

Получение культуры «бородатых» корней *Glycyrrhiza uralensis*: первичная оценка ростовых характеристик и содержания фенольных соединений

Obtaining *Glycyrrhiza uralensis* “hairy” roots: primary assessment of growth characteristics and content of phenolic compounds

Андрейчук Д. Д.^{1,2}, Асбаганов С. В.¹, Амброс Е. В.¹, Новикова Т. И.¹

Andreychuk D. D.^{1,2}, Asbaganov S. V.¹, Ambros E. V.¹, Novikova T. I.¹

¹ Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, г. Новосибирск, Россия. E-mail: d.andreichuk@g.nsu.ru

¹ Central Siberian Botanical Garden SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск, Россия

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Реферат. Широкое использование и неконтролируемый сбор дикорастущих растений солодки уральской (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch. ex DC.) в качестве сырья для фармакологии и пищевой промышленности определяет перспективность системы «бородатых» корней (БК) для получения ценных вторичных метаболитов. Целью исследования является разработка эффективного протокола агробактериальной трансформации *Rhizobium rhizogenes* различных типов эксплантов 30-ти дневных микрорастений *G. uralensis*: семядолей, первичных побегов, гипокотилей и первичных корней. В работе исследовано влияние 100 мкМ ацетосирингона, варьирование времени сокультивирования (2 и 4 ч) на эффективность процесса трансформации двумя штаммами *R. rhizogenes* 15834 SWISS и MSU 440. Определен наиболее вирулентный штамм (15834 SWISS, частота трансформации – 39,64 %), время инфицирования (2 ч) и компетентные типы эксплантов для трансформации штаммом (семядоли, первичные побеги, первичные корни). В результате первичной селекции отобрано 12 линий стабильно растущих культур БК. ПЦР-анализ показал, что все отобранные линии содержат гены *rolB* и *rolC*, ген *virC* отсутствует. Определено, что 4 линии характеризуются высокой скоростью роста, 3 характеризуются высоким суммарным содержанием фенольных соединений. Насколько нам известно, это первый протокол получения культуры «бородатых» корней у *G. uralensis* с использованием штаммов *R. rhizogenes* 15834 SWISS и MSU 440.

Ключевые слова. «Бородатые» корни, динамика роста, суммарное содержание фенольных соединений, *Glycyrrhiza uralensis*, *Rhizobium rhizogenes*, *rol*-гены.

Summary. Widespread use and uncontrolled harvesting of wild plants of Ural licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch. ex DC.) as a raw material for pharmacology and the food industry determines the promise of the system of “hairy” roots for obtaining valuable secondary metabolites. The aim of the research is to develop an effective protocol for the agrobacterial transformation of *Rhizobium rhizogenes* of various types of explants of 30-day-old *G. uralensis* microplants: cotyledons, primary shoots, hypocotyls, and primary roots. The effect of 100 μM acetosyringone, variation of the cocultivation time (2 and 4 h) on the efficiency of the transformation process by two strains of *R. rhizogenes* 15834 SWISS and MSU 440 was studied. infection (2 h) and competent types of explants for transformation with the strain (cotyledons, primary shoots, primary roots). As a result of primary selection, 12 lines of stably growing BK cultures were selected. PCR analysis showed that all selected lines contain the *rolB* and *rolC* genes, while the *virC* gene is absent. It was determined that 4 lines are characterized by a high growth rate, 3 are characterized by a high total content of phenolic compounds. To the best of our knowledge, this is the first protocol for obtaining a culture of hairy roots from *G. uralensis* using strains *R. rhizogenes* 15834 SWISS and MSU 440.

Key words. *Glycyrrhiza uralensis*, growth dynamics, “hairy” roots, *Rhizobium rhizogenes*, *rol*-genes, total content of phenolic compounds.

Солодка уральская (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch. ex DC.) востребованное пищевое и лекарственное растение из семейства Fabaceae с широким спектром фармакологического действия. Исследованиями подтверждено противовирусное, противоопухолевое, противовоспалительное, антиоксидантное, им-

муномодулирующее, противодиабетическое, противоастматическое, противоаллергическое действия *G. uralensis* (Wang et al., 2019). Лекарственные свойства *G. uralensis* обусловлены высоким содержанием ценных вторичных метаболитов в корнях и надземной части растений. Корни и корневища солодки содержат значимые с фармакологической точки зрения флавоноиды (3–4 %) и тритерпеновые сапонины – глицирризиновую кислоту (около 20 %). Сладкий вкус корней солодки достигается благодаря содержанию в них глицирризиновой кислоты, которая в 30–50 раз слаще сахарозы. Среди флавоноидов наиболее важны флавонол и халкон, а также их изоформы – ликуразид, кемпферол, ликвиритозид, ликвиритин, изоликвиритин, неоликвиритин, рамноликвиритин, уралозид, рамноизоликвиритин и др., обуславливающие применение препаратов солодки в качестве антиоксидантных средств (Asl, Hosseinzadeh, 2008). Надземные части растений *G. uralensis* также содержат ликвиритин, геникозан-1 и декагидроизохинолин-2 и другие важные с медицинской точки зрения соединения, оказывающие значительное противовоспалительное действие (Jiang et al., 2021).

Растущий спрос на сырье *G. uralensis* на внутреннем и внешнем рынках, неконтролируемый сбор дикорастущих растений и другие негативные факторы определили необходимость включения вида в Красные книги Читинской области и Агинского Бурятского автономного округа (Попова, Ткачук, 2017) в качестве уязвимого. Более того, поиск альтернативных подходов, способствующих сохранению экосистем и удовлетворению потребностей рынка становится очевидной необходимостью. Перспективной системой для получения ценных вторичных метаболитов растительного происхождения являются «бородатые» корни (БК) растений, которые образуются при инфицировании растений почвенной граммотрицательной бактерией *Rhizobium rhizogenes*. К преимуществам использования культур БК как альтернативных источников растительного сырья относятся: экологическая чистота производства и получаемого продукта, гарантированный выход целевых продуктов независимо от сезонных и погодных условий, высокая продуктивность, простота экстракции целевых метаболитов, отсутствие в культурах токсичных веществ возможность масштабирования процесса путем использования биореакторов (Verpoorte et al., 2002; Носов, 2010; Hussain et al., 2012; Решетников и др., 2014). Способность синтезировать собственные фитогормоны обеспечивает быстрый рост БК в питательных средах без регуляторов роста (Chandra, Chandra, 2011). Целью данного исследования является оптимизация процесса генетической трансформации различных типов эксплантов *G. uralensis* с использованием *R. rhizogenes* (добавление ацетосирингона, варьирование времени инфицирования), получение культуры БК и оценка: трансгенного статуса, ростовых характеристик и суммарного содержания фенольных соединений в БК по сравнению с нативными растениями.

Материалы и методы. *Растительный материал, бактериальные штаммы, трансформация.* В качестве исходного материала использовали 30-ти дневные культуры *in vitro* *G. uralensis*. Трансформацию четырех типов эксплантов (первичных побегов, семядолей, корней, гипокотилей) растений проводили двумя штаммами *R. rhizogenes* 15834 SWISS, MSU 440. Для инфицирования экспланты, уколотые иглой инсулинового шприца, помещали в 48-часовую бактериальную суспензию плотностью $OD_{600} = 0,6–0,8$ ОЕ, приготовленную на основе жидкой среды Мурасиге-Скуга (МС; Murashige, Skoog, 1962), на 2 или 4 часа с добавлением 100 мкМ ацетосирингона или без него. Затем экспланты сокультивировали на агаризованной безгормональной среде МС в течение 48 часов, после чего промывали стерильной водой с цефтриаксоном в концентрации 1 г/л и переносили на агаризованную безгормональную среду МС с 500 мг/л цефтриаксона. Через 30–40 дней жизнеспособные экспланты пересаживали на безгормональную среду МС с 250 мг/л цефтриаксона и культивировали в течение 30 дней. Контаминированные экспланты и экспланты, значительная часть которых состояла из некротических тканей, удаляли. Следующую пересадку также производили на безгормональную среду МС с 250 мг/л цефтриаксона. Методика отбора эксплантов сохранялась той же, что и в предыдущем пассаже, при этом удаляли экспланты, не образующие корней, так как считали, что те не прошли трансформацию (Van de Velde et al., 2003). Частоту трансформации рассчитывали как – соотношение количества трансформированных эксплантов к общему их количеству. Эксперименты по агробактериальной трансформации проводили в двух повторностях по 10–15 эксплантов на повторность.

ПЦР (полимеразная цепная реакция) – анализ культуры БК. ДНК выделена модифицированным методом СТАВ. Сухие образцы (5 мг) растирали с 600 мкл лизирующего буфера, оставляли на ночь при комнатной температуре, предварительно поставив в термостат на 30 мин при 60 °С с периодическим перемешиванием. При выделении использовали лизирующий СТАВ-буфер (2,5 %), с добавлени-

ем 0,2 % меркаптоэтанола. Для проведения реакции использовали праймеры для определения генов *rol C*, *rol B*, подтверждающих трансгенный статус полученных образцов, и праймеры для гена *vir C*, в норме не встраивающегося в ДНК растений и ответственного за вирулентность агробактерий. При проведении ПЦР программа включала 3 мин денатурации при 94 °С, 35 циклов 94 °С – 20 с, 55 °С – 40 с, 72 °С – 60 с для *rol C* и 35 циклов 94 °С – 10 с, 65 °С – 20 с, 72 °С – 30 с для *rol B* и *vir C*, заканчивалась реакция финальной элонгацией при 72 °С 5 минут. В модифицированной методике для *rol B* и *vir C* после денатурации следовали три цикла с пониженной температурой отжига праймеров для увеличения селективности реакции (94 °С – 10 с, 57 °С – 60 с, 72 °С – 10 с) и 30 циклов с повышенной температурой отжига для увеличения количества продуктов реакции (94 °С – 10 с, 65 °С – 20 с, 72 °С – 30 с) (Khanuja et al., 1999).

Оценка ростовых характеристик БК и общего содержания фенольных соединений (ФС). Динамику изменения длины корней оценивали через 7 суток на агаризованной среде МС. Цикл культивирования составил 73 дня. Общее содержание фенольных соединений оценивали методом Фолина-Чокальтеу с модификациями (Николаева и др., 2021) в трех биологических и трех аналитических повторностях. Для сравнения использовали нативные корни и листья *G. uralensis*. Данные представлены в виде средних значений и стандартных ошибок ($M \pm m$). Для сравнения средних значений независимых выборок использовали многограновый тест Дункана (однофакторный дисперсионный анализ) при $p < 0,05$. Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 8.0.

Результаты и обсуждение. Корнеобразование отмечено на 14 день. Трансформация разными агробактериальными штаммами имела неодинаковую эффективность и зависела от используемого штамма и типа эксплантов. Наиболее вирулентным из используемых штаммов оказался 15834 SWISS с частотой трансформации 39,64 % (рис. 1А). Компетентность эксплантов к трансформации данным штаммом увеличивалась в ряду гипокотиль (12,69 %) – семядоля (23,88 %) – первичный побег (26,87 %) – первичный корень (36,57 %) (рис. 1Б). Процент трансформации штаммом MSU 440 был в 2,5 раза меньше (рис. 1В), а компетентность эксплантов к трансформации изменялась в ряду первичный

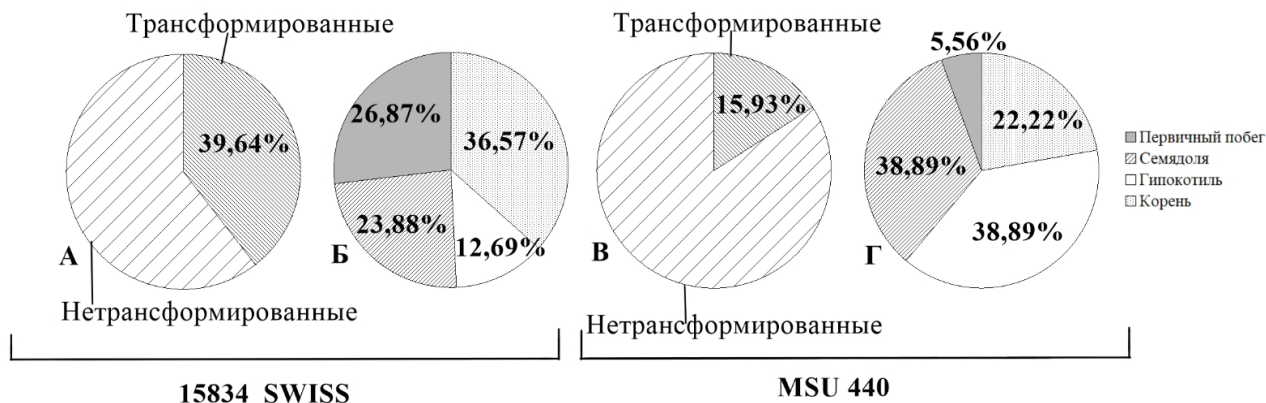


Рис. 1. Частота трансформации при инфицировании эксплантов штаммами 15834 SWISS (А) и MSU 440 (В), доля трансформированных эксплантов различных типов штаммами 15834 SWISS (Б) и MSU 440 (Г).

побег (5,56 %) – первичный корень (22,22 %) – гипокотиль (38,89 %) – семядоля (33,33 %) (рис. 1Г).

Добавление ацетосиригона не оказало значительного влияния на вирулентность в отличие от продолжительности инфицирования (рис. 2В–Е). Процент трансформации для штамма 15834 SWISS при инфицировании эксплантов в течение 2 ч увеличивался в 1,6 раза относительно вариантов с экспозицией в течение 4 ч (рис. 2А–Б).

Каждый образовавшийся корень считали отдельной линией и пересаживали в отдельные чашки Петри для проведения первичной селекции. В дальнейшем для проведения экспериментов по оценке ростовых характеристик и общего содержания ФС отобраны 12 линий стабильно растущих корневых культур, происхождение которых представлено на рис. 3.

ПЦР-анализ генов *rol B* и *rol C* показал, что полученные линии подтвердили трансгенный статус. Анализ *vir C* подтвердил отсутствие бактериальной контаминации в корневых культурах (рис. 4).

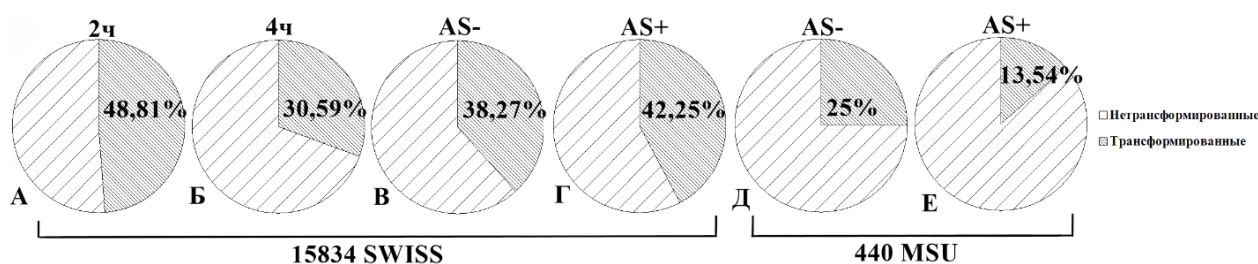


Рис. 2. Частота трансформации штаммами 15834 SWISS (А–Г) и MSU440 (Д, Е), в зависимости от присутствия ацетосирингона и времени инфицирования.



Рис. 3. Происхождение отобранных линий БК (А), внешний вид БК линии СУБК-10 через 68 суток культивирования на питательной среде Мурашиге-Скуга (Б).

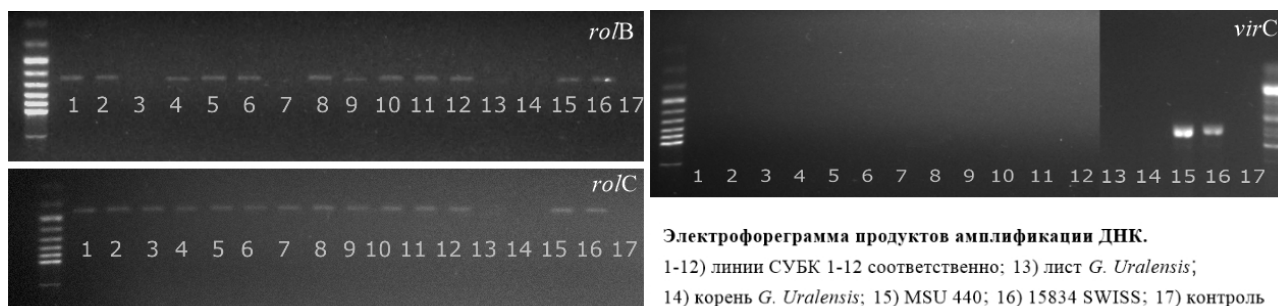


Рис. 4. ПЦР-анализ бородачатых корней *Glycyrrhiza uralensis* с праймерами к генам *rolB*, *rolC*, *virC*.

При оценке скорости роста корней к быстрорастущим отнесены линии СУБК-1, 6, 9 и 10 (рис. 5А). Средняя длина корня у этих линий за время наблюдения увеличилась в 10,97, 8,54, 8,59, 10,98 раз, соответственно. Линии СУБК-4, 5, 7 и 12 характеризовались средней скоростью роста корней, их длина увеличилась в 4,01, 4,65, 6,19, 5,01 раз, соответственно. Корни линий СУБК-2 (рис. 5Б) оказались медленно растущими при увеличении длины корней в 2,40, 2,26, 1,95, 2,63 раз.

В зависимости от содержания фенольных соединений и скорости роста отобраны продуктивные линии СУБК-5, 10, 12 с хорошим приростом корней за цикл культивирования и относительно высоким суммарным содержанием фенольных соединений (таблица). Особого внимания заслуживает линия СУБК-10 (рис. 3Б), характеризующаяся стремительным ростом корней на твердой питательной среде и наибольшим средним приростом корней за цикл культивирования. Концентрация фенольных соединений в корнях этой линии близка к таковой в нативных корнях, что определяет перспективность для дальнейшего изучения культуры БК *G. uralensis* в качестве источника накопления ценных вторичных метаболитов, используемых в медицине, в том числе под действием элиситоров абиогенной и биогенной природы.

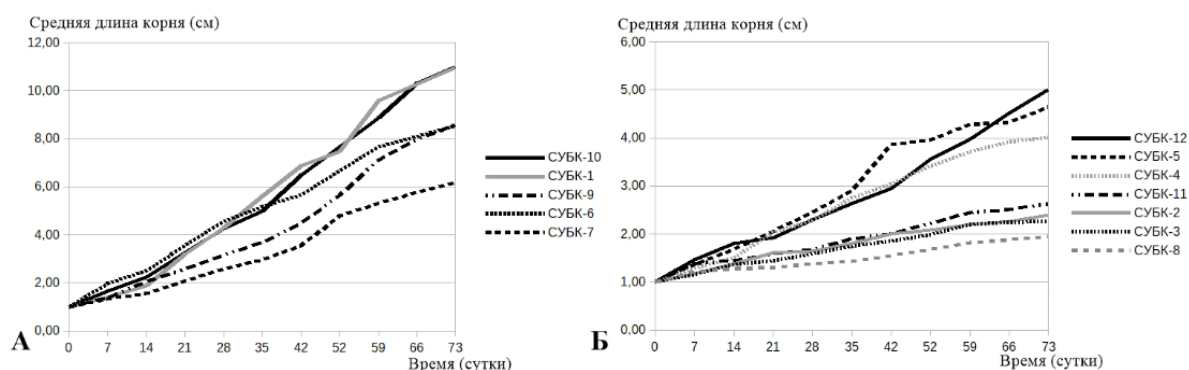


Рис. 5. Динамика изменения средней длины корня у БК *Glycyrrhiza uralensis*.

Таблица
Суммарное содержание фенольных соединений в образцах и средний прирост корней у отобранных линий *Glycyrrhiza uralensis* в конце цикла культивирования

Линии	Суммарное содержание фенольных соединений, мг-эквивалент галловой к-ты/г сухой массы	Прирост корней, см	Линии	Суммарное содержание фенольных соединений (мг-эквивалент галловой к-ты/г сухого в-ва) ± ошибка среднего	Прирост корней, см
СУБК-1	5,51 ± 0,37 ab	9,96 ± 1,56 b	СУБК-9	5,00 ± 0,36 ab	7,59 ± 1,49 b
СУБК-3	4,67 ± 0,21 a	1,26 ± 0,21 a	СУБК-10	7,45 ± 1,12 c	9,98 ± 1,08 b
СУБК-4	7,86 ± 0,27 c	3,01 ± 0,43 a	СУБК-12	7,34 ± 0,28 c	4,01 ± 0,73 a
СУБК-5	6,32 ± 0,06 bc	3,65 ± 0,86 a	Лист нативного растения	14,68 ± 0,19 d	–
СУБК-6	4,81 ± 0,04 ab	7,54 ± 1,19 b	Корень нативного растения	11,56 ± 0,51 e	–

Примеч.: Данные представлены в виде средних значений и стандартных ошибок ($M \pm m$); значения в столбцах, обозначенные разными буквами, имеют статистически значимое отличие друг от друга в соответствии с тестом Дункана ($p < 0,05$).

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ЦСБС СО РАН № АААА-А21-121011290025-2 по проекту «Оценка морфогенетического потенциала популяций растений Северной Азии экспериментальными методами».

ЛИТЕРАТУРА

- Николаева Т. Н., Лапшин П. В., Загоскина Н. В.** Метод определения суммарного содержания фенольных соединений в растительных экстрактах с реактивом Фолина-Дениса и реактивом Фолина-Чокальтеу: модификация и сравнение // Химия растительного сырья, 2021. – № 2. – С. 291–299. DOI: 10.14258/jcrpm.2021028250
- Носов А. М.** Использование клеточных технологий для промышленного получения биологически активных веществ растительного происхождения // Биотехнология, 2010. – Т. 5. – С. 8–28.
- Попова О. А., Ткачук Т. Е.** *Glycyrrhiza uralensis* // Красная книга Забайкальского края. – Новосибирск, ООО «Дом мира», 2017. – С. 129–130.
- Решетников В. Н., Спиридович Е. В., Носов А. М.** Биотехнология растений и перспективы ее развития // Физиология растений и генетика, 2014. – Т. 46, №1. – С. 3–18.
- Asl M. N., Hosseinzadeh H.** Review of pharmacological effects of *Glycyrrhiza* sp. and its bioactive compounds // Phytother. Res., 2008. – Vol. 22. – P. 709–724. DOI: 10.1002/ptr.2362
- Chandra S., Chandra R.** Engineering secondary metabolite production in hairy roots // Phytochem. Rev., 2011. – Vol. 10. – P. 371–395. DOI: 10.1007/s11101-011-9210-8

Hussain M. S., Fareed S., Ansari S., Rahman M. A., Ahmad I. Z., Saeed M. Current approaches toward production of secondary plant metabolites // *Pharm Bioallied Sci.*, 2012. – Vol. 4(1). – P. 10–20. DOI: 10.4103/0975-7406.92725. PMID: 22368394; PMCID: PMC3283951.

Jiang L., Akram W., Luo B., Hu S., Faruque M. O., Ahmad S., Yasin N. A., Khan W. U., Ahmad A., Shikov A. N., Chen J., Hu X. Metabolomic and Pharmacologic Insights of Aerial and Underground Parts of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. ex DC. for Maximum Utilization of Medicinal Resources // *Front. Pharmacol.*, 2021. – Vol. 12. – 658670. DOI: 10.3389/fphar.2021.658670

Khanuja S. P., Shasany A. K., Darokar M. et al. Rapid Isolation of DNA from Dry and Fresh Samples of Plants Producing Large Amounts of Secondary Metabolites and Essential Oils // *Plant Molecular Biology Reporter*, 1999. – Vol. 17. – P. 4. DOI: 10.1023/A:1007528101452.

Murashige T., Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures // *Plant Physiology*, 1962. – Vol. 15. – P. 473–497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

Ross I. A. Medicinal plants of the world: Volume 3 Chemical constituents, traditional and modern medicinal uses // Humana Press Inc., New Jersey, 2005. – P. 623. DOI: 10.1016/j.phytochem.2005.11.029

Van de Velde W., Karimi M., Den Herder G., Van Montagu M., Holsters M., Goormachtig S. *Agrobacterium rhizogenes* – mediated transformation of plants // *Genetic Transformation of Plants* / J. F. Jackson, H. F. Linskens (eds.). – Berlin-Heidelberg: Springer, 2003. – P. 23–44. DOI: 10.1007/978-3-662-07424-4_2

Verpoorte R., Contin A., Memelink J. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites // *Phytochemistry Reviews*, 2002. – P. 13–25. DOI: 10.1023/A:1015871916833

Wang L., Zhang K., Han S., Zhang L., Bai H., Bao F., Zeng Y., Wang J., Du H., Liu Y., Yang Z. Constituents Isolated from the Leaves of *Glycyrrhiza uralensis* and Their Anti-Inflammatory Activities on LPS-Induced RAW264.7 Cells // *Molecules*, 2019. – Vol. 24. – P. 1923. DOI: 10.3390/molecules24101923