

УДК 582.736:581.143.6:577.13

СИНТЕЗ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В КУЛЬТУРЕ «БОРОДАТЫХ» КОРНЕЙ *ASTRAGALUS PENDULIFLORUS* LAM.

© *Е.В. Амброс**, *О.В. Коцуний*, *Т.А. Кукушкина*, *Т.В. Железниченко*, *Т.И. Новикова*

Центральный сибирский ботанический сад СО РАН,
ул. Золотодолинская, 101, г. Новосибирск, 630090 (Россия),
e-mail: ambros_ev@mail.ru

Проведена *Agrobacterium rhizogenes* – опосредованная трансформация лекарственного растения *Astragalus penduliflorus* Lam. с использованием диких штаммов А4-RT, R-1601, 15834 SWISS. По компетентности к трансформации испытывали три типа эксплантов: гипокотили, семядоли и первичные побеги проростков. Определен вирулентный штамм (15834 SWISS) и типы эксплантов для трансформации (первичные побеги и семядоли), характеризующиеся высокими индексами роста (I). Частота трансформации семядолей штаммом 15834 SWISS через 4 недели культивирования составила 15.4% (I = 59.6), гипокотилей – 9.1% (I = 7.3) и первичных побегов – 37.5% (I = 21.0). При пролонгированном культивировании (в течение 8 недель культивирования) I увеличивался в 4.5 раза для первичных побегов (I = 94.5 ± 0.20) и семядолей (I = 265.8 ± 0.35), для культур из гипокотилей – в 5.97 раз (43.6 ± 0.30). Методом ПЦР с праймерами к агробактериальным *rolB* и *virC* генам подтверждена трансгенная природа корней и отсутствие бактериального загрязнения. Отобраны линии «бородатых» корней, характеризующиеся активным приростом биомассы с высоким содержанием биологически активных веществ (БАВ), причем содержание БАВ в культуре «бородатых» корней превосходило их содержание в корнях растений-интродуцентов. Максимальное содержание веществ обнаружено в культурах из первичных побегов (пектинов – 7.8%, протопектинов – 15.3%) и семядолей (дубильных веществ – 16.1%, тритерпеновых сапонинов – 30.5%) при пролонгированном культивировании (в течение 8 недель). Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в гидролизатах экстрактов «бородатых» корней из первичных побегов обнаружены 2 агликона флавонолов: кверцетин и изорамнетин, в этанольных экстрактах «бородатых» корней из семядолей и первичных побегов – кверцетин и 4 флавоноидных компонента. В культуре из семядолей максимальное содержание фенольных соединений (ФС) достоверно не отличалось на 8 и 12 неделях (1.38 ± 0.01 и 1.49 ± 0.06%, от абсолютно сухой массы сырья соответственно). Содержание ФС в культуре из первичных побегов достоверно возрастало в 2 раза с 4 по 12 неделю культивирования (до 1.24 ± 0.18%). Насколько нам известно, это первый протокол получения культуры «бородатых» корней у *A. penduliflorus* с использованием *A. rhizogenes*.

Ключевые слова: *Astragalus penduliflorus* Lam., «бородатые» корни, пролонгированное культивирование, дубильные вещества, катехины, пектины, протопектины, тритерпеновые сапонины, флавоноиды, ВЭЖХ.

Работа выполнена в рамках государственного задания ЦСБС СО РАН № АААА-А17-117012610051-5 по проекту «Оценка морфогенетического потенциала популяций растений Северной Азии экспериментальными методами». При подготовке публикации использовались материалы биоресурсной научной коллекции ЦСБС СО РАН «Коллекции живых растений в открытом и закрытом грунте», УНУ № УСУ 440534.

Введение

Амброс Елена Валерьевна – кандидат биологических наук, научный сотрудник, e-mail: ambros_ev@mail.ru
Коцуний Ольга Викторовна – кандидат биологических наук, научный сотрудник, e-mail: olnevaster@gmail.com
Кукушкина Татьяна Абдулхаировна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, e-mail: kukushkina-phyto@yandex.ru
Железниченко Татьяна Витальевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, e-mail: zhelez05@mail.ru
Новикова Татьяна Ивановна – доктор биологических наук, заведующий лабораторией, e-mail: tin27@mail.ru

Astragalus penduliflorus Lam. (*Fabaceae* Lindl.) – многолетнее травянистое растение из секции *Cenantrum* Koch., обладающее лекарственными свойствами. В современной систематике нет единого мнения насчет объема и границ комплекса видов *Astragalus penduliflorus* – *A. propinquus* Schischkin – *A. membranaceus* (Fischer) Bunge – *A. mongholicus* Bunge. В разные годы исследова-

* Автор, с которым следует вести переписку.

тели определяли их в качестве самостоятельных видов [1], либо как один полиморфный вид *A. penduliflorus* с расами [2], либо *A. mongholicus* выделен в самостоятельный вид, а *A. membranaceus* и *A. propinquus* объединены в *A. penduliflorus* [3]. По мнению С.Н. Выдриной [4], обнаруженные различия в размерах цветка, экологии и географии не позволяют отождествлять западно-европейский *A. penduliflorus* с азиатскими видами. Часть зарубежных исследователей рода понимают *A. penduliflorus* широко, с многочисленными расами [5] и широким ареалом [6], другие же придерживаются узкого понимания границ таксона и его ареала. В нашей статье мы придерживаемся точки зрения s. s. и описываем *A. penduliflorus* как европейский арктоальпийский вид, произрастающий на субальпийских лугах и склонах в восточной и центральной частях Пиренеев, Альп, Карпат и центральной части Швеции [7].

В связи с этим при изучении истории фитохимических исследований корня астрагала необходимо принимать во внимание, что в сводках по фармакокинетике растений три близких вида *A. propinquus*, *A. membranaceus* и *A. mongholicus* нередко отмечают под названием *A. penduliflorus* s.l. [8]. В традиционной китайской медицине корни растений *A. penduliflorus* наряду с корнями близких видов *A. membranaceus*, *A. propinquus* и *A. mongholicus* широко применяются в качестве лекарственных средств, поэтому они довольно хорошо изучены с биохимических и фармакологических позиций [9]. В отечественной и тибетской народной медицине порошок из корня *A. penduliflorus* s.l. используется в качестве сильнодействующего мочегонного средства [10]. Исследованиями подтверждено иммуностимулирующее, антиоксидантное, кардиотоническое, гепатопротекторное, противодиабетическое, противоопухолевое, антибактериальное, противовирусное и ранозаживляющее действие корней астрагала [11, 12, 13, 14, 15, 16]. Фармакологический эффект *A. penduliflorus* определяется преимущественно такими группами веществ, как полисахариды, кумарины, дубильные вещества, тритерпеновые сапонины (астрагалозиды), фенольные соединения [17]. В различных частях растений *A. membranaceus* и *A. mongholicus* найдены флавоноиды (флавонолы, изофлавоны и изофлаваны) [18, 19, 20, 21, 22] и птерокарпаны [20].

Корень астрагала чрезвычайно востребован во всем мире, особенно в Юго-Восточной Азии и Японии. При оценке рынка в Китае потребность в сырье составляет около 6 миллионов кг корней в год и постоянно увеличивается [23]. Очевидно, что растущие потребности мирового рынка в этом ценном сырье не могут удовлетворить природные ресурсы и плантационное выращивание растений. В этой связи научный и практический интерес представляет получение биологически активных соединений с помощью биотехнологических подходов, в частности метода трансформации растений грамотрицательной почвенной бактерией *Agrobacterium rhizogenes* (Riker *et al.*) Conn, индуцирующей образование «бородатых» корней. Применение культуры трансформированных корней целесообразно в промышленных масштабах ввиду высокой ростовой активности в отсутствие экзогенных регуляторов роста и способности продуцировать широкий спектр вторичных метаболитов растительного происхождения круглогодично [24]. В настоящее время разработаны технологии получения «бородатых» корней *A. membranaceus de novo*, в которых синтезируются сапонины (астрагалозиды), изофлавоноиды и полисахариды, сопоставимые или превышающие по количеству соединений и фармакологической активности экстрактов интактных растений [23, 25]. Работы по получению культуры «бородатых» корней *A. penduliflorus* Lam. s.s. по нашим данным отсутствуют. Более того, этот таксон мало изучен как с биохимических, так и фармакологических позиций.

Цель данных исследований – получение культуры «бородатых» корней и первичный анализ линий *A. penduliflorus* Lam. s.s. западно-европейского происхождения по содержанию биологически активных веществ. В соответствии с заявленной целью поставлены следующие задачи: (а) индуцировать образование «бородатых» корней *A. penduliflorus* и оценить вирулентность различных штаммов *A. rhizogenes*; (б) выявить морфогенный потенциал *in vitro* различных типов эксплантов *A. penduliflorus*; (в) подтвердить трансгенный статус культуры «бородатых» корней; (г) провести анализ содержания биологически активных веществ (БАВ) и (д) оценить качественный состав и содержание фенольных соединений (ФС) в культуре «бородатых» корней *A. penduliflorus* по сравнению с интактными растениями.

Экспериментальная часть

Растительный материал и условия культивирования in vitro. В качестве исходного материала использовали зрелые семена *A. penduliflorus* западно-европейской флоры, собранные от растений из коллекции, поддерживаемой на интродукционном участке лаборатории редких и исчезающих растений Центрального

сибирского ботанического сада СО РАН (Новосибирск) (рис. 1а, б). Исходные семена получены по Делектусу № 15836 из Венгрии в 1987 году. Семена стерилизовали ступенчато: 70%-м раствором этилового спирта (время стерилизации семян составило 2 мин), затем 1%-м раствором гипохлорита натрия (время стерилизации – 15 мин) с последующим трехкратным промыванием в стерильной дистиллированной воде (по 10 мин). Для снятия экзогенного физического покоя проведена механическая скарификация с помощью наждачной бумаги. Семена *A. penduliflorus* проращивали на безгормональной среде Гамборга-Эвелега – В₅ [26], дополненной 6.0 г/л бактоагара (Испания) с рН среды 5.5 до автоклавирования (121 °С, 20 мин, 1.05 кг · см⁻²). Проростки культивировали при температуре 25±2 °С в условиях 16-часового фотопериода при освещении люминесцентными лампами холодного белого света с интенсивностью 3000 люкс (36 W, Philips) в течение трех недель.

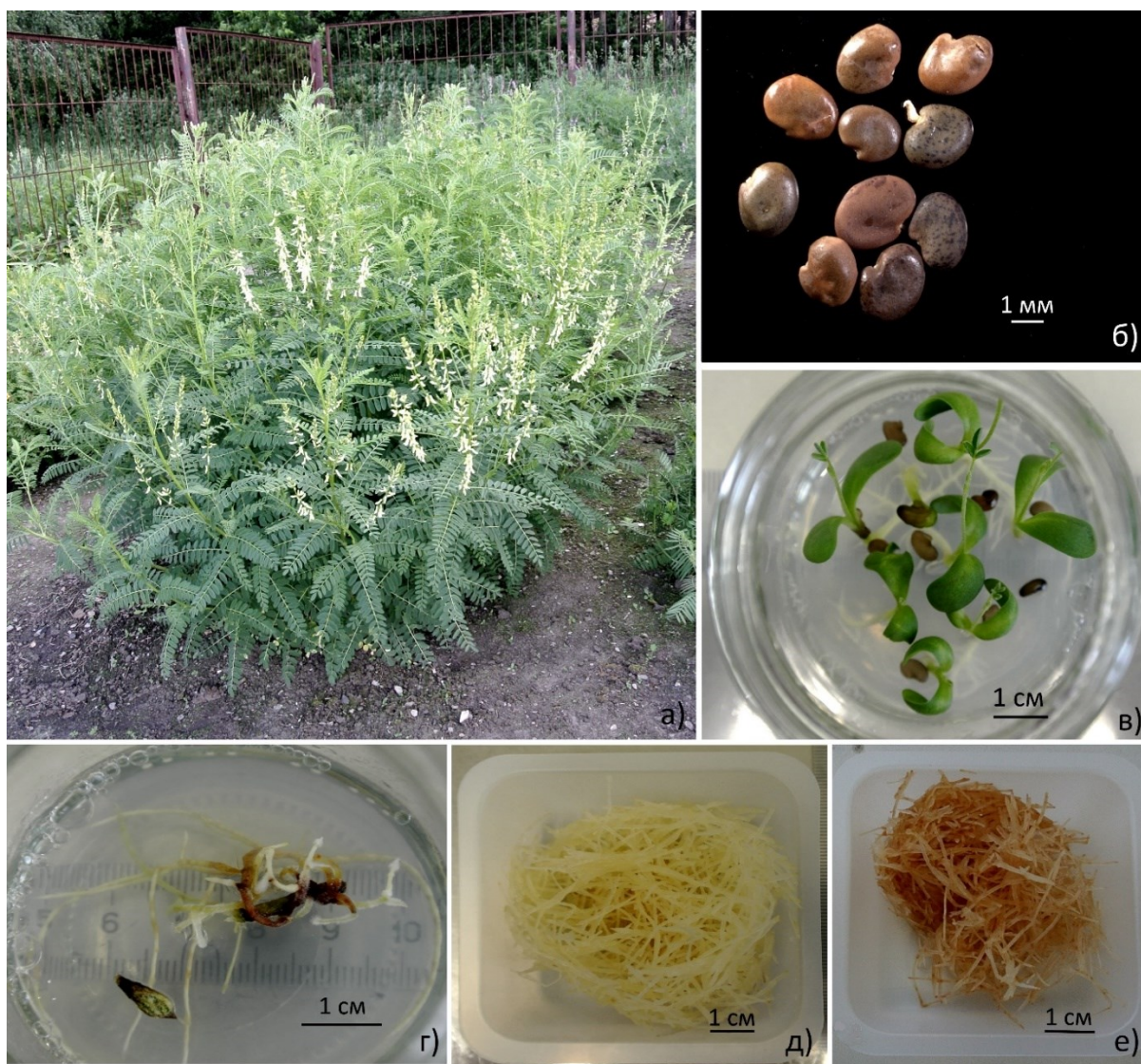


Рис. 1. Интродуцированное растение *A. penduliflorus* (а); семена *A. penduliflorus*, используемые в качестве исходного материала (б); проростки *A. penduliflorus* через 3 недели культивирования на безгормональной среде В₅, используемые для трансформации *A. rhizogenes* (в); ризогенез, индуцированный *A. rhizogenes* (штамм 15834 SWISS) из первичных побегов ювенильных растений *A. penduliflorus* через 8 недель культивирования на среде В₅ с 250 мг/л цефотаксима (г); «бородатые» корни *A. penduliflorus* через 4 недели культивирования в жидкой безгормональной среде В₅ (д); «бородатые» корни *A. penduliflorus* через 8 недель культивирования в жидкой безгормональной среде В₅ (е)

Индукция «бородатых» корней и элиминация A. rhizogenes. Через три недели культивирования (рис. 1в) проводили трансформацию трех типов эксплантов (гипокотилей, семядолей и первичных побегов проростков)

дикими штаммами *A. rhizogenes* A4-RT, R-1601, 15834 SWISS. Штаммы были любезно предоставлены И.Н. Кузовкиной (Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Россия). Экспланты накалывали иглой инсулинового шприца и помещали в жидкую питательную среду B₅, содержащую суспензию 48-часовой почвенной бактерии (оптическая плотность при OD₆₀₀ = 0.2). Контрольные экспланты тоже накалывали иглой инсулинового шприца и помещали в жидкую питательную среду B₅ без бактерий. Через 24 ч инкубации в бактериальной суспензии экспланты промывали стерильной средой и переносили на безгормональную агаризованную питательную среду B₅, содержащую 500 мг/л цефотаксима (Россия) для элиминации бактерии. На данном этапе оценивали частоту трансформации – соотношение количества трансформированных эксплантов к общему их количеству. Отбор «бородатых» корней, образующихся на эксплантах, осуществляли визуально по характерным фенотипическим признакам (разветвленность, опушенность, способность к росту на безгормональной среде) [27]. Последующие два пассажа корни культивировали на безгормональной агаризованной среде B₅, содержащей уменьшенную дозу антибиотика (250 мг/л) для полной элиминации бактерии, причем при первой пересадке часть ювенильного растения оставляли для сохранения ростовой активности корней. Каждый корневой эксплант был размножен как отдельная линия. Период между пассажами составил 4 недели. Элиминацию бактерий проводили в темноте в условиях 16-часового фотопериода при температуре 25±2 °С.

ПЦР (полимеразная цепная реакция) – анализ культуры «бородатых» корней. Для подтверждения трансгенного статуса культуры «бородатых» корней проводили ПЦР-анализ для *rolB* гена (724 п.н.), а для исключения возможного загрязнения культур агробактериальной ДНК препараты проверяли путем амплификации последовательности *virC* гена (730 п.н.). Для *rolB* использовали праймеры – 5'-CAATGGATCCCAAATTGCTATTCC-3' и 5'-CGGCTTTAGGCTTCTTTCTTGAGG-3'; для *rolC* – 5'-ATGGCTAAGACGACCTGTGT-3' и 5'-TAGCCGATTGCAAACCTTGCAC-3'; для *virC* – 5'-ATCATTTGTAGCGACT-3' и 5'-AGCTCAAACCTGCTTC-3'. Тотальную ДНК генетически модифицированных и нативных корней выделяли СТАВ-методом [28] с некоторыми модификациями. В качестве отрицательного контроля использовали ДНК нетрансформированных корней *A. penduliflorus*. Плазмидную ДНК *A. rhizogenes* 15834 SWISS выделяли коммерческим набором Plasmid Miniprep (Евроген, Россия), которая служила положительным контролем. ПЦР проводили в термоциклере С-1000 (Bio-Rad, США). Конечный объем реакционной смеси составлял 25 мкл: 10 нг ДНК, 0.4 мкМ каждого праймера, 0.25 мМ каждого dNTP, 1 ед. HS Taq ДНК полимеразы, 2.5 мМ MgCl₂, 1× Taq-буфер. Амплификацию проводили по следующей программе [29]: первичная денатурация при 94 °С – 3 мин; 35 циклов (денатурация 94 °С – 20 с, отжиг праймеров при 60 °С – 40 с, элонгация при 72 °С – 60 с); конечная элонгация – 7 мин. Продукты амплификации окрашивали 3× SYBR-Green (Медиген, Россия) и разделяли в 1.7% агарозном геле в 1× TAE-буфере при напряжении 2.7 В/см. Гели визуализировали и документировали в системе Gel Doc XR+ (Bio-Rad, США). Размер амплифицированных фрагментов определяли с помощью маркера длин ДНК 100 пн (Евроген, Россия).

Культивирование «бородатых» корней и оценка ростовых параметров. После элиминирования бактерий на средах с антибиотиком корневые экспланты переносили на безгормональные жидкие среды B₅ и выращивали при температуре 25±2 °С в темноте при постоянном перемешивании (90 об/мин) на шейкере (Elmi, S-3-02L, Латвия) до образования интенсивно растущей массы корней. Для пересадки брали 200 мг сырой биомассы корней и помещали в конические колбы объемом 250 мл в 50 мл среды. Период между пассажами составил 4 недели, для пролонгированной культуры – 8 и 12 недель без обновления питательной среды. Сырую массу определяли после промывания корней от питательной среды под проточной водой и просушивания фильтровальной бумагой. Прирост сырой биомассы оценивали по росту индексу:

$$I = \frac{\bar{M}_{\max} - \bar{M}_0}{\bar{M}_0},$$

где \bar{M}_0 и \bar{M}_{\max} – средняя сырая масса корневых культур в начале и в конце цикла выращивания [30]. Наблюдения за параметрами роста, биохимический анализ «бородатых» корней проводили после четвертого пассажа.

Определение содержания биологически активных веществ. Содержание катехинов, дубильных веществ, пектинов, протопектинов проводили спектрофотометрическим методом. Качественными реакциями на тритерпеновые сапонины были пенообразование, равное по объему и стойкости при встряхивании пробирок с растворами кислоты и щелочи при добавлении извлечения сапонинов и выпадение белого хлопьевидного осадка при добавлении к вытяжке сапонинов ацетона. Сапонины определяли весовым методом в модификации

[19]. Все показатели рассчитаны в процентах от абсолютно сухой массы сырья. Анализировали культуры «бородатых» корней в возрасте 4 и 8 недель. Для сравнения исследовали корни 4-летних растений-интродуцентов в фазе цветения–плодоношения.

Состав и содержание ФС определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Анализировали культуры «бородатых» корней в возрасте 4, 8 и 12 недель в сравнении с корнями 4-летних интродуцированных растений. Все изученные образцы представляют собой среднюю пробу. Для извлечения суммы ФС проводили исчерпывающую экстракцию 70%-м этанолом при нагревании на водяной бане. Для проведения кислотного гидролиза к 0.5 мл водно-этанольного извлечения прибавляли 0.5 мл HCl (2 н) и нагревали на кипящей водяной бане в течение 2 ч. Анализ веществ проводили на жидкостном хроматографе «Agilent 1200» с диодноматричным детектором и системой для сбора и обработки хроматографических данных ChemStation.

Разделение проводили на колонке Zorbax SB-C18, размером 4.6 × 150 мм, с диаметром частиц 5 мкм, применив градиентный режим элюирования. В подвижной фазе содержание метанола в водном растворе ортофосфорной кислоты (0.1%) изменялось для экстрактов от 19 до 70% за 30 мин, далее до 100% к 32 мин; для гидролизатов – с 50 до 52% за 15 мин. Скорость потока элюента 1 мл/мин. Температура колонки – 26 °С. Объем вводимой пробы – 10 мкл. Детектирование осуществляли при λ = 255, 270, 290, 340, 350, 360, 370 нм. Для приготовления подвижных фаз использовали метиловый спирт (ос. ч.), ортофосфорную кислоту (ос. ч.), бидистиллированную воду. В качестве метчиков использовали стандартные образцы кверцетина, кемпферола и изорамнетина производства фирмы «Fluka» и «Sigma». Содержание ФС (C_x) в процентах в пересчете на абсолютно сухое сырье вычисляли по формуле

$$C_x = \frac{C_{ст} \cdot S_1 \cdot V_1 \cdot V_2 \cdot 100}{S_2 \cdot M \cdot (100 - B)}$$

где C_{ст} – концентрация соответствующего стандартного раствора ФС, мкг/мл; S₁ – площадь пика ФС в анализируемой пробе, е.о.п.; S₂ – площадь пика стандартного ФС, е.о.п.; V₁ – объем элюата после вымывания ФС с концентрирующего патрона, мл; V₂ – общий объем экстракта, мл; M – масса навески, мг; B – влажность сырья, %. Расчет содержания фенольных соединений производили по стандартной площади пика кверцетина.

Статистический анализ

Эксперименты по агробактериальной трансформации эксплантов проводили в двух повторностях. Анализ биологически активных веществ выполняли в трех биологических повторностях. Данные представлены в виде средних значений и стандартных ошибок (M ± m). Для сравнения средних значений независимых выборок использовали многогранговый тест Дункана (однофакторный дисперсионный анализ). Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 8.0.

Обсуждение результатов

Получение культуры «бородатых» корней. Корнеобразование при использовании разных штаммов отмечено на 5–30-е сутки после заражения (табл. 1). В зависимости от используемого штамма частота трансформации варьировала от 6.8 до 20.7%.

Самым вирулентным оказался штамм 15834 SWISS. Частота трансформации при инфицировании разных типов эксплантов данным штаммом изменялась от 9.1% до 37.5% (табл. 2). Среди эксплантов трансформация первичных побегов проростков оказалась наиболее высокой – 37.5%. На основании этих результатов культура «бородатых» корней разной длительности культивирования, полученная в результате трансформации штаммом 15834 SWISS, использована нами для дальнейшего изучения (рис. 1г). Контрольные экспланты (без инфицирования *A. rhizogenes*), культивируемые в одинаковых условиях с трансформированными образцами, корней не образовали.

Таблица 1. Средняя частота трансформации в зависимости от продолжительности культивирования эксплантов и штамма *A. rhizogenes*

Штамм	Частота трансформации, %				
	5 сут	10 сут	15 сут	20 сут	30 сут
15834 SWISS	7.4	8	8.3	8.7	20.7
A4-RT	0.0	0.0	5.2	6.9	11.4
R-1601	0.6	0.6	3.9	4.5	6.8

Таблица 2. Частота индукции «бородатых» корней *A. penduliflorus* в зависимости от штаммов *A. rhizogenes* и типов эксплантов через 30 сут культивирования

Штамм <i>A. rhizogenes</i>	Тип экспланта	Трансформация, %
A4-RT	Гипокотиль	14.8
	Семядоля	0.0
	Первичный побег	19.5
R-1601	Гипокотиль	4.9
	Семядоля	2.5
	Первичный побег	13.0
15834 SWISS	Гипокотиль	9.1
	Семядоля	15.4
	Первичный побег	37.5

Трансгенную природу изучаемых корней подтверждали методом ПЦР с праймерами к агробактериальному онкогену у *rolB*, а отсутствие загрязнения культуры агробактерией – праймерами к гену *virC*. Образование продукта ожидаемой длины (рис. 2) свидетельствует об успешном результате агротрансформации. В результате анализа не выявлено агробактериального загрязнения образцов.

Стабильно растущие культуры «бородатых» корней отделяли от первичных эксплантов, переносили на жидкую питательную среду и культивировали в течение нескольких пассажей. Известно, что генотип, тип экспланта, состав питательной среды и условия культивирования являются важными факторами, которые контролируют темп роста, развитие, морфогенез и влияют на накопление вторичных метаболитов в условиях *in vitro*. В связи с этим первичный скрининг линий «бородатых» корней с высоким содержанием БАВ и приростом биомассы может обеспечить успешность последующих техник *in vitro*, используемых для повышения синтеза БАВ (оптимизация питательной среды, условий культивирования, применение элиситоров и др.) [31].

В результате отбора в конце четвертого пассажа нами выделены три линии, полученные из разных типов эксплантов, демонстрирующие активный рост биомассы (табл. 3). Максимальные значения индекса роста (I) через 4 недели выращивания отмечены для культуры «бородатых» корней, полученной из семядольных эксплантов – линия №2 ($I = 59.1 \pm 0.25$). У линии №5, из первичных побегов проростков, I был 21.0 ± 1.90 , а у корней, индуцированных при трансформации гипокотилей (линия №6) ростовая активность была наименьшей – 7.3 ± 0.34 . Через 8 недель культивирования индекс роста для корневых культур из первичных побегов и семядолей увеличивался в 4.5 раза, для культур из гипокотилей – в 5.97 раза. К 12 неделям культивирования ростовая активность корневых культур прекращалась.

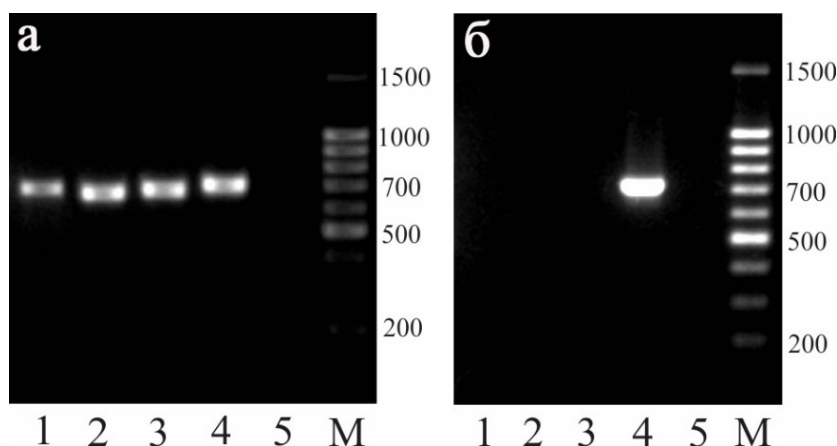


Рис. 2. ПЦР-анализ *hairy roots*, полученных из *A. penduliflorus* с праймерами к генам: а – *rolB* (724 п.н.), б – *virC* (730 п.н.): 1. Тотальная ДНК культуры «бородатых» корней, полученных при трансформации семядольных эксплантов штаммом *A. rhizogenes* 15834 SWISS (линия №2); 2. Тотальная ДНК культуры «бородатых» корней, полученных при трансформации первичных побегов проростков штаммом *A. rhizogenes* 15834 SWISS (линия №5); 3. Тотальная ДНК культуры «бородатых» корней, полученных при трансформации гипокотилей штаммом *A. rhizogenes* 15834 SWISS (линия №6); 4. Плазмидная ДНК *A. rhizogenes* 15834 SWISS (положительный контроль); 5. Тотальная ДНК нетрансформированных корней (отрицательный контроль); М – Маркер молекулярного веса 100 пн

Таблица 3. Индексы роста сырой биомассы корневых культур *A. penduliflorus*, полученных из разных типов эксплантов в результате трансформации *A. rhizogenes* (штамм 15834 SWISS) в зависимости от длительности культивирования

Продолжительность культивирования, недели	Индекс роста		
	Линия №2	Линия №5	Линия №6
4	59.1 ± 0.25 ^b	21.0 ± 1.90 ^b	7.3 ± 0.34 ^b
8	265.8 ± 0.35 ^a	94.5 ± 0.20 ^a	43.6 ± 0.30 ^a
12	271.5 ± 0.40 ^a	93.9 ± 0.27 ^a	50.4 ± 0.29 ^a

Примечание. Культуры «бородатых» корней, полученные при трансформации семядолей (линия №2), первичных побегов проростков (линия №5), гипокотилей (линия №6). Средние значения в столбцах, за которыми следуют одинаковые буквы, не имеют значимого отличия друг от друга в соответствии с тестом Дункана при $P \leq 0.05$.

Анализ биологически активных веществ. Известно, что содержание ценных вторичных метаболитов в культурах *in vitro* может быть увеличено путем изменений условий культивирования. Пролонгированное выращивание позволяет получать не только массу корней, но и способствовать накоплению в ней БАВ. Первичный анализ вторичных метаболитов показал, что корневые культуры *A. penduliflorus*, полученные из различных типов эксплантов, синтезируют типичные для него вещества в количестве, превосходящем их содержание в корнях целого растения (рис. 3). В «бородатых» корнях *A. penduliflorus* длительного культивирования (8 недель), полученных из первичных побегов (линия №5) обнаружено максимальное содержание пектинов (7.8%) и протопектинов (15.3%). В культурах, полученных из семядолей (линия №2), зафиксирован максимум содержания дубильных веществ (16.1%) и тритерпеновых сапонинов (30.5%) на 8 неделе культивирования. В культурах из гипокотилей (линия №6) обнаружено высокое содержание катехинов на 4 неделе культивирования (1.8%). В культурах «бородатых» корней самое высокое содержание БАВ превышает содержание веществ из корней растений-интродуцентов: в 30 и 31 раз для катехинов и пектинов, соответственно, в 14.9 раза для дубильных веществ, в 12 раз – для сапонинов, в 5.2 – для протопектинов.

Для сравнительного изучения состава и содержания ФС методом ВЭЖХ с учетом прироста биомассы (табл. 3) и накопления БАВ (рис. 3) выбраны высокопродуктивные культуры «бородатых» корней, полученные из семядолей (линия №2) и первичных побегов (линия №5). В гидролизате экстрактов культуры «бородатых» корней *A. penduliflorus* из первичных побегов (линия №5) обнаружены агликоны флавоноидов кверцетин (следовые количества) и изорамнетин, в культуре из семядолей (линия №2) – только изорамнетин. В гидролизате экстрактов корней растений-интродуцентов определены кверцетин, кемпферол и изорамнетин (рис. 4).

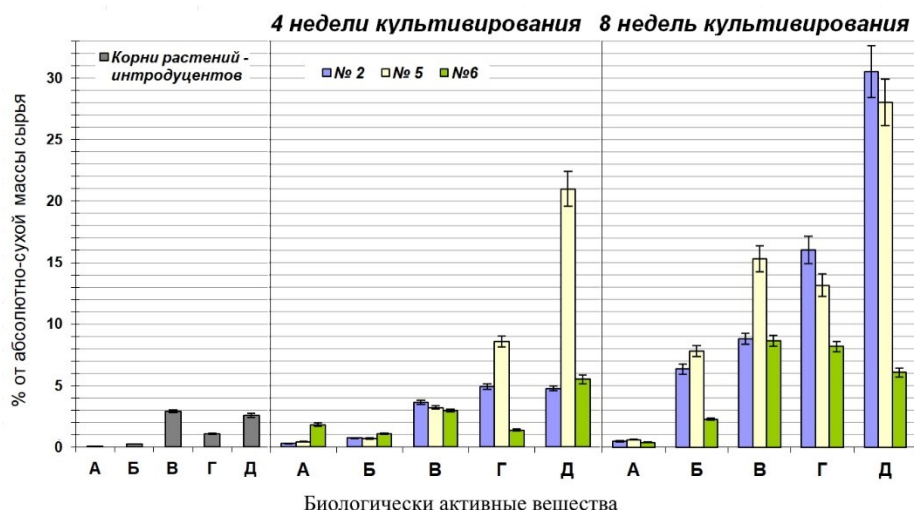


Рис. 3. Содержание биологически активных веществ в *«бородатых» корнях в зависимости от длительности культивирования и корнях растений-интродуцентов *A. penduliflorus* (% от абсолютно сухой массы сырья). *Культуры «бородатых» корней, полученные при трансформации семядолей (линия №2), первичных побегов проростков (линия №5), гипокотилей (линия №6). Биологически активные вещества: А – катехины; Б – пектины; В – протопектины; Г – дубильные вещества; Д – тритерпеновые сапонины

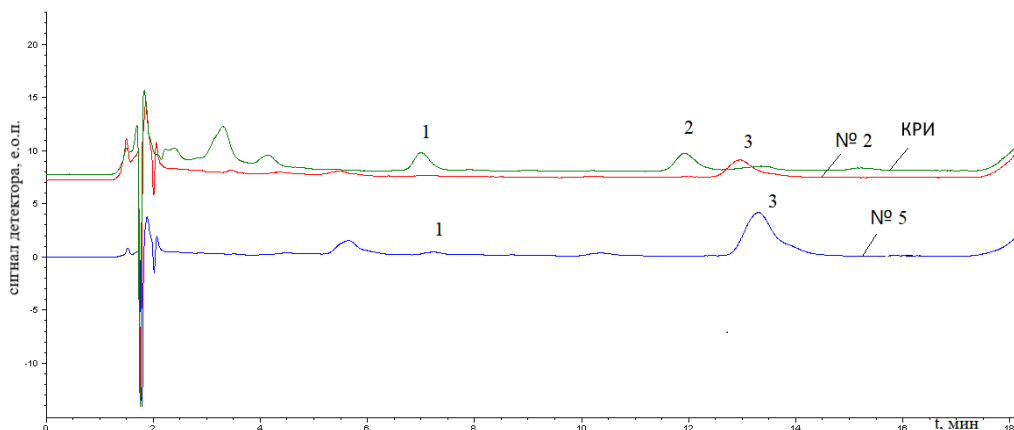


Рис. 4. Хроматограмма гидролизатов экстрактов корней растений-интродуцентов (КРИ) и «бородатых» корней *A. penduliflorus*, полученных при трансформации семядолей (линия №2) и первичных побегов (линия №5). Цифрами обозначены: 1 – кверцетин, 2 – кемпферол, 3 – изорамнетин. Детекция 370 нм

В негидролизованых экстрактах культуры «бородатых» корней идентифицирован кверцетин. Остальные главные компоненты ФС по максимумам УФ-спектров отнесены к флавоноидам: Ф1 ($t=24.9$, $\lambda_{max} = 250, 368$ нм), Ф2 ($t=26,2$, $\lambda_{max} = 244, 312$ пл., 370 нм), Ф3 ($t=27,7$, $\lambda_{max} = 260, 295$ нм), Ф4 ($t=30,1$, $\lambda_{max} = 251, 370$ нм). В экстрактах корней растений-интродуцентов отсутствовал компонент Ф3, а кверцетин и вещество Ф1 обнаружены в следовых количествах (рис. 5).

Ранее в корнях *A. membranaceus* и *A. mongholicus* из природных популяций [20, 21] и при интродукции [22] исследователями были найдены только изофлаваны и изофлавоны. Агликоны флавонолов были обнаружены лишь в надземных частях растений трех близких видов астрагалов [18, 32]. В ряде работ показано, что культуры «бородатых» корней способны продуцировать как ценные метаболиты, характерные для исходного растения [33], так и новые вещества, являющиеся их предшественниками или производными [34]. Причем уровень биосинтеза этих веществ сопоставим, а в некоторых случаях и превышает, уровень их биосинтеза в интактных растениях [35]. Изменения в содержании вторичных метаболитов авторы связывают с экспрессией *gol* генов в трансгенных растениях, что не только приводит к индукции ризогенеза [36], но также влияет на метаболизм всего растения, посредством изменения уровней эндогенных регуляторов роста [37].

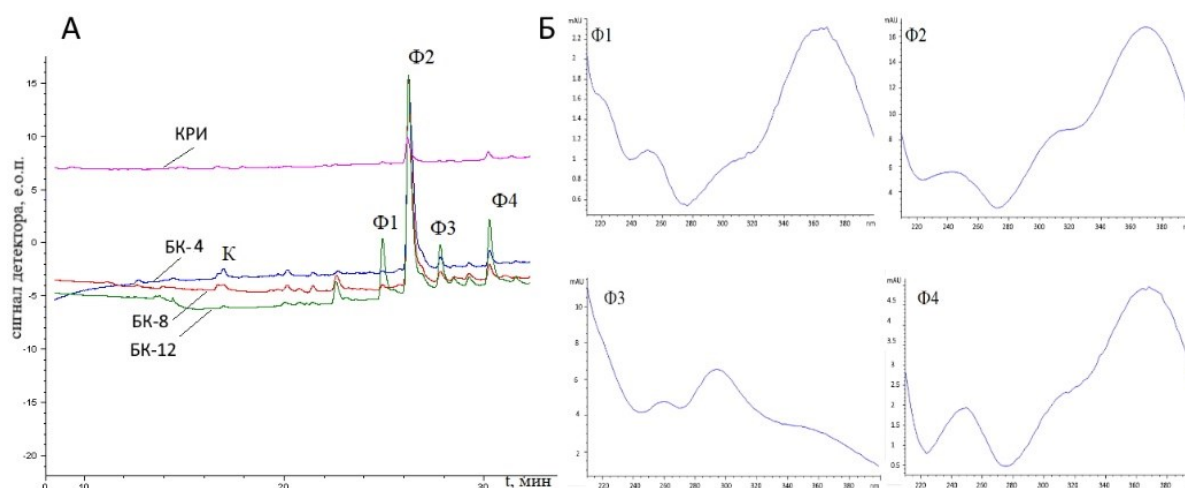


Рис. 5. А. Хроматограмма экстрактов корней растений-интродуцентов (КРИ) и «бородатых» корней *A. penduliflorus*, полученных при трансформации первичных побегов (линия №5) через 4 (БК-4), 8 (БК-8) и 12 (БК-12) недель культивирования. К – кверцетин, Ф1-Ф4 – неидентифицированные флавоноиды. Б. Спектры не идентифицированных флавоноидов. Детекция 370 нм

Кроме отличий в составе, в нашем эксперименте обнаружено разное содержание ФС «бородатых корней» и корней растений-интродуцентов. Максимальное содержание суммы ФС в «бородатых» корнях из семян (линия №2) и первичных побегов (линия №5) зарегистрировано при длительном культивировании – на 8 и 12 неделях (рис. 6). В культуре из семян (линия №2) содержание ФС с момента начала культивирования по 12 недель достоверно увеличивается в 1.5 раза ($P < 0.05$). Между 8 и 12 неделями культивирования нет достоверных отличий в содержании ФС ($P < 0.05$). Содержание ФС в культуре из первичных побегов (линия №5) растет с достоверной разницей в течение всех этапов культивирования и возрастает с 4 по 12 недель в 2 раза ($P < 0.05$). Содержание ФС в корнях растений-интродуцентов достоверно ниже содержания ФС корневых культур ($P < 0.05$).

Таким образом, ФС культуры «бородатых корней» отличаются от ФС корней растений-интродуцентов как по составу, так и по более высокому содержанию веществ. Кроме того, содержание отдельных групп БАВ в «бородатых корнях» астрагала в несколько раз превосходило содержание в корнях интродуцированных растений. Наиболее продуктивными по составу и содержанию БАВ следует считать культуры «бородатых» корней *A. penduliflorus*, полученные из семян и первичных побегов при пролонгированном культивировании (в течение 8 недель).

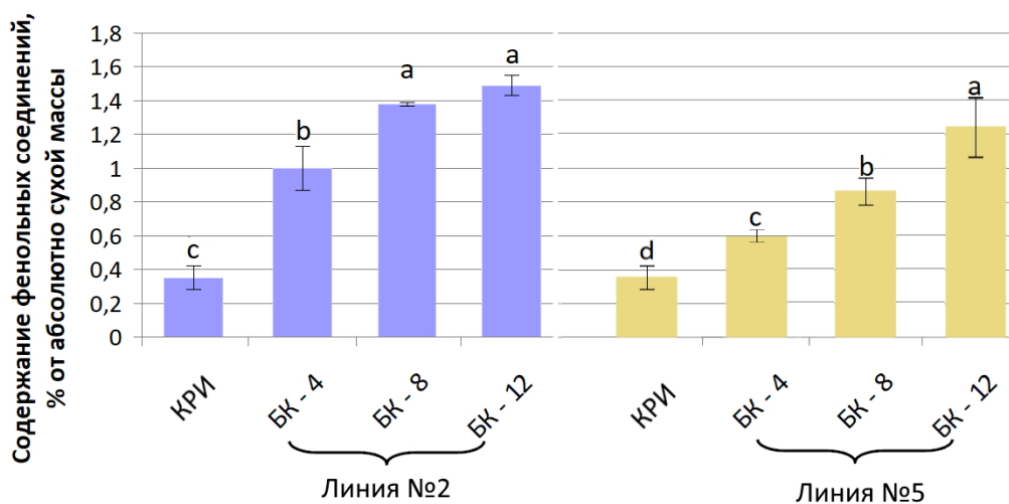


Рис. 6. Содержание ФС в корнях растений-интродуцентов и культуре *«бородатых» корней *A. penduliflorus* в зависимости от продолжительности культивирования, в % от абсолютно сухой массы сырья. *Культуры «бородатых» корней полученные при трансформации семян (линия №2), первичных побегов проростков (линия №5): БК-4 – 4 недели, БК-8 – 8 недель, БК-12 – 12 недель культивирования. Средние значения в столбцах, за которыми следуют одинаковые буквы, не имеют значимого отличия друг от друга в соответствии с тестом Дункана при $P = 0.05$

Выводы

1. Получены культуры «бородатых» корней лекарственного растения *A. penduliflorus* с использованием диких штаммов *A. rhizogenes* (A4-RT, R-1601, 15834 SWISS) и различных типов эксплантов (гипокотилей, семян и первичных побегов проростков). Определен высоко вирулентный штамм (15834 SWISS) и выявлены типы эксплантов с наибольшей частотой трансформации и индексом роста (первичные побеги и семена). Методом ПЦР подтверждена трансгенная природа корней, трансформированных штаммом 15834 SWISS, и отсутствие бактериального заражения.

2. Химический анализ вторичных метаболитов показал, что культуры «бородатых» корней *A. penduliflorus*, полученные из различных типов эксплантов, трансформированных штаммом 15834 SWISS, синтезируют типичные для него вещества (дубильные вещества, катехины, пектины, протопектины, три-терпеновые сапонины) в количестве, превосходящем их содержание в корнях интактных растений. Количество БАВ в «бородатых» корнях зависело от типа первичного экспланта и продолжительности культивирования. Максимальное содержание веществ определено при пролонгированном культивировании (в течение 8 недель).

3. Методом ВЭЖХ в гидролизатах экстрактов «бородатых» корней из первичных побегов обнаружены 2 агликона флавонолов: кверцетин и изорамнетин, в этанольных экстрактах «бородатых» корней из семян и первичных побегов – кверцетин и 4 компонента, по максимуму УФ-спектров, отнесенных к флавоноидам. Состав ФС «бородатых» корней отличался от состава ФС корней растений-интродуцентов. В культуре из семян содержание ФС увеличивалось в течение длительности культивирования, однако между 8 и 12 неделями нет достоверных отличий в содержании ФС (1.38 ± 0.01 и $1.49 \pm 0.06\%$, от абсолютно сухой массы сырья соответственно). Содержание ФС в культуре из первичных побегов достоверно возрастает с 4 по 12 неделю в 2 раза (до $1.24 \pm 0.18\%$). Содержание ФС в корнях растений-интродуцентов достоверно ниже содержания ФС корневых культур.

4. Таким образом, высокая ростовая активность, значительное содержание и многокомпонентный состав ФС свидетельствуют о перспективности использования культуры «бородатых» корней *A. penduliflorus* как источника ценных вторичных метаболитов, обладающих лекарственными свойствами.

Список литературы

1. Пешкова Г.А. Семейство Fabaceae, или Leguminosae – Бобовые. Флора Центральной Сибири. Новосибирск, 1979. Т. 2. С. 600–605.
2. Пешкова Г.А. Флорогенетический анализ степной флоры гор Южной Сибири. Новосибирск, 2001. 192 с.
3. Yakovlev G.P., Sytin A.K., Roskov Yu.R. Legumes of Northern Eurasia. Kew, 1996. Pp. 97–268.
4. Выдрин С.Н. Астрагалы в секции *Cenanthrum* Koch в Сибири // Систематические заметки. 1992. № 89. С. 1–3.
5. Zhu X.-Y. Revision of the *Astragalus penduliflorus* complex (Leguminosae – Papilionoideae) // Nordic Journal of Botany. 2003. Vol. 23. N3. Pp. 283–294. DOI: 10.1111/j.1756-1051.2003.tb00395.x.
6. Ma X.Q., Duan J.A., Zhu D.Y., Dong T.T.X., Tsim K.W.K. Species identification of Radix Astragali (Huang-qi) by DNA sequence of its 5S-rRNA spacer domain // Phytochemistry. 2000. Vol. 54. N4. Pp. 363–368. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)00111-4.
7. Chater A.O. *Astragalus penduliflorus* Lam. In: Tutin T.G. et al. (Eds.). Flora Europaea, Vol. II. Cambridge University Press; Cambridge, 1968. Pp. 114–115.
8. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование: семейства Hydrangeaceae – Haloragaceae. Ленинград, 1987. Т. 3. 326 с.
9. The State Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the people's republic of China. Vol. I. China Medical Science and Technology Press; Beijing, 2010. 212 p.
10. Lysiuk R., Darmohray R. Pharmacology and ethnomedicine of the genus *Astragalus* // International Journal of Pharmacology, Phytochemistry and Ethnomedicine. 2016. Vol. 3. Pp. 46–53. DOI: 10.18052/www.scipress.com/IJPPE.3.46.
11. Clement-Kruzel S., Hwang S.A., Kruzel M.C., Dasgupta A., Actor J.K. Immune modulation of macrophage proinflammatory response by goldenseal and *Astragalus* extracts // Journal of Medicinal Food. 2008. Vol. 11. Pp. 493–498.
12. Ionkova I., Momekov G., Proksch P. Effects of cycloartane saponins from hairy roots of *Astragalus membranaceus* Bge., on human tumor cell targets // Fitoterapia. 2010. Vol. 81. N5. Pp. 447–451. DOI: 10.1016/j.fitote.2009.12.007.
13. Jia R., Cao L., Xu P., Jeney G., Yin G. In vitro and in vivo hepatoprotective and antioxidant effects of *Astragalus polysaccharides* against carbon tetrachloride-induced hepatocyte damage in common carp (*Cyprinus carpio*) // Fish Physiology and Biochemistry. 2012. Vol. 38. N3. Pp. 871–881. DOI: 10.1007/s10695-011-9575-z.
14. Ko J.K., Auyeung K.K. Anti-tumor and anti-metastatic potential of AST with attenuated hematologic side effects of chemotherapeutic drugs in human colon cancer // Gastroenterology. 2013. Vol. 144. Pp. 290–291.
15. Huang W.M., Liang Y.Q., Tang L.J., Ding Y., Wang X.H. Antioxidant and anti-inflammatory effects of *Astragalus polysaccharide* on EA.hy926 cells // Experimental and Therapeutic Medicine. 2013. Vol. 6. N1. Pp. 199–203. DOI: 10.3892/etm.2013.1074.
16. Jung Y., Jerng U., Lee S. Evidence-based integrative medicine. A systematic review of anticancer effects of Radix *Astragali* // Chinese Journal of Integrative Medicine. 2016. Vol. 22. No 3. Pp. 225–236. DOI: 10.1007/s11655-015-2324-x.
17. Ma X.Q., Shi Q., Duan J.A., Dong T.T., Tsim K.W. Chemical analysis of Radix astragali (Huangqi) in China: a comparison with its adulterants and seasonal variations // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2002. Vol. 50. N17. Pp. 4861–4866.
18. Дунгэрдорж Д., Петренко В.В., Дерюгина Л.И. Агликоновый состав флавоноидных гликозидов *Astragalus mongholicus* // Химия природных соединений. 1974. №2. С. 250.
19. Киселёва А.В., Волхонская Т.А., Киселёв В.Е. Биологически активные вещества лекарственных растений Южной Сибири. Новосибирск, 1991. 136 с.
20. Song Ch., Zheng Zh., Liu D., Hu Zh., Sheng W. Pterocarpan and isoflavans from *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge // Zhiwu Xuebao. 1997. Vol. 39. N12. Pp. 1169–1171.
21. Lin L.-Z., He X.-G., Lindenmaier M., Nolan G., Yang J., Cleary M., Qiu S.-X., Cordell A. G. Liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry study of the flavonoids of the roots of *Astragalus mongholicus* and *A. membranaceus* // Journal of Chromatography A. 2000. Vol. 876. N1–2. Pp. 87–95.
22. Im k., Kim M.-J., Jung T.-K., Yoon K.-S. Analysis of isoflavonoid contents in *astragalus membranaceus bunge* cultivated in different areas and at various ages // KSBB journal. 2010. Vol. 25. N3. Pp. 271–276.

23. Du M., Wu X.J., Ding J., Hu Z.B., White K.N., Branford-White C.J. Astragaloside IV and polysaccharide production by hairy roots of *Astragalus membranaceus* in bioreactors // *Biotechnology Letters*. 2003. Vol. 25. N21. Pp. 1853–1856. DOI: 10.1023/A:1026233728375.
24. Dhiman N., Patial V., Bhattacharya A. The current status and future applications of hairy root cultures. In: *Biotechnological approaches for medicinal and aromatic plants: conservation, genetic improvement and utilization*. Springer; Singapore, 2018. Pp.87–155. DOI: 10.1007/978-981-13-0535-1_5.
25. Jiao J., Gai Q.Y., Fu Y.J., Ma W., Peng X., Tan S.N., Efferth T. Efficient production of isoflavonoids by *Astragalus membranaceus* hairy root cultures and evaluation of antioxidant activities of extracts // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014. Vol. 62. N52. Pp. 12649–12658. DOI: 10.1021/jf503839m.
26. Gamburg O.L., Eveleigh D.E. Culture methods and detection of glucanases in suspension cultures of wheat and barley // *Canadian Journal of Biochemistry*. 1968. Vol. 46. N5. Pp. 417–421.
27. Tepfer D. Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*: sexual transmission of the transformed genotype and phenotype // *Cell*. 1984. Vol. 37. N3. Pp. 959–967. DOI: 10.1016/0092-8674(84)90430-6.
28. Suman P.S.K., Ajit K.S., Darokar M.P., Sushil K. 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. Pp. 1–7. DOI: 10.1023/A:10075 28101 452.
29. Zheleznicenko T., Banaev E., Asbaganov S., Voronkova M., Kukushkina T., Filippova E., Mazurkova N., Shishkina L., Novikova T. *Nitraria schoberi* L. hairy root culture as a source of compounds with antiviral activity against influenza virus subtypes A(H5N1) and A(H3N2) // *3 Biotech*. 2018. Vol. 8. Pp. 260. DOI: 10.1007/s13205-018-1280-5.
30. 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. N2. Pp. 51–58. DOI: 10.1385/1-59259-959-1:051.
31. Halder M., Roychowdhury D., Jha S. A Critical review on biotechnological interventions for production and yield enhancement of secondary metabolites in hairy root cultures Chapter 2. In: V. Srivastava et al. (Eds.). *Hairy roots: an effective tool of plant biotechnology*. Springer Nature Singapore Pte Ltd., Singapore. 2018. Pp. 21–44. DOI: 10.1007/978-981-13-2562-5_2.
32. Сиднева О.В. Биохимическая специфичность сибирских видов секции *Cenantrum Koch* рода *Astragalus* L. (Fabaceae) // *Turczaninowia*. 2005. Т. 8. № 4. С. 73–82.
33. Flores H.E., Hoy M.W., Pickard J.J. Secondary metabolites from root cultures // *Trends in Biotechnology*. 1987. Vol. 5. N3. Pp. 64–69. DOI: 10.1016/S0167-7799(87)80013-6.
34. Fukui H., Feroj-Hasan A.F.M., Ueoka T., Kyo M. Formation and secretion of a new brown benzoquinone by hairy root cultures of *lithospermum erythrorhizon* // *Phytochemistry*. 1998. Vol. 47. N6. Pp. 1037–1039. DOI: 10.1016/S0031-9422(98)80067-8.
35. Sevón N., Oksman-Caldentey K.M. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation: root cultures as a source of alkaloids // *Planta Medica*. 2002. Vol. 68. N10. Pp. 859–868. DOI: 10.1055/S-2002-34924.
36. Spena A., Schell J. The expression of a heat-inducible chimeric gene in transgenic tobacco plants // *Molecular and general genetics*. 1987. Vol. 206. N3. Pp. 436–440. DOI: 10.1007/BF00428883.
37. Dehio C., Schell J. Stable expression of a single-copy rol gene in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants allows an exhaustive mutagenic analysis of the transgene-associated phenotype // *Molecular and general genetics*. 1993. Vol. 241. N3–4. Pp. 359–366.

Поступила в редакцию 27 июля 2019 г.

После переработки 11 ноября 2019 г.

Принята к публикации 2 декабря 2019 г.

Для цитирования: Амброс Е.В., Коцупий О.В., Кукушкина Т.А., Железниченко Т.В., Новикова Т.И. Синтез биологически активных веществ в культуре «бородатых» корней *Astragalus Penduliflorus* Lam. // *Химия растительного сырья*. 2020. №2. С. 209–221. DOI: 10.14258/jcrpm.2020026284.

*Ambros E.V.**, *Kotsupiy O.V.*, *Kukushkina T.A.*, *Zheleznicenko T.V.*, *Novikova T.I.* SYNTHESIS OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS IN HAIRY ROOTS OF *ASTRAGALUS PENDULIFLORUS* LAM.

Central Siberian Botanical Garden, st. Zolotodolinskaya, 101, Novosibirsk, 630090 (Russia),

e-mail: ambros_ev@mail.ru

Agrobacterium rhizogenes – mediated genetic transformation of medicinal plant *A. penduliflorus* Lam. using A4-RT, R-1601, 15834 SWISS strains was performed. The competences for transformation of three types of explants: hypocotyls, cotyledons, and primary shoots were tested. The virulent strain (15834 SWISS) and types of explants for transformation (primary shoots and cotyledons) with high growth index (I) were determined. The frequency of transformation of cotyledons by strain 15834 SWISS after 4 weeks of cultivation was 15.4% (I = 59.6), hypocotyls – 9.1% (I = 7.3) and primary shoots – 37.5% (I = 21.0). After 8 weeks of cultivation I increased 4.5 times for primary shoots (I = 94.5 ± 0.20) and cotyledons (I = 265.8 ± 0.35), for cultures from hypocotyls – 5.97 times (I = 43.6 ± 0.30). The roots' transgenic status and the absence of agrobacterium contamination were confirmed by PCR analysis using *rolB*-, *virC*-specific primers. The lines of hairy roots characterized by active increases of biomass with high content of biologically active metabolites were selected, moreover, the content of metabolites in hairy root cultures exceeded their content in the roots of introduced plants. The maximum accumulation of compounds was found in hairy roots obtained from primary shoots (pectins – up 7.8%, protopectins – up 15.3%) and cotyledons (tannins – up 16.1%, triterpenic saponins – up 30.5%) after 8 weeks of cultivation. High performance liquid chromatography (HPLC) analysis demonstrated that hydrolysates of extracts of hairy roots from primary shoots contained 2 flavonol aglycones – quercetin and isorhamnetin whereas ethanol extracts were characterized by presence of quercetin and 4 flavonoid components. In hairy roots from cotyledons the maximum of phenolic compounds (PCs) content did not differ significantly at 8 and 12 weeks of cultivation (1.38 ± 0.01 and 1.49 ± 0.06% of dry weight, respectively). The content of PCs in hairy roots from primary shoots increased two-fold from 4 to 12 weeks of cultivation (up 1.24 ± 0.18%). To the best of our knowledge, this is the first efficient protocol reported for the establishment of hairy root cultures in *A. penduliflorus* using *A. rhizogenes*.

Keywords: *Astragalus penduliflorus* Lam., hairy roots, prolonged cultivation, tannins, catechins, pectins, protopectins, triterpenoid saponins, flavonoids, HPLC.

References

1. Peshkova G.A., *Semeystvo Fabaceae, ili Leguminosae – Bobovyye. Flora Tsentral'noy Sibiri* [Family Fabaceae, or Leguminosae – Legumes. Flora of Central Siberia], Novosibirsk, 1979, vol. 2, pp. 600–605. (in Russ.)
2. Peshkova G.A., *Florogeneticheskiy analiz stepnoy flory gor Yuzhnoy Sibiri* [Phlorogenetic analysis of the steppe flora of the mountains of southern Siberia], Novosibirsk, 2001, 192 p. (in Russ.)
3. Yakovlev G.P., Sytin A.K., Roskov Yu.R., *Legumes of Northern Eurasia*, Kew, 1996, pp. 97–268.
4. Vydrina S.N., *Sistematicheskiye zametki*, 1992, no. 89, pp. 1–3. (in Russ.)
5. Zhu X-Y., *Nordic Journal of Botany*, 2003, vol. 23, no. 3, pp. 283–294. DOI: 10.1111/j.1756-1051.2003.tb00395.x.
6. Ma X.Q., Duan J.A., Zhu D.Y., Dong T.T.X., Tsim K.W.K., *Phytochemistry*, 2000, vol. 54, no. 4, pp. 363–368. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)00111-4.
7. Chater A.O. *Astragalus penduliflorus* Lam. In: Tutin T.G. et al. (Eds.). *Flora Europaea*, Vol. II. Cambridge University Press; Cambridge, 1968, pp. 114–115.
8. *Rastitel'nyye resursy SSSR: Tsvetkovyye rasteniya, ikh khimicheskiy sostav, ispol'zovaniye: cemeystva Hydran-geaceae – Haloragaceae* [USSR Plant Resources: Flowering plants, their chemical composition, use: Hydran-geaceae – Haloragaceae families], Leningrad, 1987, vol. 3, 326 p.
9. The State Pharmacopoeia Commission. *Pharmacopoeia of the people's republic of China*. Vol. I. China Medical Science and Technology Press; Beijing, 2010, 212 p.
10. Lysiuk R., Darmohray R., *International Journal of Pharmacology, Phytochemistry and Ethnomedicine*, 2016, vol. 3, pp. 46–53, DOI: 10.18052/www.scipress.com/IJPPE.3.46.
11. Clement-Kruzel S., Hwang S.A., Kruzel M.C., Dasgupta A., Actor J.K., *Journal of Medicinal Food*, 2008, vol. 11, pp. 493–498.
12. Ionkova I., Momekov G., Proksch P., *Fitoterapia*, 2010, vol. 81, no. 5, pp. 447–451. DOI: 10.1016/j.fitote.2009.12.007.
13. Jia R., Cao L., Xu P., Jeney G., Yin G., *Fish Physiology and Biochemistry*, 2012, vol. 38, no. 3, pp. 871–881. DOI: 10.1007/s10695-011-9575-z.
14. Ko J.K., Auyeung K.K., *Gastroenterology*, 2013, vol. 144, pp. 290–291.
15. Huang W.M., Liang Y.Q., Tang L.J., Ding Y., Wang X.H., *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2013, vol. 6, no. 1, pp. 199–203. DOI: 10.3892/etm.2013.1074.
16. Jung Y., Jerng U., Lee S., *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 2016, vol. 22, no. 3, pp. 225–236. DOI: 10.1007/s11655-015-2324-x.
17. Ma X.Q., Shi Q., Duan J.A., Dong T.T., Tsim K.W., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, vol. 50, no. 17, pp. 4861–4866.
18. Dungerdorzh D., Petrenko V.V., Deryugina L.I., *Khimiya prirodnikh soyedineniy*, 1974, no. 2, p. 250. (in Russ.)
19. Kiselova A.V., Volkhonskaya T.A., Kiselov V.Ye., *Biologicheski aktivnyye veshchestva lekarstvennykh rasteniy Yuzhnoy Sibiri* [Biologically active substances of medicinal plants of Southern Siberia], Novosibirsk, 1991, 136 p.
20. Song Ch., Zheng Zh., Liu D., Hu Zh., Sheng W., *Zhiwu Xuebao*, 1997, vol. 39, no. 12, pp. 1169–1171.
21. Lin L.-Z., He X.-G., Lindenmaier M., Nolan G., Yang J., Cleary M., Qiu S.-X., Cordell A. G., *Journal of Chromatography A*, 2000, vol. 876, no. 1–2, pp. 87–95.

* Corresponding author.

22. Im k., Kim M.-J., Jung T.-K., Yoon K.-S., *KSBB journal*, 2010, vol. 25, no. 3, pp. 271–276.
23. Du M., Wu X.J., Ding J., Hu Z.B., White K.N., Branford-White C.J., *Biotechnology Letters*, 2003, vol. 25, no. 21, pp. 1853–1856. DOI: 10.1023/A:1026233728375.
24. Dhiman N., Patial V., Bhattacharya A., *Biotechnological approaches for medicinal and aromatic plants: conservation, genetic improvement and utilization*, Springer; Singapore, 2018, pp.87–155. DOI: 10.1007/978-981-13-0535-1_5.
25. Jiao J., Gai Q.Y., Fu Y.J., Ma W., Peng X., Tan S.N., Efferth T., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, vol. 62, no. 52, pp. 12649–12658. DOI: 10.1021/jf503839m.
26. Gamborg O.L., Eveleigh D.E., *Canadian Journal of Biochemistry*, 1968, vol. 46, no. 5, pp. 417–421.
27. Tepfer D., *Cell*, 1984, vol. 37, no. 3, pp. 959–967. DOI: 10.1016/0092-8674(84)90430-6.
28. Suman P.S.K., Ajit K.S., Darokar M.P., Sushil K., *Plant Molecular Biology Reporter*, 1999, vol. 17, pp. 1–7. DOI: 10.1023/A:10075 28101 452.
29. Zheleznichenko T., Banaev E., Asbaganov S., Voronkova M., Kukushkina T., Filippova E., Mazurkova N., Shishkina L., Novikova T. *Biotech.*, 2018, vol. 8, pp. 260. DOI: 10.1007/s13205-018-1280-5.
30. Godoy-Hernandez G., Vazquez-Flota F.A., *Plant Cell Culture Protocols. Series: Methods in Molecular Biology*, 2006, vol. 318, no. 2, pp. 51–58. DOI: 10.1385/1-59259-959-1:051.
31. Halder M., Roychowdhury D., Jha S., V. Srivastava et al. (Eds.). *Hairy roots: an effective tool of plant biotechnology*, Springer Nature Singapore Pte Ltd., Singapore, 2018, pp. 21–44. DOI: 10.1007/978-981-13-2562-5_2.
32. Sidneeva O.V., *Turczaninowia*, 2005, vol. 8, no. 4, pp. 73–82. (in Russ.)
33. Flores H.E., Hoy M.W., Pickard J.J., *Trends in Biotechnology*, 1987, vol. 5, no. 3, pp. 64–69. DOI: 10.1016/S0167-7799(87)80013-6.
34. Fukui H., Feroj-Hasan A.F.M., Ueoka T., Kyo M., *Phytochemistry*, 1998, vol. 47, no. 6, pp. 1037–1039. DOI: 10.1016/S0031-9422(98)80067-8.
35. Sevón N., Oksman-Caldentey K.M., *Planta Medica*, 2002, vol. 68, no. 10, pp. 859–868. DOI: 10.1055/S-2002-34924.
36. Spena A, Schell J., *Molecular and general genetics*, 1987, vol. 206, no. 3, pp. 436–440. DOI: 10.1007/BF00428883.
37. Dehio C., Schell J., *Molecular and general genetics*, 1993, vol. 241, no. 3–4, pp. 359–366.

Received July 27, 2019

Revised November 11, 2019

Accepted December 2, 2019

For citing: Ambros E.V., Kotsupiy O.V., Kukushkina T.A., Zheleznichenko T.V., Novikova T.I. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2020, no. 2, pp. 209–221. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.2020026284.

