

УДК 581.1

А.Р. Умралина

Институт биотехнологии НАН Кыргызской Республики, Кыргызстан, г. Бишкек
E-mail: umralina@mail.ru

Получение корневых культур копеечника Енафы (*Hedysarum enaffae*)

Корневые культуры, полученные с использованием диких, немодифицированных штаммов почвенной агробактерии, представляют большой практический интерес с точки зрения их биологической безопасности для создания фитопрепаратов на основе лекарственных растений. В результате инокуляции эндемика рода *Hedysarum* – *H. enaffae* штаммом почвенной агробактерии *Agrobacterium rhizogenes* 15834Sw были получены корневые культуры – изолированные и трансформированные корни (hairy roots) и изучены их морфологические особенности. Изолированные корни отличались темной окраской, оба типа корней обладали способностью к стеблевому органогенезу. Hairy roots обладала светлой окраской и представляла собой смесь четко выраженных корней с небольшим количеством пролиферирующих суспензионных клеток, которые отделяются от рыхлой поверхности растущих корней и растут в виде суспензии. Оба типа корней имели высокую скорость роста, ростовые индексы после культивирования их в течение 8 недель составляли 30 у изолированных и 50 у hairy roots. **Ключевые слова:** эндемики, копеечники, лекарственные растения, изолированные корни, «hairy roots», корневые культуры *in vitro*, *Agrobacterium rhizogenes*, биологически активные вещества.

A.R. Umralina

Producing root cultures of the *Hedysarum enaffae*

Root cultures produced using wild non-modified *Agrobacterium* strains are of high practical interest in terms of their biological safety for development fitodrugs on the base of medicinal plants. Root cultures of *Hedysarum enaffae* were produced by inoculation with *Agrobacterium rhizogenes* 15834Sw strain and their morphological characteristics were studied. Isolated roots were characterized with dark coloring and both root types had capacity to stem organogenesis. Hairy roots had light coloring and were a mixture of clear appeared roots with small quantity of proliferating suspension cells which are separated from friable surface of growing roots and grow in suspension form. Both root types had high growing rate and root indexes after cultivation during 8 weeks were 30 at isolated and 50 at hairy roots accordingly. **Key words:** endemic, *Hedysarum*, medicinal plants, isolated roots, “hairy roots”, root culture *in vitro*, *Agrobacterium rhizogenes*, biologically active substances.

А.Р. Умралина

Hedysarum enaffae тамыр культурасын алуу

Топырак агробактерияларының модификацияланбаган жабайы штамдары көмегімен алынган тамыр культуралары биологиялык жагынан кауіпсіз болгандыктан дәрілік өсімдіктер негізінде жана фитопрепарат шығаруда үлкен практикалык қызығушылық туғызып отыр. *Agrobacterium rhizogenes* 15834Sw топырак агробактерияларының штамы көмегімен *Hedysarum* туысына жататын *H. enaffae* эндемигін иннокуляциялау нәтижесінде оқшауланған және трансформацияланған тамыр культуралары алынып, олардың морфологиялык ерекшеліктері зерттелді. Оқшауланған тамырлар кара түсті бояуымен (түсімен) ерекшеленді және тамырдың екі өсіп келе жатқан тамырдың борпылдак қабатынан бөлініп, суспензия ретінде өсетін пролиферациялаушы суспензиялык клеткалар тобы бар айқын көрінген тамырлар қоспасы ретінде болды. Тамырлардың екі типінің де өсуі жоғары жылдамдықта болды, 8 апта бойы культивирленгеннен кейін олардың өсу индексі оқшауланған тамырлар үшін 30, ал hairy roots үшін 50-ді құрады.

Түйін сөздер: эндемиктер, *Hedysarum enaffae* копеечник, дәрілік өсімдіктер, оқшауланған тамырлар, «hairy roots», *in vitro* жағдайындағы тамыр культурасы, *Agrobacterium rhizogenes*, биологиялык белсенді заттар.

У многих видов лекарственных растений образование физиологически активных вторичных соединений происходит непосредственно в подземной части. Одним из новых перспективных направлений в биотехнологии для широкомасштабного культивирования биологически активных веществ таких растений является получение культуры трансформированных корней, так называемых «*hairy roots*». Трансформация достигается с помощью инокуляции бактериями *Agrobacterium rhizogenes* [1, 2]. К настоящему времени введены в культуру *in vitro* корни более 185 видов двудольных растений, относящихся к 42 семействам [3]. Ценным качеством полученных таким путем трансформированных корневых культур, помимо интенсивного роста и быстрого ветвления, является их генетическая стабильность [4], способность к сохранению синтеза корнеспецифичных вторичных метаболитов в условиях *in vitro* и росту в отсутствие внешних регуляторов роста [5]. Эти и другие особенности *hairy roots* позволяют получать большие массы экологически абсолютно чистых корней, которые по своему химическому составу близки к корням нативных растений.

Род *Hedysarum* (сем. Fabaceae) – один из перспективных родов в фармакологическом отношении [6]. Практически половина численности копеечников Кыргызстана имеет природоохранный статус эндемики и редкие растения [7]. В природных условиях Кыргызстана произрастает до 40 видов копеечников, что составляет 14% всех видов копеечников планеты. Наибольшее разнообразие видов сконцентрировано в Памиро-Алае и Тянь-Шане. Это подтверждает значительную самобытность видообразования рода *Hedysarum*. Копеечник Енафы (*Hedysarum enaffae* B.Sultanova) является эндемиком, это единственный вид, не вошедший в общую базу копеечников. Сведения о культивировании растения отсутствуют. Редкая встречаемость растения и полное отсутствие данных о химическом составе вторичных веществ послужили предпосылкой для апробации микрклонального размножения растения и получения корневых культур.

Цель настоящей работы состояла в изучении особенностей роста корней копеечника Енафы, культивируемых в условиях *in vitro*.

Материалы и методы

Для получения стерильных проростков копеечника были использованы семена, собранные д.б.н. Лазьковым Г.А. во время экспедиции, проведенной летом 2005 года в районе хребта Кунгей Ала-Тоо, в бассейне реки Тору – Айгыр.

Трансформированные корни получали по методу Mugnier и Terfer [8, 9]. Для инокуляции был использован штамм почвенной агробактерии *Agrobacterium rhizogenes* 15834Sw. Перед инокуляцией бактерии пересевали на свежую агаризованную среду, выдерживали в течение 48 часов при температуре 26 градусов и затем переводили в жидкую среду Мурасиге-Скуга (MS), предназначенную для кокультивирования с растительными эксплантами. Для приготовления эксплантов от стерильных проростков отделяли надземную часть и острым скальпелем отделяли семядоли и нарезали сегменты гипокотилей (15–20 мм). Для увеличения проникновения бактерий экспланты повреждали с помощью стерильной иглы и помещали в стерильные колбы со средой MS. Для активации ауксиновых рецепторов растительных клеток в среду добавляли 1 мг/л синтетического ауксина – 2,4 Д. Затем добавляли небольшое количество суспензии агробактерий (до состояния легкой опалесценции культуральной жидкости). Колбы, содержащие экспланты и бактерии, помещали на качалку и выдерживали 24 часа при +20°C. После кокультивирования эксплантов и бактерий сливали культуральную жидкость, а экспланты переносили в воронки на стерильные фильтры и промывали многократно питательной средой того же состава для удаления избыточного количества бактерий. Экспланты помещали в чашки Петри на агаризованную безгормональную среду, содержащую антибиотик клафоран (цефатоксим) в концентрации 500 мг/л для элиминирования остатков агробактерий. Чашки Петри, предварительно покрытые четырьмя слоями марли, переносили в комнату с люминисцентным освещением. Участки с типичными проявлениями генетической трансформации отделялись и переносились на безгормональную питательную среду В-5 [10], содержащую клафоран 250 мг/л, для элиминации остатков агробактерии.

Результаты и их обсуждение

Семена копеечника Енафы после обезжиривания поверхности были простерилизованы концентрированной серной кислотой в течение 3 минут, затем промыты стерильной водой и помещены на проращивание на агаризованную питательную среду. Начало проращивания семян было неровным и наблюдалось на 4-10 день. Этапы прохождения инокуляции представлены на рис. 1. На шестой неделе после инокуляции первых проростков отмечено проявление каллусогенеза обработанных эксплантов. Наряду с каллусогенезом экспланты демонстрировали в ряде случаев проявление ризогенеза, что является показателем прохождения трансформации (рис. 1.2 и 1.3). Отделенные от

ряда эксплантов корни показывали медленный рост на агаризованной среде (рис. 1.4), а также при переносе их в жидкую среду (рис. 1.6). Для индукции роста корней при дальнейших пересадках в питательную среду была введена индолилмасляная кислота в концентрации 1 мг/л. Ценным качеством культур *hairy roots* является их способность к сохранению возможности получения стеблевой регенерации вплоть до воспроизведения целого растения. Это свойство и было нами обнаружено у *hairy roots* копеечника *H. enaffae* (рис. 1.5). Особенностью копеечника Енафы является также неплохой рост изолированных корней, отделенных от проростков при проведении трансформации стеблевых эксплантов (рис. 1.7).

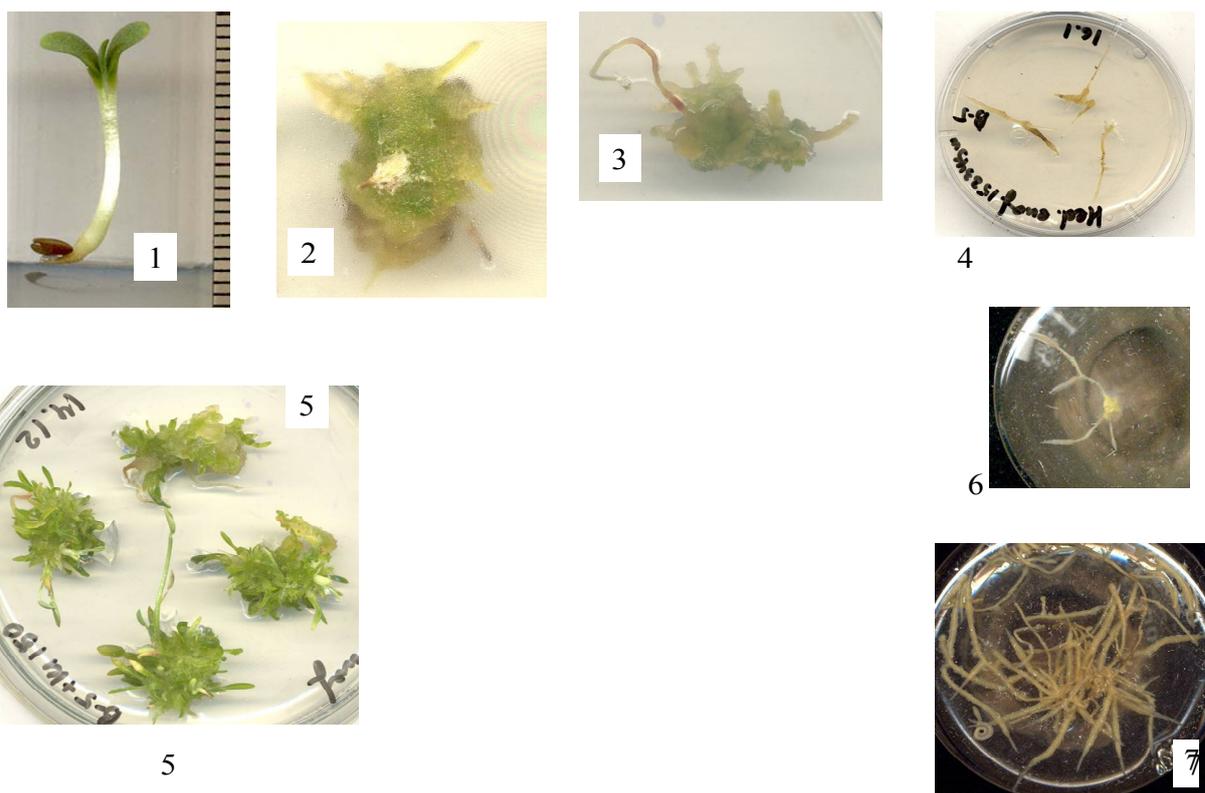


Рисунок 1 – Инокулирование проростков *Hedysarum enaffae*:

1 – 6-недельный проросток; 2 – проявление каллусогенеза с элементами ризогенеза; 3 – ризогенез на одном из эксплантов; 4 – первый пассаж *hairy roots*; 5 – интенсивный органогенез при выращивании на свету; 6 – *hairy root* в жидкой среде (3 недели); 7 – Изолированные корни копеечника после 2-недельного культивирования

Далее изолированные и трансформированные корни копеечника вели себя неординарно. Изолированные корни прекрасно росли на среде без гормонов, в то время как трансформированные корни при пассировании постоянно сохраняли, наряду с достаточно активным ростом и ветвлением, способность к пролиферации клеток, отделяющихся в пита-

тельную среду коровой паренхимой корней. В результате такой постоянной пролиферации клеток коры корней в питательной среде, наряду с одиночными клетками, наблюдалось образование агрегатов клеток (рис. 2.А), и в итоге корневая культура выглядит как смесь дифференцированно растущих корней и плотной клеточной суспензии (рис.2.Б).



А, Б – смешанный тип роста *hairy root* копеечника Енафы; В – отобранная корневая культура без пролиферации; Г – базальная часть *hairy root* 5-недельного возраста

Рисунок 2 – Корневые культуры *Hedysarum enaffae*

Из сильно пролиферирующих культивируемых *hairy root*, образующих в итоге смесь корневой и суспензионной растущей массы, удалось выделить лишь одну линию. Эта линия *hairy roots* образовывала меньшее количество суспензионных клеток, было проведено 3 пассажа этой корневой культуры. Однако корни выделенной линии сразу после пересадки интенсивно окрашивали питательную среду за счет выделения в нее темных метаболитов (предположительно, антраценовой природы), но сохраняли при этом некоторую ростовую активность. Смена питательной среды через 7-10 дней после пересадки стабилизировало состояние корневой культуры, и она начинала интенсивно расти, образуя в результате к 4-ой неделе роста значительную массу. Однако базальная часть этих корней имела темную окраску (рис. 2.Г), которая характерна для начального периода роста корней. Таким образом, трансформированные корни, пролиферируя в течение пассажа, образуют в итоге хорошо растущую стойкую смесь корневой массы и суспензии клеток.

Изолированные корни копеечника сохраняли способность к интенсивному росту на протя-

жении 4 пассажей (почти в течение 8 месяцев), однако они более темные по сравнению с *hairy roots*, и только для апикальной части корней характерна светлая окраска. Изолированные корни копеечника при культивировании не пролиферируют, как трансформированные, и образуют к концу 6-ой недели достаточно объемную массу переплетенных корней, которые имеют буроватую окраску. Цвет этих корней похож на окраску *hairy roots* другого вида копеечника – копеечника чайного (*Hedysarum theinum*), который растет в горах Алтая и считается наиболее богатым ценными вторичными метаболитами, обладающими тонизирующим действием.

Оба типа корней копеечника Енафы – изолированные и трансформированные – росли довольно интенсивно, и масса культивируемых корней увеличивалась в течение 8 недель их выращивания в 25-30 раз у изолированных и в 40-50 раз у *hairy roots*. При этом особенностью изолированных корней является их темная окраска и сохранение способности к стеблевому органогенезу.

Таким образом, в результате исследований нами были получены *in vitro* корневые культуры

эндемика *Hedysarum enaffae* – изолированные и трансформированные корни (*hairy roots*). Были изучены морфологические особенности корневых культур. Трансформированные корни пролиферировали в течение пассажа и образовывали в итоге хорошо растущую стойкую смесь корневой массы и суспензии клеток. Изолированные корни копеечника при культивировании не пролиферировали, как трансформированные,

и образовывали достаточно объемную массу переплетенных корней. *Hairy roots* имели светлую окраску в отличие от изолированных корней буроватого цвета. Оба типа корней отличались способностью к стеблевому органогенезу и обладали высокой скоростью роста, ростовые индексы после культивирования их в течение 8 недель составляли 30 у изолированных и 50 у *hairy roots*.

Литература

- 1 De Cleene, M. The host range of infectious hairy roots [Text] / M. De Cleene and J. De Ley // Bot. Rev. – 1981. – V. 47 – P. 147-194.
- 2 Giri A. Transgenic hairy roots: Recent trends and applications [Text] / A. Giri, M.L. Narasu // Biotechnology Advances. 2000. – V. 18. – P. 1-22.
- 3 Кузовкина, И.Н. Генетически трансформированные корни растений как потенциальный источник экологически чистого лекарственного сырья [Текст] / И.Н. Кузовкина, И.Е. Альтерман, М.Ю. Вдовитченко // 2-й Всероссийский симпозиум “Физиология трансгенного растения и проблемы биобезопасности”: Программа и тезисы докладов, Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. – М., 2007. – С. 54.
- 4 Aird, E.H. Cytogenetic Analysis of Hairy Root Cultures from a Number of Plant Species Transformed with *Agrobacterium rhizogenes* [Text] / E.H. Aird, J.D. Hamill, M.J.C. Rhodes // Plant Cell, Tissue Organ Cult. – 1988. – V. 15. – P. 47-57.
- 5 Myers, N. Biodiversity hotspots for conservation priorities. [Text] / N. Myers, R. A. Mittermeier, C. G. Mittermeier, G. A B. da Fonseca, J. Kent. // Nature. – 2000. – V. 403. – P. 853–858.
- 6 Chen, S.G. Prenylisoflavone derivatives from the roots of *Hedysarum scoparium* [Text] / S.G. Chen, J.J. Chen, K. Gao // Chem. Pharm. Bull. (Tokyo). – 2007. – V.55. – N 8. – P. 1181-1184.
- 7 Пеккер, Е.Т. К биохимической характеристике растений рода *Hedysarum* L. Юго-Восточного Алтая [Текст] / Е.Т. Пеккер // Актуальные вопросы ботанического ресурсоведения в Сибири. – Новосибирск, 1976. – С.146-149.
- 8 Mugnier, J. Establishment of new axenic hairy root lines by inoculation with *Agrobacterium rhizogenes*. [Text] / J. Mugnier // Plant Cell Reports. – 1988. – V. 7. – P. 9-12.
- 9 Tepfer, D. Genetic transformation using *Agrobacterium rhizigenes*. [Text] / D. Tepfer // Physiologia Plantarum. – 1990. – V. 79. – P. 140-146. Technical Information Sheet #4, 2008.
- 10 Gamborg, O.L. "Nutrient requirements" of "suspension cultures of soybean root cells. [Text] / O.L. Gamborg, R.A. Miller, K. Ojima // Exp. Cell Res. – 1968. – V. 50. P. 151-158.