕКЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКИ ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КОРНЕЙ РАСТЕНИЙ В ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ И ПРИКЛАДНЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

И.Н. Кузовкина, М.Ю. Прокофьева

Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН, Москва, ikuz@mail.ru

В настоящем сообщении представлены результаты исследований, проведенных в последнее время с генетически трансформированными корнями растений (*hairy roots*) в культурах *in vitro*, которые поддерживаются в коллекции Института физиологии растений. *Hairy roots* лекарственного растения руты душистой были использованы при изучении пространственной организации вторичного метаболизма. Исследована закономерность распределения образующихся в корневых тканях вторичных соединений, а также уточнена роль так называемых «пограничных клеток» в установлении контактов корней растения с представителями ризосферы и в создании определенной для растения rhizodeposition. Проведены исследования с корнями ценного лекарственного исчезающего растения — шлемника байкальского. В условиях *in vitro* корни этого растения синтезируют типичные для него флавоны в количестве, сопоставимом с их содержанием в корнях целого растения. Один из флавонов корней шлемника — вогонин обладает селективной противоопухолевой активностью. Химический синтез вогонина не дал пока положительных результатов. В ходе исследований *hairy roots* шлемника байкальского была разработана определенная стратегия их культивирования в условиях биореактора, которая позволит создать новый биотехнологический способ получения вогонина, обладающего уникальной цитотоксической активностью.

Ключевые слова: генетически трансформированные корни (*hairy roots*), вторичные метаболиты, пограничные клетки корней (*root border cells*), rhizodeposition, флавоны, байкалин, вонозид, байкалеин, вогонин, β -глюкуронидаза, bioconversion.

Коллекция генетически трансформированных корней растений (КГТКР) Института физиологии растений (ИФР РАН) представляет собой собрание изолированно растущих в условиях *in vitro* корней растений, так называемых *hairy roots*, полученных в результате встраивания Т-ДНК Ri плазмиды диких штаммов *Agrobacterium rhizogenes* в геном растительной клетки (1, 2). Стимулом для создания коллекции послужил наблюдавшийся в 80-х годах прошлого столетия прогресс в технологии копирования в лабораторных условиях процесса встраивания Т-ДНК pRi, происходящего с растениями в естественных условиях. Проведение этих манипуляций в асептических условиях приводит, как правило, к проявлению ризогенеза в растительном экспланте, а последующее отделение образующихся в результате трансформации *hairy roots*, обеспечивает возможность их длительного и строго контролируемого культивирования. Первая *hairy root culture* лекарственного растения *Reganium harmala* была получена в ИФР РАН 25 лет тому назад (3), и к концу XX столетия количество введенных в культуру штаммов корней растений достигло 30. В 1999 году собрание полученных в результате трансформации *hairy roots* было официально оформлено в виде специализированной коллекции, которая была включена в состав Российской коллекции клеточных культур (РККК). К настоящему времени в состав коллекции входит 40 штаммов корневых культур, которые были иницированы от 26 видов двудольных растений, относящихся к 12 семействам. Основная часть культур была получена сотрудниками Группы специализированного метаболизма корней ИФР РАН.

Основное отличие культивируемых в условиях *in vitro* генетически трансформированных корней от растительных объектов, входящих в состав Всероссийской коллекции клеток высших растений ИФР РАН, состоит в том, что все *hairy roots* отлично растут в питательных средах с относительно простым составом компонентов, не содержащих экзогенные ростовые вещества, которые необходимы для культивирования не дифференцированно растущих клеток и тканей растений. Это отличие обеспечивает возможность использования введенных в культуру корней в качестве источников экологически чистого альтернативного сырья, которое потенциально способно восполнить дефицит обычно используемого в медицине и в пищевой промышленности растительного сырья корневого происхождения. Сохранение культивируемыми *in vitro hairy roots* морфологии корней с первичным типом роста (без роста за счет утолщения) приближает их по степени дифференциации к корням интактных растений, что обеспечивает возможность сохранения в них синтеза корнеспецифичных вторичных соединений, представляющих практический интерес.

Быстрый и стабильный рост введенных в культуру *hairy roots* сопровождается их интенсивным ветвлением. В результате масса корневых эксплантов к концу 4-ой недели роста в колбах с жидкой питательной средой увеличивается в 20—40 раз, и извлечение их из колб для проведения процедуры пассирования растительного материала с целью его сохранения и размножения требует определенных усилий при соблюдении полной стерильности. Малейшее нарушение асептики может привести к контаминации корневой культуры, от которой в ряде случаев бывает трудно избавиться. Убедившись в этом на собственном опыте, мы разработали специальную технологию, которая позволяет элиминировать случайно произошедшее инфицирование. Смысл ее состоит в проведении контаминированных бактериями инокулятов корней через так называемые искусственные семена (ИС), которые представляют собой небольшие фрагменты корневых окончаний (0,2—0,5 см), инкапсулированные в гелеподобный матрикс, содержащий альгинат натрия. Полученные в результате ИС сохраняют жизнеспособность при их выдерживании в течение нескольких месяцев в холодильнике при температуре около 4°C. Столь компактное и длительное хранение ИС делает возможным транспортировку корневых инокулятов на большие расстояния, например в другой город или страну. Добавление в матрикс ИС антибиотика (клафорана) обеспечивает эффективное избавление от бактериальной инфекции в результате локального воздействия антибиотика на небольшой фрагмент корня. Интересно, что проведение корневых инокулятов через ИС приводило в результате к некоторым морфологическим изменениям возобновленных из них *hairy roots*, как, например, к неожиданному проявлению стеблевого органогенеза у корневой культуры (*Ruta graveolens*) или к позеленению корней (*Scutellaria baicalensis*) при их выращивании в условиях освещения. Эти изменения являются ответной реакцией растительного материала на созданную в результате их инкапсулирования стрессовую ситуацию (анаэробноз, пониженная температура, антибиотик). Апробация разработанной технологии получения ИС привела нас к выводу о целесообразности ее использования для некоторой тонизации полученных *hairy roots*, которая улучшает рост длительно культивируемых корней. Детали этой методической работы, направленной на обеспечение стабильности роста корневых культур коллекции, запатентованы (4) и изложены в статье (5).

При создании коллекции основное внимание уделялось тем растениям, в корнях которых, согласно литературным данным, обнаружены низкомолекулярные метаболиты, представляющие практический интерес и применяющиеся в медицинской или в пищевой

промышленности. Однако в ряде случаев в культуру *in vitro* вводились корни обычных растений, в основном, с целью их использования в качестве модельной системы при изучении некоторых физиологических аспектов растительного сообщества. Так, например, введенные в культуру *hairy roots* моркови в течение ряда лет служили удобной модельной системой при изучении процесса установления симбиотических контактов корней с гифами арбускулярно-микоризных (АМ) грибов и наблюдения за последующими деталями развития образовавшейся микоризы в условиях *in vitro*. Совместное культивирование *hairy roots* моркови доказало целесообразность использования такой двойной аксеничной культуры в качестве надежного способа длительного сохранения чистоты грибных инокулятов, так как микоризованные корни моркови обеспечивали возможность обильного спороношения АМ-грибов в строго контролируемых условиях (6).

Состав объектов коллекции постоянно претерпевает некоторые изменения, что объясняется сложностью поддержания в культуре большого количества *hairy roots*, а также происходящими изменениями тематических интересов малочисленного состава группы. Неизменным остается интерес к культивированию корней ценных или необычных лекарственных растений. К последним относится рута душистая (*Ruta graveolens*) — растение с очень богатым составом вторичных метаболитов (около 200), относящихся к различным группам низкомолекулярных соединений. Особенностью растения является тот факт, что синтез этих веществ органоспецифичен, то есть корневая и надземная части растения образуют различные вторичные вещества, для основной части которых характерна своеобразная первичная флуоресценция. Наиболее интересными в этом отношении являются именно корни, которые поддерживаются в коллекции с 1991 года. Еще в 1976 году группа венгерских и немецких исследователей отметила, что апикальная часть молодых корней целого растения руты имеет интенсивное оранжевое свечение при возбуждении ультрафиолетом с длиной волны 365 нм, которое характерно для акридоновых алкалоидов (7). При уровне приборной и методической оснащенности того периода приходилось ограничиваться предположениями. Идентификация вторичных метаболитов в корнях руты стала возможной при появлении лазерной сканирующей конфокальной микроскопии (LSCM), которая в сочетании с методами ЯМР-спектроскопии и хроматомасс-спектрометрии позволила нам в 2004 году получить интересные результаты о пространственной организации образования низкомолекулярных соединений в растущих корнях этого растения. Большим преимуществом *hairy roots* руты является их интенсивное ветвление, что позволяет получать

до 200 корневых апексов от одного экспланта в течение 4 недель его роста в жидкой питательной среде. Это дало нам возможность собрать достаточное для химического анализа количество однородного растительного материала, что позволило охарактеризовать качественный состав вторичных метаболитов, локализованных в клетках меристематической зоны, зоны растяжения и зоны дифференциации корней (8). Оказалось, что в клетках меристематической зоны корней содержится только один акридоновый алкалоид, который был идентифицирован как гликозид гравакридондиола, имеющий наряду со всеми акридоновыми алкалоидами, интенсивную оранжевую флуоресценцию. В клетках двух других зон — растяжения и особенно дифференциации, в которой присутствовали многочисленные корневые волоски, состав вторичных метаболитов был более разнообразным, и он мало отличался от состава вторичных соединений зрелой части корня. LSCM меристематической части корня руты показала, что гликозид гравакридондиола локализован только в поверхностном слое клеток этой зоны, который представлен клетками плотно прилегающего к меристеме корневого чехлика — калиптры. Клетки же непосредственно меристемы не содержали вторичных метаболитов и имели обычную для растительных клеток голубоватую флуоресценцию. Характерно, что клетки калиптры, по мере роста кончика корня утрачивают свой тесный контакт с корневым апексом и, отделяясь от него, превращаются в свободно существующие клетки, так называемые пограничные клетки (ПК), которые представляют собой еще одну важную группу клеток, характерную для корневых апексов. Следует отметить, что локализация вторичных метаболитов в апикальной части корня — достаточно редко встречающееся явление. Именно поэтому результаты, полученные с изолированно растущими корнями руты, вторичные метаболиты которой хорошо детектируются благодаря их флуоресценции, представляют особую ценность для понимания той физиологической роли, которую ПК могут выполнять во время роста корня в субстрате. Характерно, что ПК при своем полном отделении от корневого апекса изменяют характер флуоресценции, но в каждой из живых ПК всегда остается маленькое включение, которое стабильно сохраняет оранжевое свечение. Интенсивно ветвящиеся *hairy roots* руты отделяют в питательную среду большое количество ПК (до 300 000 на один корневой эксплант), которые сохраняют свою жизнеспособность в виде мелко дисперсной клеточной суспензии, сосуществующей с корнями при их культивировании в течение 4 недель. Нам удалось отработать способ отделения ПК и после сбора достаточного для химического анализа материала идентифицировать основные вторичные соединения, которые содержались в свободно существующих ПК. Состав

вторичных метаболитов в них был более сложным, чем в клетках калиптры, и он мало отличался от состава вторичных соединений корней руты. При этом в ПК практически отсутствовал гликозид гвакридондиола, и группа акридоновых алкалоидов была представлена, в основном, липофильными акридоновыми алкалоидами, типичными для корней руты. Таким образом, культивирование *hairy roots*, обеспечивая проведение работы в стерильных условиях, обеспечила возможность изучения морфологических и физиолого-биохимических особенностей ПК корней, которые осуществляют в условиях *in vivo* функцию носителей химической информации при установлении контактов корней растений с представителями ризосферы. Так, например, акридоновые алкалоиды, обнаруженные в ПК корней руты, обладают фунгитоксичной активностью, что, возможно, и является препятствием для установления на них арбускулярной микоризы (неопубликованные данные). В случае других растений иной состав ПК может играть аттрагирующую роль и способствовать контактам АМ-грибов с корнями. Уникальность ПК корней как непосредственных носителей химической информации бесспорна, и дальнейшие исследования с привлечением культивируемых *hairy roots* других видов растений несомненно смогут более детально аргументировать их значение во взаимоотношениях корней растений с представителями ризосферы, а также их прямого участия в переносе органического материала корней в почвенный субстрат (*rhizodeposition*). Работа в этом направлении продолжается.

Генетическая стабильность *hairy roots* и их способность к сохранению в условиях *in vitro* синтеза корнеспецифичных низкомолекулярных метаболитов на уровне корней целого растения легли в основу исследований, проводимых в настоящее время с корнями ценного лекарственного растения — шлемника байкальского. Корни шлемника, стабильно растущие в течение 20 лет в условиях *in vitro*, синтезируют типичные для растения флавоны — байкалеин и вогонин и соответствующие им глюкурониды — байкалин и вогонозид, обладающие высокой физиологической активностью (9, 10). Количественное содержание этих ценных флавонов в изолированно растущих корнях в 3 раза ниже их концентрации в корнях многолетнего растения, что естественно, так как *hairy roots* не обладают способностью ко вторичному росту и, следовательно, к накоплению вторичных метаболитов. Этот недостаток компенсируется быстрым и круглогодичным ростом *hairy roots*, что гарантируют возможность их использования как экологически чистого лекарственного сырья нового типа. Биохимическая особенность *hairy roots* шлемника состоит в ином количественном соотношении образующихся в них флавонов по сравнению с этим параметром корней целых растений. Если в корнях

многолетнего растения доминирующим флавоном является байкалин и, соответственно, его агликон байкалеин, то в *hairy roots* наблюдается обратная картина — в них в роли основного флавона выступает вогонозид и его агликон вогонин (11). Содержание и количественное соотношение этих двух групп флавонов стабильны и сохраняются не только при выращивании *hairy roots* в колбах, но и при апробации их крупномасштабного культивировании в условиях биореактора, проведенном в швейцарской коммерческой фирме ROOTес. Практическую значимость иного соотношения флавонов *hairy roots* шлемника удалось по достоинству оценить после появления в 2007 году публикации японских исследователей, впервые показавших, что вогонин селективно индуцирует апоптоз только опухолевых клеток, не затрагивая при этом нормальные клетки (12). Избирательная цитотоксическая активность вогонина сразу привлекла к себе внимание фитохимиков и фармакологов ведущих институтов различных стран, что проявилось в колоссальном потоке публикаций на эту тему, который не прекращается до настоящего времени. Наиболее профессионально в этом отношении работают исследователи немецкого центра изучения рака (DKFZ) в Гайдельберге, где изучаются возможные механизмы цитотоксического действия вогонина (13,14). На этом этапе стало ясно, что успех в изучении механизма действия вогонина и создание на его основе нового цитотоксического препарата с избирательно проявляющейся активностью требуют не только определенного времени, но и достаточного для такой работы количества вогонина. Химический синтез вогонина пока безрезультатен, поэтому единственным его источником может быть растение — в данном случае шлемник байкальский, как наиболее распространенный вид растения. Следует отметить, что шлемник байкальский относится с 1992 года к числу исчезающих растений РФ, внесенных в Красную книгу СССР. Единственным местом его естественного произрастания в еще достаточном количестве остается Китай, в котором корни шлемника занимают 4-е место в иерархии лекарственных растений, активно используемых в традиционной китайской медицине. В связи с тем, что практически во всех исследованиях при оценке активности флавонов шлемника речь шла о комплексе флавонов, в котором доминирующим по своему содержанию был байкалин и его агликон байкалеин, то считалось, что минорные флавоны комплекса — вогонозид и вогонин выполняют роль своеобразных адъютантов первых двух флавонов. Согласно литературным данным концентрация вогонина в корнях целого растения шлемника колеблется в интервале 0,3—0,8%, а данные о содержании в них вогонозида ранее просто отсутствовали. После появления в 2007 году статьи японских химиков интерес к вогонозиду вдруг проявился, так как стало

ясно, что его можно подвергать гидролизу и получать агликон — вогонин. Но для этого все равно необходимо достаточное количество растительного сырья. К этому моменту и стало очевидным, что таким сырьем, причем экологически абсолютно чистым, могут быть культивируемые *in vitro* корни шлемника, входящие в нашу коллекцию.

Начиная с 2005 года в Фармакологическом институте Томского научного центра (ТНЦ) СО РАМН проводилось тестирование в условиях *in vivo* активности спиртовых экстрактов, приготовленных из *hairy roots* шлемника, выращенных в ИФР РАН в условиях качалочной культуры. Контролем в этих исследованиях был экстракт из корней целых растений шлемника, с которым ранее успешно работали фармакологи ТНЦ. Исследования показали, что экстракт из *hairy roots* не уступает по своей активности экстракту из корней интактного растения, а в ряде случаев его превосходит, несмотря на более низкое содержание в нем флавонов. На основании проведенных исследований в 2012 году коллектив исследователей ТНЦ и ИФР получил патент на создание нового лекарственного средства с многосторонней фармакологической активностью (15). Дальнейшее практическое использование *hairy roots* шлемника будет базироваться на привлечении естественных особенностей корней этого растения, клетки которых содержат собственную, эндогенную β-глюкуронидазу (GUS), которая гидролизует глюкурониды (байкалин и вогонозид) с освобождением из них агликонов (байкалеина и вогонина). Нами было установлено, что этот фермент локализован в клетках эпидермального слоя *hairy roots*, и он, несмотря на свою устойчивость к температурным условиям, очень чувствителен к действию ряда других стрессовых факторов, например, анаэробноза, который можно создать при прекращении качания колб (16). В связи с этим, нами была разработана комплексная стратегия культивирования корней шлемника, которая помимо оптимизации роста корней (для получения большей массы), включает в себя перевод *hairy roots* в стадии их стационарного роста в состояние 24—48-часового анаэробноза с целью активации в них GUS и проведения, таким образом, частичной биоконверсии глюкуронида вогонозида. Для полной биоконверсии вогонозида в вогонин будет использовано последующее температурное воздействие на корневую массу (50—60°C — оптимум активности GUS), которое одновременно будет способствовать и высушиванию корней. Завершающим этапом должно быть извлечение флавонов из сухих корней и препаративное разделение полученного экстракта в том случае, если будут нужны отдельные флавоны, а не весь экстракт с преобладающим в нем содержанием вогонина. Оптимальными условиями для реализации этой стратегии было бы создание биореактора с туманным орошением для

выращивания больших масс *hairy root*, аналогичный тому, в котором были выращены корни в ROOTес. В этом случае круглогодичное культивирование корней шлемника в сочетании с естественно индуцированной биоконверсией вогонозида в вогонин было бы надежной базой для получения достаточного количества ценного флавонола с уникальной цитотоксической активностью. Параллельно с использованием корней шлемника байкальского возможно культивирование *hairy roots* другого вида шлемника, введенных нами в 2007 году в культуру *in vitro* — шлемника андрахновидного (*Scutellaria andrachnoides* Vved.), от которых нами была получена быстро растущая в безгормональной среде каллусная ткань, синтезирующая только вогонозид. Для культивирования этой запатентованной нами каллусной ткани и для последующей активации в ней эндогенной GUS будет использована аналогичная стратегия, которая была нами уже частично апробирована (17).

Список литературы

1. **Kuzovkina I. & Schneider B.** Genetically transformed root cultures – generation, properties and application in plant sciences. In: K.Esser, U.Lüttge, W.Beyschlag, J.Murata (eds.) «Progress in Botany», Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2006, 67: 275—314.
2. **Кузовкина И.Н., Вдовитченко М.Ю.** Генетически трансформированные корни как модельная система для изучения физиологических и биохимических процессов корневой системы целого растения. Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений, ред. Кузнецов Вл.В., Кузнецов В.В., Романов Г.А., Москва, БИНОМ, Лаборатория знаний, 2012: 37— 53.
3. **Kuzovkina I.N., Gohar A., Alter'man I.E.** Production of β -carboline alkaloids in transformed root cultures of *Peganum harmala* L. Z. Naturforsch.C, 1990, 45: 727—728.
4. **Вдовитченко М.Ю., Кузовкина И.Н.** Способ получения «искусственных семян» из культуры корня шлемника байкальского (*Scutellaria baicalensis* Georgi), Патент РФ №2415928, 2011г.
5. **Вдовитченко М.Ю., Кузовкина И.Н.** «Искусственные семена» как способ сохранения и оздоровления культивируемых *in vitro* корней лекарственных растений. Физиология растений, 2011, 58 :461—468.
6. **Кузовкина И.Н., Альтерман И.Е., Карандашов В.Е.** Генетически трансформированные корни растений как модель изучения специфики метаболизма и симбиотических контактов корневой системы. Известия АН, серия биологическая, 2004, 3: 310—318.
7. **Verzar-Petri G., Csedo K., Möllmann H., Szendrei K., Reisch J.** Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Lokalisierung von Acridon-Alkaloiden in Geweben von *Ruta graveolens*. Planta Medica 1976, 29: 370—375.
8. **Kuzovkina I., Alterman I., Schneider B.** Specific accumulation and revised structures of acridone alkaloid glucosides in the tips of transformed roots of *Ruta graveolens*. Phytochemistry, 2004, 65: 1095—1100
9. **Кузовкина И.Н., Гусева А.В., Альтерман И.Е., Карначук Р.А.** Образование флавоноидов в трансформированных корнях *Scutellaria baicalensis* и пути их регуляции. Физиология растений, 2001, 48: 523—528.

10. **Kovacs G., Kuzovkina I., Szöke E., Kursinszki L.** Determination of flavonoids in hairy root cultures of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Chromatographia*, 2004, 60: 81—85.
11. **Кузовкина И.Н., Гусева А.В., Ковач Д., Сёке Е.** Флавоны генетически трансформированных корней шлемника байкальского (*Scutellaria baicalensis*) и индукция их образования при элиситации метилжасмонатом. *Физиология растений*, 2005, 52: 90—96.
12. **Himmji M., Ohtsuki T., Fukazawa E., Tanaka M., Yazaki S., Ui S., Nishio K., Yamamoto H., Tasaka K., Mimura A.** Difference of growth-inhibitory effect of *Scutellaria baicalensis*-producing flavonoid wogonin among human cancer cells and normal diploid cell. *Cancer Letters*, 2007, 245: 269—274.
13. **Li-Weber M.** New therapeutic aspects of flavones: The anticancer properties of *Scutellaria* and its main active constituents Wogonin, Baicalein and Baicalin. *Cancer Treatment Reviews*, 2009, 35: 57—68.
14. **Li-Weber M.** Targeting apoptosis pathways in cancer by Chinese medicine. *Cancer Letters*, 2013, 332: 304—312.
15. **Дыгай А.М., Суслов Н.И., Зюзьков Г.Н., Кузовкина И.Н., Жданов В.В., Удут Е.В., Гусева А.В., Вдовитченко М.Ю., Шилова И.В., Смирнов В.Ю., Чурин А.А., Воронова О.Л., Симанина Е.В., Неупокоева О.В., Федорова Е.П.** Средство, обладающее гемостимулирующим, антимуtagenным, противоопухолевым, церебропротекторным, антигипоксическим, ноотропным, анксиолитическим и противоневротическим действием, Патент РФ № 2438691, 2012 г.
16. **Кузовкина И.Н., Гусева А.В., Прокофьева М.Ю.** Перспективы использования культивируемых *in vitro* корней шлемника байкальского как источника селективного цитотоксического флавонола. Материалы докладов VIII Международного симпозиума «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты», РАН, Москва, 2—5 октября 2012 г, стр. 353—359.
17. **Кузовкина И.Н., Прокофьева М.Ю., Умралина А.Р., Чернышева Т.П.** Морфологические и биохимические особенности генетически трансформированных корней шлемника андрахновидного. *Физиология растений*, 2014, 61: (в печати).