

## БИОТЕХНОЛОГИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК 58.085; 573.6

doi: 10.17223/19988591/37/2

А.А. Эрст<sup>1</sup>, Л.Н. Зибарева<sup>2</sup>, Т.В. Железниченко<sup>1</sup>, О.В. Ковзунова<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, г. Новосибирск, Россия

<sup>2</sup>Национальный исследовательский Томский государственный университет,  
г. Томск, Россия

<sup>3</sup>ГНУ Центральный ботанический сад НАН Беларуси, г. Минск, Республика Беларусь

### Культура генетически трансформированных корней (*hairy roots*) *Silene roemer* Friv. – источник получения фитоэкдистероидов

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ  
в рамках научного проекта № 15-54-04083 Бел\_мол\_a.

Методом *Agrobacterium*-опосредованной трансформации получена культура *hairy roots* экдистероидсодержащего вида *Silene roemer*. Проведен биохимический анализ полученной культуры на содержание экдистероидов методом высокоскоростной жидкостной хроматографии. Установлено, что в процессе культивирования происходит биосинтез более 20 экдистероидов. Обнаружен ряд как неполярных, так и среднеполярных экдистероидов. Оценка уровней мажорного экдистероида 20-гидроксиэкдизона показала, что его содержание составляет 0,1%. Использование культур *hairy roots* *S. roemer* является перспективной системой для изучения путей биосинтеза и локализации фитоэкдистероидов, а также способов усиления их продукции.

**Ключевые слова:** культура *in vitro*; ВЭЖХ; 20-гидроксиэкдизон; лекарственные растения.

### Введение

Культуры клеток, тканей и органов растений являются все более востребованными альтернативными источниками ценных вторичных метаболитов и используются для биосинтеза целого ряда веществ. Одним из относительно новых источников в биотехнологии получения БАВ растений является культура *hairy roots* («бородатые корни») – культура корней, полученная с помощью почвенной бактерии *Agrobacterium rhizogenes*, способной вызывать у многих видов растений болезнь корней, проявляющуюся в их неконтролируемом разрастании и ветвлении [1]. Генетическая трансформация до-

стигается за счет встройки *rolB* генов с помощью Ri-плазмиды *A. rhizogenes* в геном растительной клетки. Данный ген кодирует тирозин-фосфатазу и используется для модуляции процессов вторичного метаболизма в культурах растительных клеток, стимулируя или ингибируя его [2].

В настоящее время разработаны некоторые технологии получения экдистероидов биотехнологическими методами (культуры клеток, тканей, трансформированных корней) [3]. В культуре клеток могут синтезироваться 20-гидроксиэкдизон (20E) и некоторые другие компоненты вторичного метаболизма у родов *Ajuga*, *Serratula*, *Rhaponticum*, *Pteridium*, *Polypodium* [4–7]. В ряде работ [8, 9] показано, что содержание экдистероидов в культуре клеток на порядок ниже, чем в природе. При продолжительном культивировании снижается общее содержание и изменяется долевое соотношение между индивидуальными соединениями. Кроме того, синтезируются неидентифицированные экдистероиды. Содержание 20E в культуре клеток для разных видов составляет от 0,001–0,01% у *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin [6] до 0,4–0,5% у *Serratula coronata* L., 0,7% у *Ajuga reptans* L. [4] и 0,4% у *Ajuga lobata* (D. Don) Kuntze [5]. Успешные результаты получены также с культурами клеток из заростков *Polypodium vulgare* L., производящими до 0,7% 20E [7]. В ряде работ [8, 10] отмечено, что каллусные и суспензионные культуры экдистероидсодержащих видов синтезируют меньшее количество экдистероидов, чем культуры *hairy roots*, и для их биосинтеза требуется тканевая специализация. Эффективность использования культуры *hairy roots* показана для таких экдистероидсинтезирующих растений, как *Ajuga turkestanica* Briq. [11], *A. reptans* [12], *Serratula tinctoria* L. [13].

Представители многочисленного рода *Silene* L. (Caryophyllaceae), отличающиеся разнообразием структур и высокими уровнями экдистероидов, могут служить исходными объектами для культивирования каллусных культур и культуры *hairy roots*. Одним из видов суперпродуцентов фитоэкдистероидов является *Silene roemerii* Friv. Экдистероиды в *S. roemerii* впервые выявлены разработанным способом на основе хроматографического анализа экстрактов семян [14]. Выделенные экдистероиды из интродуцированных растений идентифицированы как 20-гидроксиэкдизон, 2-дезоксид-20-гидроксиэкдизон, полиподин В.

Цель работы – получение культуры *hairy roots* *Silene roemerii* и изучение содержания фитоэкдистероидов в данной культуре.

### Материалы и методики исследования

**Методы получения и поддержания культуры *hairy roots*.** Объектом исследования является *Silene roemerii*. Семена *S. roemerii* получены от растений, произрастающих на экспериментальном участке Сибирского ботанического сада Томского государственного университета (СибБС ТГУ). Этот вид является суперпродуцентом экдистероидов.

Для получения асептической культуры семена стерилизовали в 20%-ном растворе «Domestos» с последующим трехкратным промыванием стерильной дистиллированной водой и помещали на 0,6%-ный водный раствор агар-агара для проращивания. Условия культивирования семян – фотопериод 16/8 свет/темнота,  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Штамм *Agrobacterium rhizogenes* A-4 RT получен из группы специализированного метаболизма корней Института физиологии растений РАН (г. Москва) в 2014 г. Культивирование проводили в чашках Петри на среде YEB, г/л: дрожжевой экстракт – 1, мясо-пептонный бульон – 5, сахароза – 6,6,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 3, агар – 7, pH = 7. Условия поддержания и сохранения культур: в темноте, первые двое суток при температуре  $+26^\circ\text{C}$ , далее 28 суток при температуре  $+7^\circ\text{C}$ .

Трансформацию растений *S. roemerii* проводили по следующей схеме: стерильные проростки делили на лист, гипокотиль, корень, каждый тип экспланта делили на несколько частей и накалывали иголкой инсулинового шприца. Затем их инокулировали в течение 24 ч в жидкой питательной среде Мурасиге–Скуга (MS) [15], содержащей суспензию агробактерий *A. rhizogenes* суточного возраста. После экспозиции инокуляты промывали стерильной средой  $\frac{1}{2}$  MS и помещали для проявления трансформации на агаризованную среду  $\frac{1}{2}$  MS с добавлением антибиотика – 500 мг/л цефотаксима. Через 3 недели после появления розетки корней их отделяли и пересаживали на ту же питательную среду с цефотаксимом (500 мг/л) для элиминирования бактерий. Повторную пересадку кончиков корней проводили на среду с 250 мг/л цефотаксима.

*Hairy roots* культивировали на среде Гамборга ( $\text{B}_5$ ) [16] с добавлением 500 мг/л гидролизата казеина с интервалом 35 дней. Для пересадки брали примерно 200 мг сырой биомассы корней и помещали в конические колбы объемом 250 мл в 100 мл среды. pH доводили до 5,8 до автоклавирования. Условия культивирования: в темноте при  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  и постоянном перемешивании при 90 об/мин («Elmi, S-3-02L», Латвия).

В работе по оценке параметров роста и уровня биосинтеза вторичных метаболитов использована только одна линия *hairy roots* – *hairy roots S. roemerii*, полученная из частей корня.

Сырую массу определяли после промывания корней от питательной среды под проточной водой и просушивания фильтровальной бумагой. Сухую биомассу определяли после высушивания корней при  $100^\circ\text{C}$  до постоянной массы. Индекс роста рассчитывали по формуле [17]

$$I = \frac{(m_{\max} - m_0)}{m_0},$$

где  $m_0$  и  $m_{\max}$  – масса корней в начале и конце культивирования соответственно.

Наблюдения за параметрами роста культуры *hairy roots* проводили после 4-го и 5-го пассажей, для расчета индекса роста фиксировали сырую и сухую биомассу корней в начале и конце культивирования. Эксперименты прово-

дили в двух повторностях. Статистическую обработку результатов и анализ полученных данных выполняли с использованием программы Microsoft Excel 7.0 и StatSoft STATISTICA 6.0 (LSD-test). Данные представлены в виде средних значений с доверительными интервалами, статистическая значимость различий определялась по Стьюденту ( $p < 0,05$ ). Графики построены в программе Microsoft Excel 7.0.

**Методы исследования биологически активных веществ растений.** Экстракты из культур *hairy roots* получены методом реперколяции 70%-ным раствором этанола с последующим концентрированием с помощью ротационного испарителя («IKA RV 10 digital», Германия). Влажность сырья определяли на анализаторе влажности («ANB ML-50», Япония).

Анализ содержания фитоэкдистероидов осуществляли в лаборатории фитохимии СБС методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. ВЭЖХ/УФ анализ выполнен на жидкостном хроматографе («Shimadzu LC20», Япония) с диодноматричным детектором. Хроматографическая колонка Perfect Sil Target ODS-3; 4,6×250 мм, размер зерна сорбента – 5 мкм, элюирование смесью ацетонитрила и изопропилового спирта (3:2; 5:2, v/v) в градиенте 0,1%-ной трифторуксусной кислоты от 15 до 35%. Скорость элюирования – 1 мл/мин. Аналитическая длина волны  $\lambda_{\max} = 254$  нм для регистрации фитоэкдистероидов, время анализа 60 мин. Для нормально фазовой ВЭЖХ использовали следующую хроматографическую систему: подвижная фаза – циклогексан-изопропиловый спирт – вода (100:40:2.5, v/v), колонка Target 100 Sil.

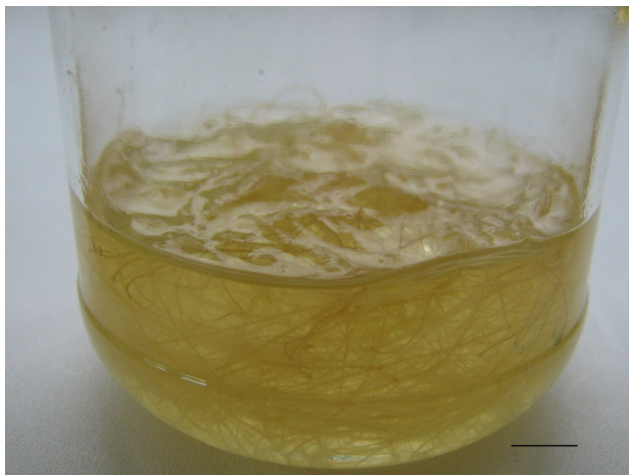
Для построения калибровочной кривой использовали смесь стандартных образцов 4 компонентов, включая 20Е. Смеси готовили путем разбавления 96%-ным этиловым спиртом. Концентрации 20Е в подготовленных смесях составили: 0,325; 0,1625; 0,08125 мг/мл. Отдельно снимали хроматограмму 20Е с концентрацией 1 мг/мл. Полученные данные имеют хорошую сходимость с хроматограммами смесей и были использованы при построении калибровочной кривой и уравнения для расчета содержания экдистероидов. Расчет содержания экдистероидов осуществляли на основе площади пика 20Е в анализируемом образце экстракта и по уравнению кривой.

Кроме того, этанольные экстракты анализировали качественно на пластинках для тонкослойной хроматографии (ТСХ), силикагель 60 F254 25 TLC, 20×20 см (алюминий) Merck в системе растворителей хлороформ – этанол в соотношении 3:1 (v:v).

### Результаты исследования и обсуждение

Состав и содержание экдистероидов представителей рода *Silene* являются видоспецифичными и в значительной степени зависят от места произрастания, стадии развития и условий выращивания [14]. По этой причине использование культуры клеток и органов растений является важным альтернативным источником получения суммы и отдельных экдистероидов смолёвок, а также модельной системой для изучения путей их биосинтеза.

Трансформацию частей проростков *S. roemerii* наблюдали через 2 недели после инокуляции эксплантов со штаммами *A. rhizogenes* A-4 RT. Культура *hairy roots* идентифицирована по морфологическому признаку: на эксплантах развивались тонкие ветвящиеся корни 5–12 мм длиной. Полученные «бородатые корни» (рис. 1) культивировали на протяжении четырех пассажей, после чего проводили оценку параметров роста и развития. Индексы роста по сырой и сухой биомассе на 4-м и 5-м пассажах статистически значимо не различались ( $p < 0,05$ ) (табл. 1).



**Рис. 1.** Культура *hairy roots* *Silene roemerii* на среде  $B_5$ , дополненной 500 мг/л гидролизата казеина. Масштаб: 1 см. Автор: А.А. Эрст

[Fig. 1. *Hairy roots* *Silene roemerii* in  $B_5$  medium with an addition of 500 mg l<sup>-1</sup> casein hydrolyzate. Scale: 1 cm. Photo by AA Erst]

Т а б л и ц а 1 [Table 1]

**Индексы прироста биомассы культуры *hairy roots* *Silene roemerii***  
[Growth index of *hairy roots* *Silene roemerii*]

№ пассажа [Subculture cycle №]	Сырая биомасса [Wet biomass]	Сухая биомасса [Dry biomass]
4	8,3±1,4a	8,1±1,8a
5	9,6±1,9a	9,0±1,5a

*Примечание.* Значения, за которыми следуют одинаковые буквы в колонке, статистически значимо не различаются ( $p < 0,05$ , LSD-test).

[Note. Values, followed by the same letters in columns are not significantly different from each other ( $p < 0.05$ , LSD-test)].

**Идентификация экидистероидов в этанольных экстрактах культур *hairy roots* методом ВЭЖХ.** С целью обнаружения и качественной идентификации экидистероидов *hairy roots* *S. roemerii* предварительно изучено хроматографическое поведение стандартов экидистероидов в трех системах растворителей – подвижных фазах (табл. 2) как в режиме нормально-фазовой (НФ), так и обращенно-фазовой (ОФ) высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Т а б л и ц а 2 [Table 2]

**Времена удерживания стандартов экидстероидов  
при использовании разных подвижных фаз  
[Retention times of ecdysteroid standards using different mobile phases]**

Экидстероиды [Ecdysteroids]	Время удерживания, мин [Retention times, min]		
	Система 1 [System 1]	Система 2 [System 2]	Система 3 [System 3]
Туркестерон [Turkesterone]	11,78	11,92	–
Интегристерон А [Integristerone A]	16,95	15,43	61,7
Полиподин В [Polypodine B]	18,72	19,61	32,8
20-Гидроксиэкидзон [20-hydroxyecdysone]	19,31	20,03	31,8
Экидзон [Ecdysone]	29,81	28,72	23,6
2-Дезокси-20-гидроксиэкидзон [2-deoxy-20-hydroxyecdysone]	33,21	31,93	17,2
2-Дезоксиэкидзон [2-deoxy ecdysone]	43,94	42,96	13,5

Примечание. Система 1: ОФ – ацетонитрил – изопропанол (3:2, v/v) в 0,1%-ной трифторуксусной кислоте, градиент от 15 до 35%; система 2: ОФ – ацетонитрил – изопропанол (5:2, v/v) в 0,1%-ной трифторуксусной кислоте, градиент от 15 до 35%; система 3: НФ – циклогексан-изопропиловый спирт – вода (100:40:2.5, v/v), колонка Target 100 Sil.  
[Note. System 1: RP - acetonitrile-isopropanol (3:2, v/v) in 0.1% trifluoroacetic acid gradient from 15 to 35%; System 2: RP - acetonitrile-isopropanol (5:2, v/v) in 0.1% trifluoroacetic acid gradient from 15 to 35%; System 3: NP - cyclohexane-isopropanol-water (100:40:2.5, v/v) column Target 100 Sil].

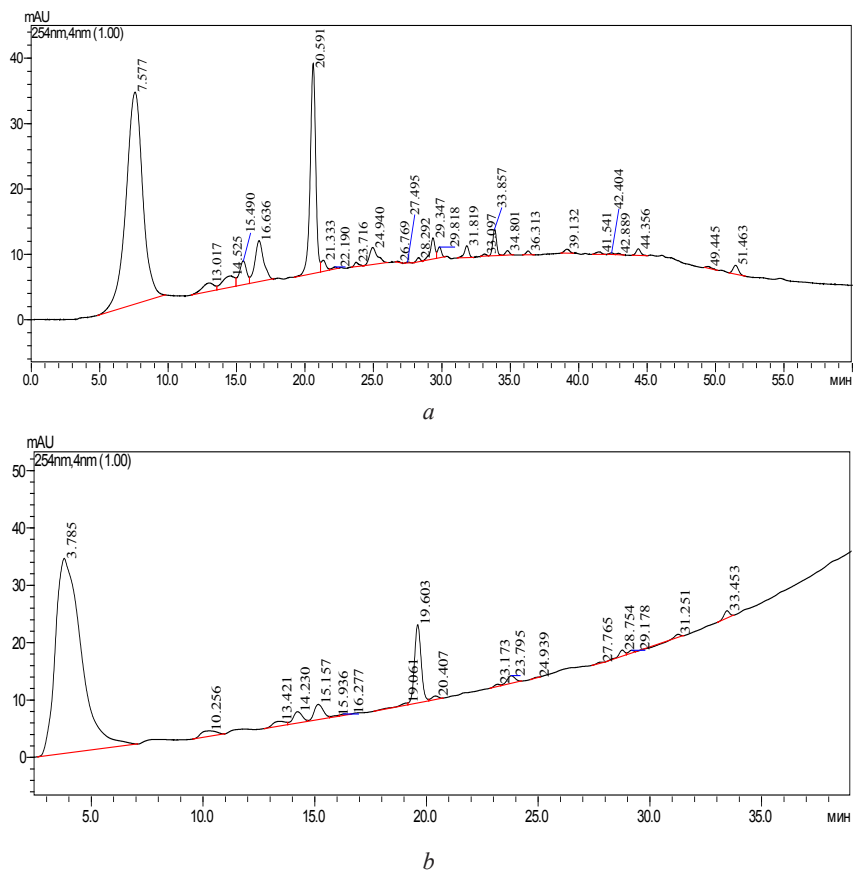
Т а б л и ц а 3 [Table 3]

**Хроматографические характеристики этанольного экстракта  
культуры hairy roots *Silene roemerii*  
[Chromatographic characteristics of ethanol extract of hairy roots *Silene roemerii*]**

№ п/п	Время удерживания, мин [Retention times, min]	Площадь пика, % [Peak area, %]	Длина волны (λ), нм [Wave length (λ), nm]	Идентифицированные экидстероиды [Ecdysteroids]
1	15,228	4,3569	246	Интегристерон А [Integristerone A]
2	16,636	5,7794	242	НИДЭ [UNIE]
3	20,591	18,7731	246	20-Гидроксиэкидзон [20-hydroxyecdysone]
4	22,190	0,1588	245	НИДЭ [UNIE]
5	23,716	0,3050	243	НИДЭ [UNIE]
6	24,940	2,1618	242	НИДЭ [UNIE]
7	28,292	0,2343	243	НИДЭ [UNIE]
8	29,347	1,5694	242	НИДЭ [UNIE]
9	29,818	0,6600	244	НИДЭ [UNIE]
10	31,819	0,8493	243	2-Дезокси-20-гидроксиэкидзон [2-deoxy-20-hydroxyecdysone]
11	33,857	1,6169	244	НИДЭ [UNIE]
12	34,801	0,3000	243	НИДЭ [UNIE]
13	36,313	0,2480	242	НИДЭ [UNIE]
14	39,132	0,3231	242	НИДЭ [UNIE]
15	39,85	0,3962	242	НИДЭ [UNIE]
16	41,541	0,2087	242	НИДЭ [UNIE]
17	42,404	0,1002	242	2-Дезоксиэкидзон [2-deoxy ecdysone]
18	42,889	0,0857	242	НИДЭ [UNIE]
19	44,356	0,4915	240	НИДЭ [UNIE]
20	46,129	0,1570	242	НИДЭ [UNIE]
21	51,463	0,7854	242	НИДЭ [UNIE]

Примечание. НИДЭ – неидентифицированные экидстероиды.  
[Note. UNIE - unidentified ecdysteroids].

В процессе подбора хроматографических условий для разделения экстрактов использовали систему 2 вследствие лучшего разделения экистероидов и меньшего времени анализа. Полученные хроматограммы представлены на рис. 2–3. Проведенные хроматографические исследования качественного состава концентрированных экстрактов свидетельствуют о том, что в культурах *hairy roots*, полученных в подобранных условиях, происходит биосинтез как полярных, так и неполярных экистероидов (табл. 3).



**Рис. 2.** ВЭЖХ этанольного экстракта *hairy roots* *Silene roemerii*:

*a* – на 4-м пассаже; *b* – на 5-м пассаже

[Fig. 2. HPLC of ethanol extract of *hairy roots* *Silene roemerii*: *a* – 4<sup>th</sup> subculture cycle; *b* – 5<sup>th</sup> subculture cycle. On the X-axis - Time, min; on the Y-axis - Optical density, mAU]

Максимумы поглощения пиков 240–246 нм (см. рис. 2, 3, табл. 3) свидетельствуют об экистероидной природе соединений, обусловленных наличием  $\alpha,\beta$ -ненасыщенной кетогруппировки в структуре экистероидов.

Согласно данным ВЭЖХ в экстрактах *hairy roots* *S. roemerii* на 4-м и 5-м пассажах обнаружены интегристерон А, 20Е, 2-дезоксиг-20Е, 2-дезоксигэки-



зон и ряд неидентифицированных экистероидов. Оценка уровня мажорного экистероида 20Е показала, что в целом во всех образцах он составляет 0,1%.

В ряде работ показано, что культура *hairy roots* является наиболее эффективной системой для биосинтеза вторичных метаболитов, в том числе и экистероидов. Так, Т. Matsumoto и N. Tanaka отмечали, что в линиях *hairy roots* *A. reptans* Ar-4 и Ar-19 синтезируется 0,15 и 0,085% 20Е, в то время как в корнях интактных растений его содержание составляет 0,03% [12]. Для другого вида рода *Ajuga* – *A. multiflora* Bunge – также показано, что в генетически трансформированных корнях содержание 20Е превышает в 10 раз его количество в интактных растениях [18].

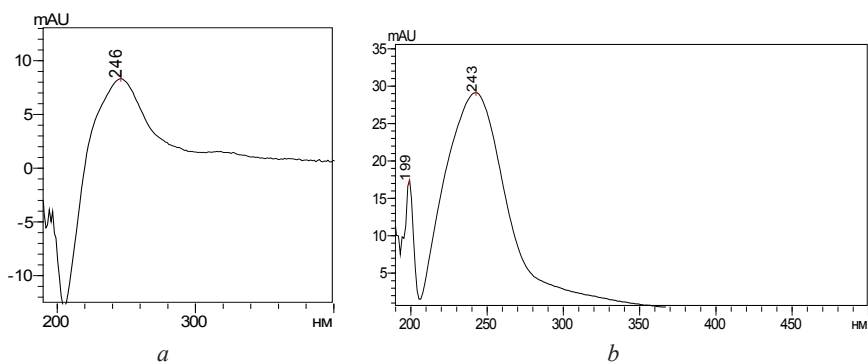


Рис. 3. УФ-спектры экистероидов *hairy roots* *Silene roemer*:

*a* – на 4-м пассаже; *b* – на 5-м пассаже

[Fig. 3. UV spectra of ecdysteroids of *hairy roots* *Silene roemer*: *a* - 4<sup>th</sup> subculture cycle; *b* - 5<sup>th</sup> subculture cycle. On the X-axis - Wavelength, nm; on the Y-axis - Optical density, mAU]

Важным является и то, что генетически трансформированные корни сохраняют способность к синтезу вторичных метаболитов, специфичных для корней растения донора. Так, для ценного лекарственного растения *Hedysarum theinum* Кrasnob. выявлено, что составы вторичных метаболитов генетически трансформированных корней и корней проростков практически идентичны [19]. В наших исследованиях также показано, что культура *hairy roots* *S. roemer* синтезирует экистероиды, характерные для данного вида. При этом уровень биосинтеза 20Е ниже, чем в интактном растении *S. roemer* (0,8% в надземной части, 0,2% в корнях) [13]. Однако нами установлено, что в культуре *hairy roots* синтезируется более разнообразный состав экистероидов (до 21), чем в целых растениях *S. roemer*. В работах по культивированию *in vitro* *A. turkestanica* показано, что состав экистероидов зависит от применяемой биотехнологической системы. Так, в суспензионной культуре данного вида синтезируется только 20Е, в то время как в культуре *hairy roots* обнаружены 20Е, туркестерон, циастерон, циастерон 22-ацетат [11]. Для интактных растений *Serratula quinquefolia* Bieb. ex Willd показана



возможность изменения в направлении биосинтеза экдистероидов и концентрации отдельных экдистероидов при выращивании в различных условиях. Например, происходит переключение биосинтеза экдистероидов с 20Е преимущественно на инокостерон в листья культивируемых растений по сравнению с дикорастущими [20]. Перспективность использования культуры *hairy roots* также подтверждается ее высокой стабильностью по сравнению с каллусной и суспензионной культурами. Например, для *Hyoscyamos muticus* L. показана высокая биосинтетическая способность на протяжении 15 лет культивирования [21]. Следует отметить, что не все системы *hairy roots* экдистероидсодержащих растений способны к биосинтезу экдистероидов. Так, Е. Skala et al. отмечено, что культура *hairy roots Rh. carthamoides* – вида, широко используемого как источник фитоэкдистероидов, не синтезирует данную группу вторичных метаболитов [22].

Известно, что уровень биосинтеза вторичных метаболитов растений в культуре *in vitro*, как правило, ниже, чем в исходном растении. С другой стороны, технология *in vitro* позволяет регулировать накопление биологически активных веществ, оптимизируя питательную среду путем добавления в нее гормонов, элиситоров, предшественников синтеза и подбирая условия культивирования [23]. Так, добавление ацетата натрия ( $150 \text{ мг л}^{-1}$ ), мевалоновой кислоты ( $15$  или  $150 \text{ мг л}^{-1}$ ) и метилжасмоната увеличивало содержание 20Е примерно вдвое для культуры *in vitro A. turkestanica* по сравнению с интактными культурами [11]. В работе N. Reixach et al. на заростках *P. vulgare* в культуре *in vitro* показано, что погружение заростков в воду  $45^\circ\text{C}$  при продолжительности воздействия  $10 \text{ ч}$  приводило к увеличению биосинтеза экдистероидов в  $15\text{--}23$  раза [7]. Период культивирования также оказывает влияние на уровень биосинтеза экдистероидов. Для *A. turkestanica* показано, что содержание 20Е достоверно увеличивалось в процессе культивирования от 4-го к 7-му пассажу [11]. А содержание 20Е в каллусных культурах разных типов эксплантов *S. coronata* изначально составило  $0,001\text{--}0,04\%$ , и лишь на десятый год культивирования его содержание в штамме GI 1.1 достигло  $0,4\%$  [4]. Результаты нашего исследования и анализ литературных данных свидетельствуют о возможности как устойчивого производства метаболически активных фитоэкдистероидов через системы *in vitro*, так и усиления их биосинтеза.

### Заключение

Получена культура *hairy roots* экдистероидсодержащего вида *Silene roemerii*. Оптимизирована методика обнаружения и качественной идентификации экдистероидов в культурах *hairy roots S. roemerii*. Методом ВЭЖХ показано, что данная культура синтезирует 21 экдистероид. По уровню накопления 20Е ( $0,1\%$ ) *hairy roots S. roemerii* можно отнести к культурам с высокой биосинтетической активностью. Проведенные исследования подтверждают перспективность использования данной биотехнологической

системы для более глубокого изучения путей биосинтеза и локализации экдистероидов растений и способов усиления их продукции.

### Литература

1. Roychowdhury D., Majumder A., Jha S. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation in medicinal plants: prospects and challenges // *Biotechnology for Medicinal Plants* / ed. by S. Chandra et al. Berlin Heidelberg : Springer-Verlag, 2013. PP. 29–68. doi: 10.1007/978-3-642-29974-2\_2
2. Bulgakov V.P., Gorpenchenko T.Y., Veremeichik G.N., Shkryl Y.N., Tchernoded G.K., Bulgakov D.V., Aminin D.L., Zhuravlev Y.N. The *rolB* gene suppresses reactive oxygen species in transformed plant cells through the sustained activation of antioxidant defense // *Plant Physiology*. 2012. Vol. 158. PP. 1371–1381. doi: 10.1104/pp.111.191494
3. Thiem B., Kikowska M., Malinski M.P., Kruska D., Napierala M., Florek E. Ecdysteroids: production in plant *in vitro* cultures // *Phytochemistry Reviews*. 2016. PP. 1–20. doi: 10.1007/s11101-016-9483-z [Electronic resource]
4. Филипова В.Н., Володина С.О., Смоленская И.Н., Зоринянц С.Э., Володина В.В. Экдистероиды в культурах клеток *Serratula coronata* и *Ajuga reptans* // *Химия растительного сырья*. 2002. № 1. С. 57–62.
5. Qian J., Yang Y., Li X., Chi D. 20-hydroxyecdysone accumulation and regulation in *Ajuga lobata* D. Don suspension culture // *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 2016. Vol. 80, № 3. PP. 591–599. doi: 10.1080/09168451.2015.1116921
6. Орлова И.В., Лукина В.Г., Володин В.В., Носов А.М. Синтез экдистероидов в растениях и культурах клеток *Rhaponticum carthamoides* Willd. (Iljin) // *Физиология растений*. 1994. Т. 41, № 6. С. 907–912.
7. Reixach N., Lafont R., Camps F., Casas J. Biotransformations of putative phytoecdysteroid biosynthetic precursors in tissue cultures of *Polypodium vulgare* // *European Journal of Biochemistry*. 1999. Vol. 266. PP. 608–615.
8. Corio-Costet M.-F., Chapuis L., Delbecq J.-P. *Serratula tinctoria* L. (Dyer's Savory): *in vitro* culture and the production of ecdysteroids and other secondary metabolites // *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Medicinal and Aromatic Plants IX* / ed. by Y.P.S. Bajaj. 1996. Vol. 37. PP. 384–401.
9. Chamnipa N., Thanonkeo S., Thanonkeo P. Enhance production of 20-hydroxyecdysone in cell suspension cultures of *Vitex glabrata* R.Br. by elicitor feeding // *Journal of Medicinal Plants Research*. 2012. Vol. 6, № 17. PP. 3317–3323. doi: 10.5897/JMPR12.059
10. Messegue J., Mele E., Reixach N., Irurre-Santilari J., Casas J. *Polypodium vulgare* L. (Wood Fern): *in vitro* culture and the production of phytoecdysteroids // *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Medicinal and Aromatic Plants X* / ed. by Y.P.S. Bajaj. 1998. Vol. 41. PP. 333–348.
11. Cheng D.M., Yousef G.G., Grace M.H., Rogers R.B., Gorelick-Feldman J., Raskin I., Lila M.A. *In vitro* production of metabolism-enhancing phytoecdysteroids from *Ajuga turkestanica* // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2008. Vol. 93. PP. 73–83. doi: 10.1007/s11240-008-9345-5
12. Matsumoto T., Tanaka N. Production of ecdysteroid by *hairy root* cultures of *Ajuga reptans* var *autopurpurea* // *Agricultural and Biological Chemistry*. 1991. Vol. 55. PP. 1019–1025.
13. Delbecq J., Beydon P., Chapuis L. *In vitro* incorporation of radiolabelled cholesterol and mevalonic acid into ecdysteroid by *hairy root* cultures of a plant, *Serratula tinctoria* // *European Journal of Entomology*. 1995. Vol. 92. PP. 301–307.
14. Зибарева Л.Н., Еремина В.И. Динамика содержания экдистероидов в видах *Silene* L., выращиваемых в Сибирском ботаническом саду (г. Томск) // *Растительные ресурсы*. 1996. Т. 32, вып. 1–2. С. 106–110.

15. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiologia Plantarum*. 1962. Vol. 15, is. 3. PP. 473–497.
16. Gamborg O.L., Eveleigh D.E. Culture methods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley // *Canadian Journal of Biochemistry*. 1968. Vol. 46, № 5. PP. 417–421.
17. Godoy-Hernandez G., Vazquez-Flota F.A. Growth measurements: estimation of cell division and cell expansion // *Plant Cell Culture Protocols. Series: Methods in Molecular Biology*. 2006. Vol. 318, № 2. PP. 51–58. doi:10.1385/1-59259-959-1:051
18. Kim O.T., Manickavasagam M., Kim Y.J., Jin M.R., Kim K.S., Seong N.S., Hwang B. Genetic transformation of *Ajuga multiflora* Bunge with *Agrobacterium rhizogenes* and 20-hydroxyecdysone production in hairy roots // *Journal of Plant Biology*. 2005. Vol. 48, is. 2. PP. 258–262. doi: 10.1007/BF03030416
19. Вдовитченко М.Ю., Кузовкина И.Н., Пэтц Х., Шнайдер Б. Культивируемые *in vitro* корни копеечника чайного и образование в них фенольных соединений // *Физиология растений*. 2007. Т. 54, № 2. С. 604–613.
20. Володин В.В., Володина С.О., Чадин И.Ф., Пылина Я.И., Бачаров Д.С., Джумырко С.Ф., Бутенко Л.И. Состав экистероидов в дикорастущих и культивируемых растениях *Serratula quinquefolia* Bieb. ex Willd // *Вестник Института биологии Коми НЦ УрО РАН*. 2010. № 4. С. 29–34.
21. Kim Y., Wyslouzil B.E., Weathers P.J. Secondary metabolism of hairy root cultures in bioreactors // *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*. 2002. Vol. 38(1). PP. 1–10. doi: 10.1079/IVP2001243
22. Skala E., Grabkowska R., Sitarek P., Kuzma I., Blauz A., Wysokinska H. *Rhaponticum carthamoides* regeneration through direct and indirect organogenesis, molecular profiles and secondary metabolite production // *Plant Cell Tissue and Organ Cult.* 2015. Vol. 123. PP. 83–98. doi:10.1007/s11240-015-0816-1
23. Giri A., Narasu M.L. Transgenic hairy roots: recent trends and applications // *Biotechnology Advances*. 2000. Vol. 18. PP. 1–22.

Поступила в редакцию 24.10.2016 г.; повторно 23.11.2016 г.;  
принята 26.01.2017 г.; опубликована 25.03.2017 г.

**Авторский коллектив:**

**Эрст Анна Алексеевна** – канд. биол. наук, н.с. лаборатории биотехнологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Центральный сибирский ботанический сад СО РАН (Россия, 630090, г. Новосибирск, ул. Золотодолинская, 101).

E-mail: [annaerst@yandex.ru](mailto:annaerst@yandex.ru)

**Зибарева Лариса Николаевна** – д-р хим. наук, зав. лабораторией фитохимии Сибирского ботанического сада Национального исследовательского Томского государственного университета (Россия, 634050, г. Томск, ул. Ленина, 36).

E-mail: [zibareva.lara@yandex.ru](mailto:zibareva.lara@yandex.ru)

**Железниченко Татьяна Витальевна** – канд. биол. наук, н.с. лаборатории биотехнологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Центральный сибирский ботанический сад СО РАН (Россия, 630090, г. Новосибирск, ул. Золотодолинская, 101).

E-mail: [zhelez05@mail.ru](mailto:zhelez05@mail.ru)

**Ковзунова Ольга Викторовна** – канд. биол. наук, м.н.с. отдела биохимии и биотехнологии растений Государственного научного учреждения Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси (Республика Беларусь, 220012, г. Минск, ул. Сурганова, 2в).

E-mail: [olga-kopa@mail.ru](mailto:olga-kopa@mail.ru)

Erst AA, Zibareva LN, Zheleznicenko TV, Kovzunova OV. Genetically transformed root cultures (*hairy roots*) of *Silene roemerii* Friv. as the source of phytoecdysteroids. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya – Tomsk State University Journal of Biology*. 2017;37:17-30. doi: 10.17223/19988591/37/2 In Russian, English summary

Anna A. Erst<sup>1</sup>, Larisa N. Zibareva<sup>2</sup>, Tatiana V. Zheleznicenko<sup>1</sup>, Olga V. Kovzunova<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Central Siberian Botanical Garden, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

<sup>2</sup> Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation

<sup>3</sup> SSI Central Botanical Garden, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

### Genetically transformed root cultures (*hairy roots*) of *Silene roemerii* Friv. as the source of phytoecdysteroids

The *hairy roots* culture attracts increasing attention of researchers as the system of obtaining valuable secondary metabolites. Investigation of the features of biosynthesis of ecdysteroids by this biotechnological system and evaluation of the parameters of its productivity are important problems in the studies of the directed biosynthesis of secondary metabolites of plants and selection of the lines that are superproducers of biologically active substances. The aim of the research was to obtain *hairy roots Silene roemerii* culture and study the content of phytoecdysteroids in this culture.

We obtained *hairy roots* culture of ecdysteroid-containing species *S. roemerii* by means of *Agrobacterium*-mediated transformation (strain A4 RT). The transformation was carried out according to the following scheme: sterile seedlings were divided into cotyledons, hypocotyls, and roots, pricked with a needle of an insulin syringe and inoculated for 24 hours in the liquid nutrient medium MS containing a suspension of a day-old *A. rhizogenes* agrobacterium. After exposure, the inoculates were washed with the sterile ½ MS medium and placed, for the development of the transformation, in the agar-containing ½ MS medium with antibiotic added (500 mg l<sup>-1</sup> cefotaxime). Two weeks later, after the appearance of root rosettes, they were separated and relocated in the same nutrient medium with cefotaxime. We cultivated *hairy roots* in Gamborg's B<sub>5</sub> medium with an addition of 500 mg l<sup>-1</sup> casein hydrolyzate. The growth index was 8.3-9.6.

We carried out biochemical analysis of thus obtained culture for the concentrations of ecdysteroids by means of high-performance liquid chromatography. We discovered a number of nonpolar and medium-polar ecdysteroids. We established that cultivation is accompanied by the biosynthesis of over 20 ecdysteroids, including integristerone A, 20-hydroxyecdysone, 2-deoxy-20-hydroxyecdysone, and 2-deoxyecdysone. Estimation of the levels of the major ecdysteroid 20-hydroxyecdysone showed that its content was 0.1%. It allows considering *hairy roots S. roemerii* as a culture with a high biosynthetic activity. Our results show that the use of the *hairy roots* cultures of *S. roemerii* are a potential source of phytoecdysteroids and a promising system to study biosynthesis routes, localization of phytoecdysteroids, and methods to improve their products.

The article contains 3 Figures, 3 Tables, 23 References.

**Key words:** *in vitro* culture; HPLC; 20-hydroxyecdysone; medical plants.

**Funding:** This work was partially supported by the Russian Foundation for Basic Research (Grant No 15-54-04083 Bel\_mol\_a).

### References

1. Roychowdhury D, Majumder A, Jha S. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation in medicinal plants: prospects and challenges. In: *Biotechnology for Medicinal Plants*.

- Chandra S. et al., editors. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2013. pp. 29-68. doi: [10.1007/978-3-642-29974-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-29974-2_2)
2. Bulgakov VP, Gorpenchenko TY, Veremeichik GN, Shkryl YN, Tchernoded GK, Bulgakov DV, Aminin DL, Zhuravlev YN. The *rolB* gene suppresses reactive oxygen species in transformed plant cells through the sustained activation of antioxidant defense. *Plant Physiology*. 2012;158(3):1371-1381. doi: [10.1104/pp.111.191494](https://doi.org/10.1104/pp.111.191494)
  3. Thiem B, Kikowska M, Malinski M.P, Kruszka D, Napierała M, Florek E. Ecdysteroids: production in plant *in vitro* cultures. *Phytochemistry Reviews*. 2016;1-20. doi: [10.1007/s11101-016-9483-z](https://doi.org/10.1007/s11101-016-9483-z) [Electronic resource]
  4. Fillipova VN, Volodina SO, Smolenskaya IN, Zorinyants SE, Volodina VV. Ekdisteroidy v kul'turakh kletok *Serratula coronata* i *Ajuga reptans* [Ecdysteroids in cell cultures of *Serratula coronata* and *Ajuga reptans*]. *Khimija Rastitel'nogo Syr'ja – Chemistry of Plant Raw Materials*. 2002;1:57-62. In Russian
  5. Qian J, Yang Y, Li X, Chi D. 20-hydroxyecdysone accumulation and regulation in *Ajuga lobata* D. Don suspension culture. *Bioscience, Biotechnology And Biochemistry*. 2016;80(3):591-599. doi: [10.1080/09168451.2015.1116921](https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1116921)
  6. Orlova IV, Luksha VG, Volodin VV, Nosov AM. Sintez ekdisteroidov v rasteniyakh i kul'turakh kletok *Rhaponticum carthamoides* Willd.(Iljin) [Synthesis of ecdysteroids in plants and cell cultures of *Rhaponticum carthamoides* Willd. (Iljin)]. *Russian Journal of Plant Physiology*. 1994;41(6):907-912. In Russian
  7. Reixach N, Lafont R, Camps F, Casas J. Biotransformations of putative phytoecdysteroid biosynthetic precursors in tissue cultures of *Polypodium vulgare*. *European Journal of Biochemistry*. 1999;266(2):608-615. PMID: [10561604](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10561604/)
  8. Corio-Costet MF, Chapuis L, Delbecque JP. *Serratula tinctoria* L. (Dyer's Savory): *In vitro* culture and the production of ecdysteroids and other secondary metabolites. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Medicinal and Aromatic Plants IX*. Bajaj YPS, editor. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 1996;37:384-401. doi: [10.1007/978-3-662-08618-6\\_23](https://doi.org/10.1007/978-3-662-08618-6_23)
  9. Chamnipa N, Thanonkeo S, Thanonkeo P. Enhance production of 20-hydroxyecdysone in cell suspension cultures of *Vitex glabrata* R.Br. by elicitor feeding. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2012;6(17):3317-3323. doi: [10.5897/JMPR12.059](https://doi.org/10.5897/JMPR12.059)
  10. Messegueur J, Mele E, Reixach N, Irurre-Santilari J, Casas J. *Polypodium vulgare* L. (Wood Fern): *In vitro* culture and the production of phytoecdysteroids. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Medicinal and Aromatic Plants IX*. Bajaj YPS, editor. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 1998;41:333-348. doi: [10.1007/978-3-642-58833-4\\_17](https://doi.org/10.1007/978-3-642-58833-4_17)
  11. Cheng DM, Yousef GG, Grace MH, Rogers RB, Gorelick-Feldman J, Raskin I, Lila MA. *In vitro* production of metabolism-enhancing phytoecdysteroids from *Ajuga turkestanica*. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 2008;93:73-83. doi: [10.1007/s11240-008-9345-5](https://doi.org/10.1007/s11240-008-9345-5)
  12. Matsumoto T, Tanaka N. Production of phytoecdysteroid by hairy root cultures of *Ajuga reptans* var *autropurpurea*. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1991;55(4):1019-1025. doi: [10.1271/bbb1961.55.1019](https://doi.org/10.1271/bbb1961.55.1019)
  13. Delbecque J, Beydon P, Chapuis L. *In vitro* incorporation of radiolabelled cholesterol and mevalonic acid into ecdysteroid by hairy root cultures of a plant, *Serratula tinctoria*. *European Journal of Entomology*. 1995;92:301-307.
  14. Zibareva LN, Eremin VI. Dynamics of the contents of ecdisteroids in species of the genus *Silene* L. grown in Siberian botanical garden (Tomsk city). *Rastitelnye Resursy*. 1996;32(1-2):106-110. In Russian
  15. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*. 1962;15(3):473-497. doi: [10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x)
  16. Gamborg OL, Eveleigh DE. Culture methods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley. *Canadian Journal of Biochemistry*. 1968;46(5):417-421. PMID: [5658143](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5658143/)

17. Godoy-Hernandez G, Vazquez-Flota F. A. Growth measurements: estimation of cell division and cell expansion. *Plant Cell Culture Protocols. Series: Methods in Molecular Biology*. 2006;318(2):51-58. doi: [10.1385/1-59259-959-1:051](https://doi.org/10.1385/1-59259-959-1:051)
18. Kim OT, Manickavasagam M, Kim YJ, Jin MR, Kim KS, Seong NS, Hwang B. Genetic transformation of *Ajuga multiflora* Bunge with *Agrobacterium rhizogenes* and 20-hydroxyecdysone production in hairy roots. *Journal of Plant Biology*. 2005;48(2):258-262. doi: [10.1007/BF03030416](https://doi.org/10.1007/BF03030416)
19. Vdovitchenko MYu, Kuzovkina IN, Paetz Ch, Schneider B. Formation of phenolic compounds in the roots of *Hedysarum theinum* cultured *in vitro*. *Russ J Plant Physiol*. 2007;54(4):536-544. doi: [10.1134/S1021443707040164](https://doi.org/10.1134/S1021443707040164)
20. Volodin VV, Volodina SO, Chadin IF, Pylina YaI, Bacharov DS, Dzhumyrko SF, Butenko LI. The composition of ecdysteroids in wild and cultivated plants *Serratula quinquefolia* Bieb. ex Willd. *Vestnik Instituta Biologii Komi Nauchnogo Centra Ural'skogo Otdeleniya RAN – Vestnik Instituta Biologii, Komi Science Center, UB RAS*. 2010;4:29-34. In Russian
21. Kim Y, Wyslouzil BE, Weathers PJ. Secondary metabolism of hairy root cultures in bioreactors. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 2002;38(1):1-10. doi: [10.1079/IVP2001243](https://doi.org/10.1079/IVP2001243)
22. Skala E, Grabkowska R, Sitarek P, Kuzma L, Blauz A, Wysokinska H. *Rhaponticum carthamoides* regeneration through direct and indirect organogenesis, molecular profiles and secondary metabolite production. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 2015;123:83-98. doi: [10.1007/s11240-015-0816-1](https://doi.org/10.1007/s11240-015-0816-1)
23. Giri A, Narasu ML. Transgenic hairy roots: recent trends and applications. *Biotechnology Advances*. 2000;18:1-22. doi: [10.1016/S0734-9750\(99\)00016-6](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(99)00016-6)

Received 24 October 2016; Revised 23 November 2016;

Accepted 26 January 2017; Published 25 March 2017

#### Author info:

**Erst Anna A**, Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Biotechnology, Central Siberian Botanical Garden, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 101 Zolotodolinskaya Str., 630090 Novosibirsk, Russian Federation.

E-mail: [annaerst@yandex.ru](mailto:annaerst@yandex.ru)

**Zibareva Larisa N**, Dr. Sci. (Chem.), Head of the Laboratory of Phytochemistry, Siberian Botanical Garden of Tomsk State University, 36 Lenin Ave., 634050 Tomsk, Russian Federation.

E-mail: [zibareva.lara@yandex.ru](mailto:zibareva.lara@yandex.ru)

**Zheleznicenko Tatiana V**, Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Biotechnology, Central Siberian Botanical Garden, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 101 Zolotodolinskaya Str., 630090 Novosibirsk, Russian Federation.

E-mail: [zhelez05@mail.ru](mailto:zhelez05@mail.ru)

**Kovzunova Olga V**, Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Department of Biochemistry and Plant Biotechnology, State Scientific Institution Central Botanical Garden, National Academy of Sciences of Belarus, 2c Surganova Str., 220012 Minsk, Republic of Belarus.

E-mail: [olga-kopa@mail.ru](mailto:olga-kopa@mail.ru)