

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

УДК 581.1

ГИСТОЛОГИЧЕСКОЕ СТРОЕНИЕ И СОСТАВ
ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК *Drosera rotundifolia* L.

© 2022 г. М. Т. Ханды^а, *, Г. К. Чернодед^а, В. П. Григорчук^а,
Ю. В. Верещагина^а, А. В. Моршнева^а, Т. Ю. Горпенченко^а

^аФедеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН, Владивосток, Россия

*e-mail: handy_89@mail.ru

Поступила в редакцию 11.02.2022 г.

После доработки 31.03.2022 г.

Принята к публикации 01.04.2022 г.

Впервые получены длительно растущие каллусные культуры *D. rotundifolia*: морфогенная линия Green и частично дифференцированная *rolC*-трансгенная линия Red. Гистологический анализ выявил наличие органогенеза и прямого соматического эмбриогенеза в линии Green и клеточной дифференциации в линии Red. На основе метода ВЭЖХ с УФ- и масс-селективным детектированием было идентифицировано 11 соединений: эллаговая кислота, гликопиранозид 3-*O*-метилэллаговой кислоты, 4-*O*-D-гликопиранозид 3,3'-ди-*O*-метилэллаговой кислоты, 3,3'-ди-*O*-метилэллаговая кислота, россоллизид, синапоилглюкоза, галлат галлокатехина, 3-*O*-галактозид кверцетина, 3-*O*-глюкозид кверцетина, 3-*O*-галактозид мирицетина, 3-*O*-глюкозид мирицетина. Выявлены различия в накоплении нафтохинонов, эллаговой кислоты и ее производных, флавонов в зависимости от типа сформированных тканей и органов.

Ключевые слова: *Drosera rotundifolia*, галлокатехин галлат, россоллизид, синапоилглюкоза, морфогенный каллус, *rolC*, флавоноиды, флавоны, эллаговая кислота

DOI: 10.31857/S0015330322050098

ВВЕДЕНИЕ

Исследование вторичного метаболизма растений является важной задачей современной физиологии и биохимии. Новые подходы для изучения этого процесса открывают использование культур клеток высших растений. Система *in vitro* позволяет изучать процесс формирования соединений специализированного обмена в дедифференцированных пролиферирующих клетках, лишенных организменных систем контроля [1]. Особое место в этом направлении занимают морфогенные каллусные культуры или культуры органов растений *in vitro* с частичной организменной регуляцией. Сопоставление специфики вторичного метаболизма в морфогенных культурах (где присутствуют сформированные ткани, органы и специализированные клетки) и в дедифференцированных клетках *in vitro* позволяет не только изучать механизмы и системы регулирования этого процесса, но и устанавливать влияние метаболитов на жизнедеятельность растения.

РосЯнка круглолистная (*Drosera rotundifolia* L.) — травянистое насекомоядное растение из семейства росянковых (*Droseraceae*). Экстракты *D. rotundifolia* обладают антимикробными, противогрибковыми и противоопухолевыми свойствами [2]. Биологи-

ческую активность росянки приписывают двум группам фитохимических веществ, характерным для этого рода — 1,4-нафтохинонам и флавоноидам. Большинство этих соединений все еще извлекают из растений путем сбора в естественных местах произрастания. Интенсивное антропогенное воздействие на среду обитания, в том числе осушение болот для нужд сельского хозяйства и заготовки торфа, привели к критическому сокращению ареала росянки. Все три вида росянки, произрастающие в Европе — *D. anglica*, *D. intermedia* и *D. rotundifolia*, включены в список растений, находящихся на грани исчезновения [3]. По данным Baranyai и Joosten на рынке 1 кг сухой биомассы *D. rotundifolia* стоит 1000–1200 EUR [4]. Таким образом, разработка биотехнологического способа получения биомассы *D. rotundifolia* имеет практическое и природоохранное значения. Достаточно большой массив работ посвящен микрклональному размножению *D. rotundifolia* [5, 6] как декоративному растению. И лишь в последнее время стали уделять внимание биохимическому анализу растений, полученных в культуре ткани и факторам, влияющим на этот процесс [7].

Агробактериальная трансформация онкогеном *rolC* (ген фрагмента плазмиды почвенной бактерии

Agrobacterium rhizogenes Conn.) инициирует процесс неопластической трансформации у растений, а также повышает экспрессию защитных генов в клетке и активацию синтезов вторичных метаболитов [8]. В растениях ген *rolC* чаще всего приводит к карликовости, кустистости, изменению формы листовой пластинки [9], в культуре клеток к интенсивному делению или образованию корней. Однако прямых доказательств механизма действия гена *rolC* на сегодняшний день не имеется [9].

Цель данной работы — гистологический анализ внутреннего строения и анализ состава вторичных метаболитов двух линий *D. rotundifolia*: морфогенной линии Green и линии с частичной дифференциацией клеток, трансформированной геном *rolC* — Red, для установления связи между специализацией клеток и накоплением определенного типа вторичных метаболитов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования. В качестве объекта исследования использовали две линии каллусной культуры *D. rotundifolia* под обозначением Green и Red.

Получение каллусных культур клеток. Линии Green и Red были получены в 2005 г. из листьев интактного растения. В качестве стерилизующего агента использовали 0.2% диоксид в течение 5 минут с последующей 4-кратной промывкой стерильной водой. Линия Red была получена методом агробактериальной трансформации геном *rolC*, линия Green — не трансформированная. Линии стабильно культивируются более 15 лет.

Условия культивирования. Культивирование проводили на модифицированной среде Мурасиге-Скуга [10] с пониженным содержанием NH_4NO_3 до 400 мг/л и добавлением тиамина (B_1) — 0.2 мг/л, пиридоксина (B_6) — 0.5 мг/л, никотиновой кислоты (PP) — 0.5 мг/л, мезоинозитола — 100 мг/л, пептона — 100 мг/л, сахарозы — 25000 мг/л, агара — 6000 мг/л и гормонов α -нафтилуксусной кислоты — 2.0 мг/л, бензиламинопурина — 0.5 мг/л. Каллусы выращивали в колбах объемом 100 мл (33 мл питательной среды) в темноте при $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Цикл выращивания составлял 28 суток. Для пересева использовали фрагменты каллуса с размером около 1 см³.

Трансформация геном *rolC* и отбор трансформированных культур клеток. Стерильные листья *D. rotundifolia* трансформировали с помощью штамма *A. tumefaciens* GV3101/pPCV002-CaMVC, содержащим в составе бинарного вектора плазмиду pPCV002-CaMVC, несущую ген *rolC* под контролем промотора вируса мозаики цветной капусты (CaMV) 35S [11]. Плазмидная конструкция также несет ген *nptII* резистентности к канамицину

(Km) под контролем промотора нопалинсинтазы. Через четыре дня после трансформации в культуральную среду добавляли антибиотик цефотаксим для подавления роста бактерий. Отбор трансгенных клеток на канамицине провели через 30 дней после трансформации, в течение двух месяцев отобрали активно растущие *rolC*-трансформированные агрегаты в присутствии 50 мг/л канамицина (доза ингибирующая рост клеток).

Выделение и анализ ДНК и РНК. ДНК и РНК экстрагировали из 21-дневных клеточных линий *D. rotundifolia* [12], ПЦР, ОТ-ПЦР и анализ экспрессии генов *rolC* и *nptII* проводили с использованием праймеров, специфичных к генам *nptII* и *rolC*, как ранее было описано [13]. Длина продуктов ПЦР составляла 700 п.н. для *nptII* и 537 п.н. — для *rolC*.

Гистологический анализ. Для гистологического исследования брали фрагменты каллуса величиной не более 0.5 см³, которые подвергали фиксации ФСУ (50% этанол : 3.7% формальдегид : 5% уксусная кислота, в соотношении 100 : 7 : 7) путем вакуумной инфильтрации, обезвоживали, заключали в парафин и делали срезы толщиной 5–10 мкм с помощью ротационного микротомы HM 340E (Microm, Thermo Scientific, Вальдорф, Великобритания). Окраску срезов проводили альциановым синим и ацетогематоксилином по Жинкиной и Вороновой [14]. После гистохимической окраски препараты изучали на микроскопе AxioImager A1 (Carl Zeiss, Йена, Германия).

Фитохимический анализ. Определение вторичных метаболитов в биомассе культур тканей *D. rotundifolia* проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым и масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-УФ-МС). Для приготовления экстракта 50 мг сухой биомассы исчерпывающе экстрагировали 80% метанолом с использованием ультразвука. Полученный экстракт осаждали с помощью центрифуги Microfuge 22R Centrifuge (Beckman Coulter, США) в режиме 14000 об/мин (18000 g) в течение 15 минут.

Экстракты анализировали с использованием хроматографа 1260 Infinity (Agilent, США) и tandemного масс-спектрометра Bruker HCT ultra PTM Discovery System (Bruker Daltonik, GmbH, Германия) оснащенного ионной ловушкой. Разделение проводили на аналитической колонке Zorbax C18 (150x2.1 мм, 3.5 мкм, Agilent, США) уравновешенной в растворе А и термостатированной при 40°C. Подвижная фаза состояла из раствора муравьиной кислоты (0.1%) в деионизированной воде (раствор А) и ацетонитрила (раствор Б). Градиентное элюирование проводили со скоростью потока растворителей 0.2 мл/мин по следующей схеме: от 10% до 35% раствора Б за 40 мин, затем до 95% раствора Б до 50 мин и 95%

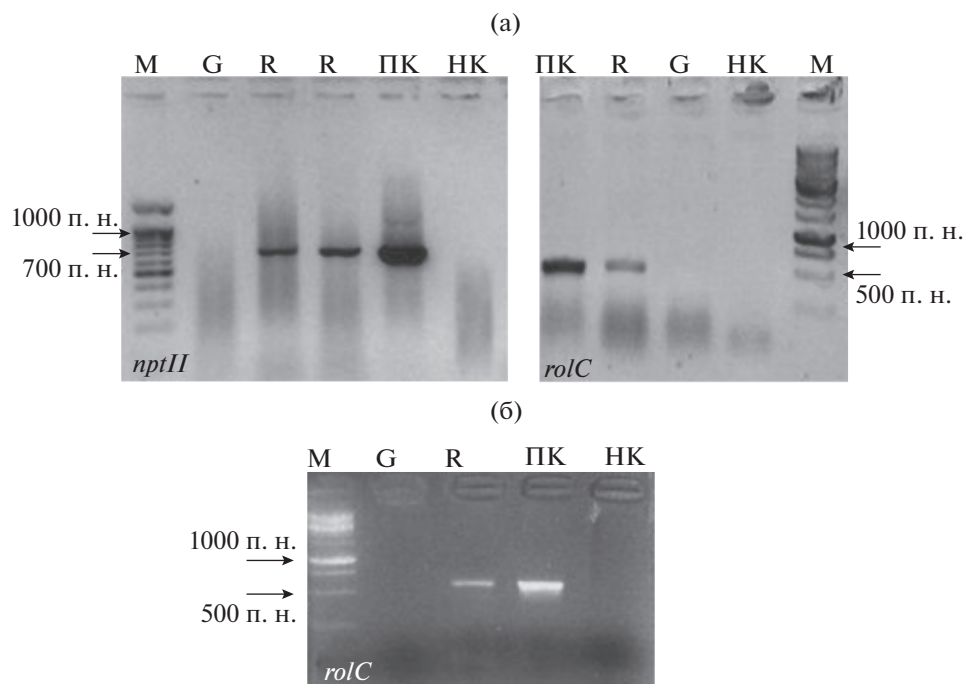


Рис. 1. ПЦР-анализ генов *nptII* и *rolC* (а) в ДНК образцах клеточных культур *D. rotundifolia*, ОТ-ПЦР анализ гена *rolC* (б) в клеточных культурах *D. rotundifolia*: G — линия каллусной культуры Green, R — линия каллусной культуры Red, ПК — положительный контроль (плазмида pPCV002-*rolABC*), НК — отрицательный контроль (ПЦР-смесь без растительной ДНК-матрицы), М — синтетический маркер молекулярной массы, размер ампликонов — 700 п.н. (*nptII*), 537 п.н. (*rolC*).

раствора Б до 60 мин. УФ-спектры записывали в диапазоне $\lambda = 200\text{--}800$ нм с использованием детектора на диодной матрице, хроматографический сигнал при $\lambda = 245$ нм записывали и использовали для определения относительной интенсивности поглощения компонентов экстрактов. Масс-спектрометрические данные получали в режиме ионизации с электрораспылением и регистрации отрицательных ионов с диапазоном регистрируемых значений m/z 100–1000. Поток газа осушителя (N_2) был 10.0 л/мин, давление газа распылителя (N_2) было 175 кПа, потенциал ионного источника был 4.0 кВ, температура газа осушителя составляла 325°C. МС/МС спектры записывали при напряжении фрагментации 1 В. Хроматографические данные записывали и обрабатывали с использованием Agilent OpenLAB CDS software (v.01.06.111), масс-спектрометрические данные записывали и обрабатывали с использованием Bruker Daltonics Compass 1.3 Data Analysis software (v.4.0.234.0). В работе использовали оборудование Центра коллективного пользования “Биотехнология и генетическая инженерия” ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН.

Масс-спектрометрию высокого разрешения (МСВР) для подтверждения идентификации проводили с использованием хроматомасс-спектрометра Shimadzu LCMS-IT-TOF (Киото, Япония), оснащенного жидкостным хроматографом высо-

кого давления LC-20A Prominence и времяпролетным масс-спектрометром с ионной ловушкой. Условия хроматографического разделения оставили без изменений. Масс-спектрометрические данные получали в режиме ионизации электрораспылением и регистрации отрицательных ионов с разрешением 12000. Данные записывали и обрабатывали с использованием программного обеспечения Shimadzu LCMS Solution (v.3.60.361).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Получение культуры тканей *D. rotundifolia*

Из листьев интактного растения классическими методами культуры ткани растений была получена морфогенная линия Green.

В результате трансформации с помощью *A. tumefaciens*, несущей плазмидный вектор, содержащий ген *rolC* под контролем промотора 35S CaMV и путем отбора на среде с канамицином получили одну трансгенную *rolC* культуру, под обозначением Red. Ген-специфический ПЦР-анализ выявил наличие генов *nptII* и *rolC* в ДНК *rolC*-трансгенной клеточной линии *D. rotundifolia* (линия Red), что подтверждает успешную трансформацию (рис. 1а). Методом ОТ-ПЦР была показана экспрессия гена *rolC* в трансформированной клеточной линии Red (рис. 1б).

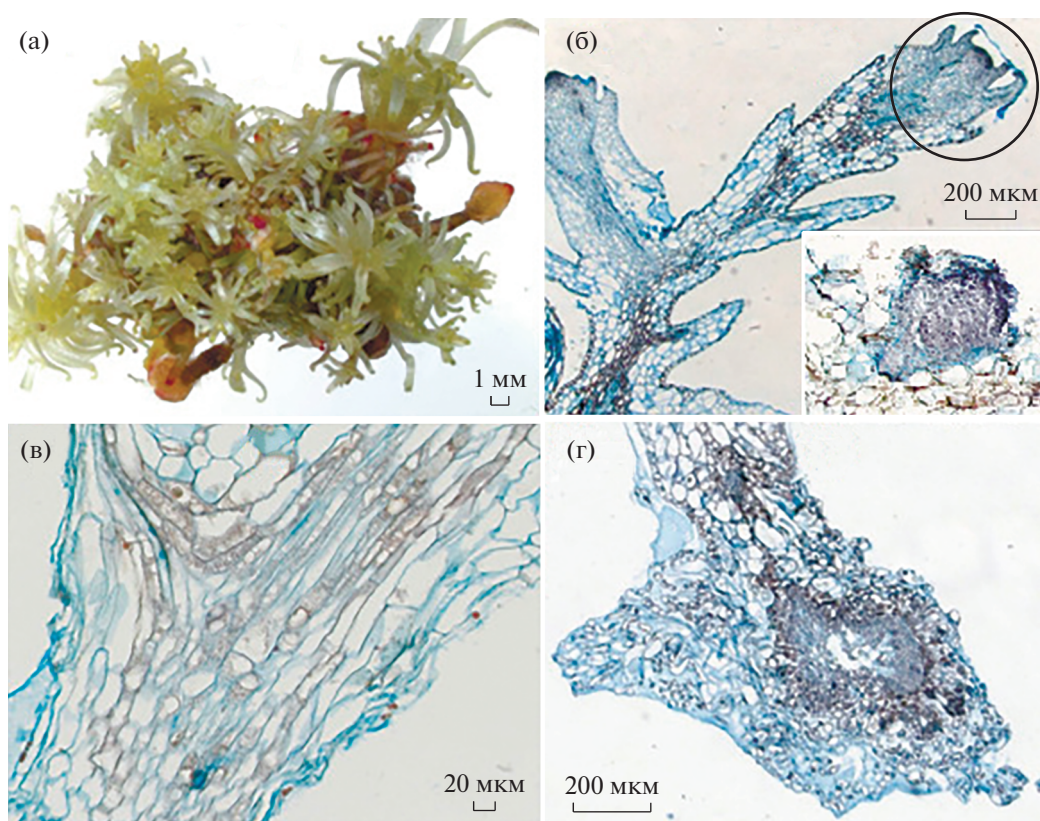


Рис. 2. Внешний вид (а) и гистологическое строение линии Green каллусной культуры *D. rotundifolia*. (б) — побег, верхний апекс с меристематическими клетками и листовыми примордиями; развивающийся эмбрионид; (в) — проводящая система; (г) — базальная зона каллуса.

Морфологическая и гистологическая характеристика линии Green D. rotundifolia

Исследуемая линия Green — морфогенная каллусная культура, преимущественно с побегами бледно-зеленого цвета и основанием коричневого цвета (рис. 2а). Основную часть каллуса (85–90%) составляют довольно крупные тонкостенные паренхимные клетки округлой или овальной формы 25–40 мкм в диаметре. Доля меристематических клеток, составляющих каллус не высока (10–12%). На гистологических срезах четко определяется тканевая дифференциация морфогенных структур: почек, побегов и соматических зародышей (эмбрионидов) (рис. 2б). Формирование корней в клеточной линии не происходило, что вероятно связано с биологией самого растения. Тем не менее, очень редко наблюдалось формирование структур похожих на корни с красноватым оттенком (рис. 2а). Анализ гистологических срезов выявил наличие характерных тканей, соответствующих дифференцированным структурам; эпидерма, хлоренхима, паренхима, проводящая система (ксилемы и флоэмы (ситовидные трубки)) (рис. 2в, г). В субэпидермальной зоне побегов вдоль проводящей

системы наблюдалось большое количество запасных паренхимных клеток с включениями, окрашенными гематоксилином, так же, как и в базальной части каллуса (рис. 2в). Соматические зародыши состоят из одинаковых изодиаметрических клеток, содержащих небольшие вакуоли, большое ядро с несколькими ядрышками и плотную цитоплазму. При формировании соматического зародыша субэпидермальные клетки листьев, претерпевая несколько делений, формировали меристематический бугорок. В дальнейшем на нем закладывались листовые примордии и апекс будущего побега, образующие почку. Листовые примордии развивались в листья (рис. 2б). Периодически внутри основания каллуса наблюдались меристематические зоны. Это может говорить о том, что соматические зародыши формируются из групп клеток. Основание каллуса состояло, главным образом, из проводящей системы, паренхимы с мелкими вакуолями и включениями, и слоя отмирающих клеток, покрытых большим количеством секрета. Этот секрет окрашивался альциановым синим в бледно-голубой цвет, что говорит о присутствии кислых мукополисахаридов в его составе (рис. 2г).

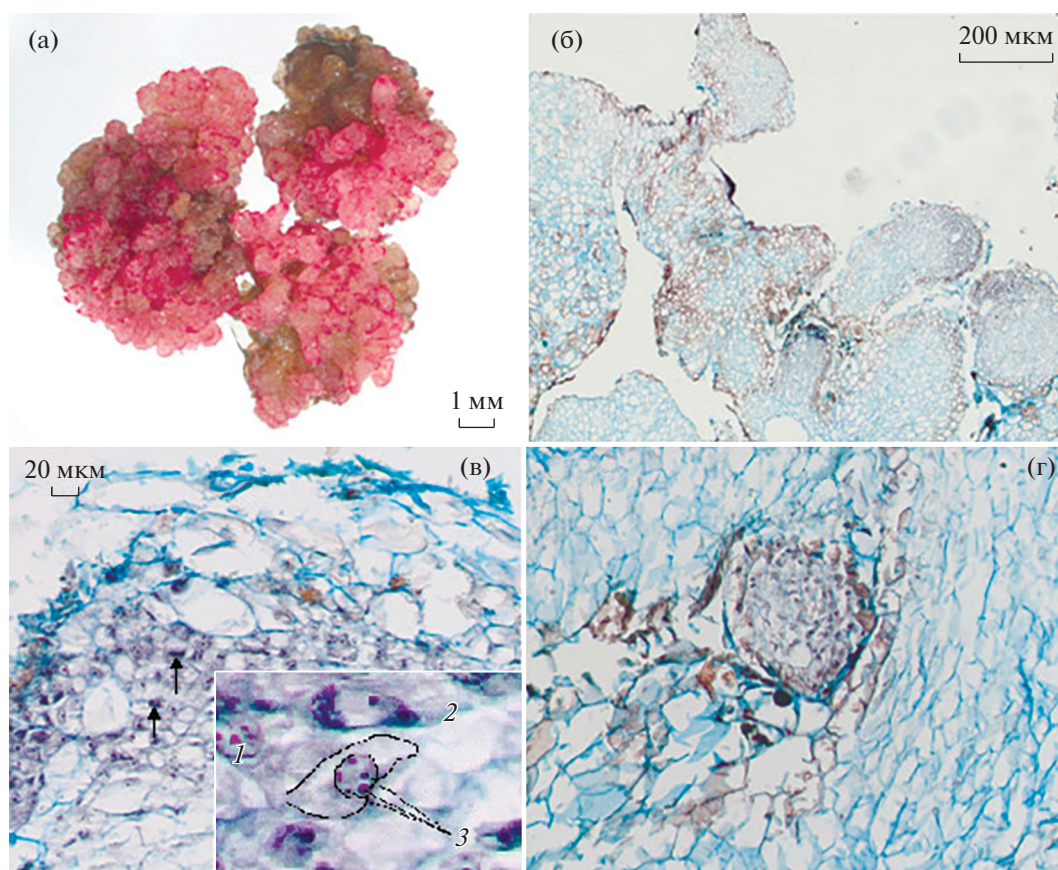


Рис. 3. Внешний вид (а) и гистологическое строение линии Red каллусной культуры *D. rotundifolia*. (б) — каллус; (в) — активно делящиеся меристематические клетки, стрелками показаны метафазные клетки; клетка с 5 ядрышками (1 — клетка, 2 — ядро, 3 — ядрышки); (г) — начало формирования новой структуры.

Морфологическая и гистологическая характеристика линии Red D. rotundifolia

Линия Red — каллус малинового цвета, по краям бледно-розовый, в основании бурый (рис. 3а). Основными структурными элементами каллуса линии Red являются глобулярные многоклеточные агрегаты (рис. 3б), состоящие из тонкостенных округлых паренхимных клеток, размер которых в среднем составляет 50 ± 25 мкм (рис. 3в). В более крупных по размеру структурах наблюдалось формирование проводящей системы. Доля паренхимных клеток в линии достигает 80%. Поверхность этих слабо дифференцированных структур была покрыта крупными клетками с характерной темной окраской содержимого и пленкой из секрета разрушенных клеток. Формирование эпидермальных тканей не наблюдали. Окраска внутренних и внешних паренхимных клеток сильно отличалась (рис. 3а). Отдельные слои клеток меристематического типа наблюдали под крупными темными клетками с секретом. Эти клетки делились активно, асинхронно и имели много ядрышек внутри ядра (рис. 3в). Наличие большого количества ядрышек и интенсивная окраска клеток может говорить

об активных биосинтетических процессах, происходящих в них (рис. 3б, г). Возобновление этих структур происходило из групп клеток. Дальнейший рост этих участков не приводил к развитию соматических зародышей или побегов. По внешнему и внутреннему строению, эти глобулы напоминали редко встречающиеся в предыдущей линии структуры с красноватым оттенком.

Фитохимическая характеристика

Масс-спектрометрические исследования метанольных экстрактов культуры тканей *Drosera rotundifolia* L. выявили наличие 11 биологически-активных компонентов полифенольной природы (рис. 4). Идентификация компонентов выполнена путем сравнения полученных экспериментальных данных с ранее опубликованными работами [15–18]. В таблице 1 приведены данные хроматомасс-спектрометрического определения основных полифенолов каллусной культуры двух линий *Drosera rotundifolia* L., среди которых четыре гликозилированных флавонола — производных мирицетина и кверцетина, эллаговая кислота и три ее производ-

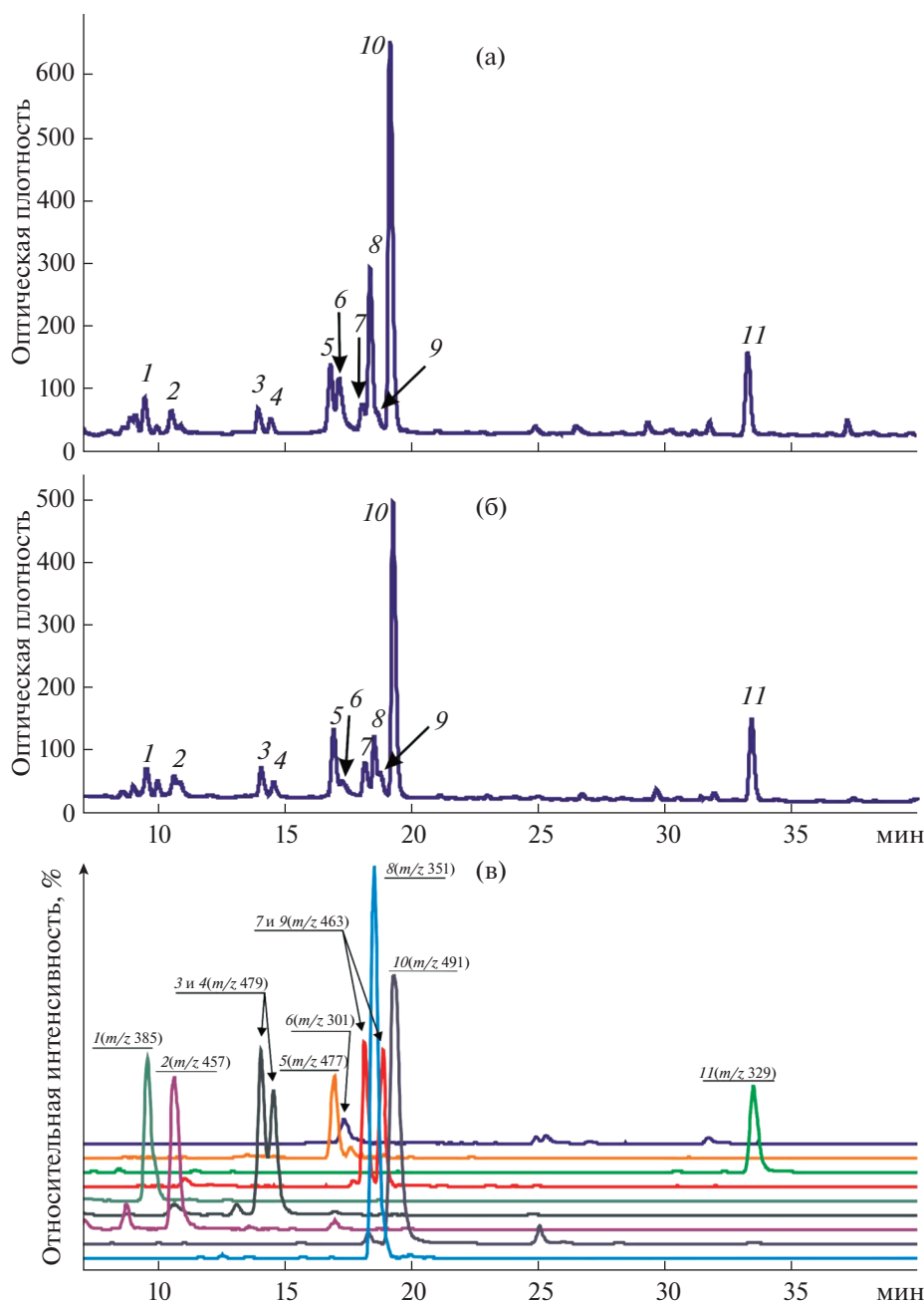


Рис. 4. Хроматографический профиль (ВЭЖХ, 245 нм) экстрактов каллусов: (а) — линия Green; (б) — линия Red; (в) — масс-хроматограммы по выбранным ионам. Нумерация на хроматограмме соответствует номерам пиков в таблице 1.

водных, а также галлокатехин галлат, гликозид синапиновой кислоты и производное нафтохинона — глюкозид гидроплюмбагина, известный как россозид.

Компоненты 3 и 4, а также 7 и 9 проявили себя как две пары изомеров в соответствии со сходным спектральным поведением. Типичные для флавоноидов УФ-профили позволили отнести эти компоненты к данному классу соединений. Рассчитанные при помощи МСВР брутто формулы компонентов 3

и 4 ($C_{21}H_{20}O_{13}$ для ионов состава $[M-H]^-$ с m/z 479.0828 для 3 и 479.0825 для 4) и компонентов 7 и 9 ($C_{21}H_{20}O_{12}$ для ионов состава $[M-H]^-$ с m/z 463.0871 для 7 и 463.0870 для 9) отличаются на один атом кислорода. МС/МС спектры исследуемых компонентов показали наличие интенсивных сигналов фрагментов (с m/z 317 для 3 и 4, и с m/z 301 для 7 и 9), что определяется элиминированием остатков гексозы (–162 Да). Так, согласно опубликованным ранее данным для видов росян-

Таблица 1. Список основных соединений, идентифицированных в метанольных экстрактах каллусов *Drosera rotundifolia* L. методом ВЭЖХ-УФ-МС

N° пика	$t_{уд}$, мин	λ_{max} , нм	МСВР, [М-Н] ⁺ , m/z			Формула	МС/МС фрагментация	Результаты идентификации	Ссылки
			теоретич.	измерен.	погрешн., ppm				
1	9.5	238; 330	385.114	385.1132	2.13	C ₁₇ H ₂₂ O ₁₀	265; 247; 223; 205	Синапоилглюкоза	[17]
2	10.6	275	457.0776	457.0764	2.7	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁	331; 305; 169	Галлокатехин галлат	[18]
3	13.9	260; 358	479.0831	479.0828	0.65	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	317; 316; 179	Мирицетин-3-О-галактозид	[16]
4	14.5	260; 358	479.0831	479.0825	1.28	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	461; 317; 316; 179	Мирицетин-3-О-глюкозид	[16]
5	16.8	250; 363	477.0675	477.0679	0.91	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃	315; 300	3-О-метилэллаговая кислота гликопиранозид	[18]
6	17.2	253; 370	300.9990	300.9996	2.02	C ₁₄ H ₆ O ₈	284; 157; 229; 185	Эллаговая кислота	[16]
7	18.1	254; 355	463.0882	463.0871	2.37	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	301	Кверцетин 3-О-галактозид	[16]
8	18.4	224; 305; 325; 342	351.1085	351.1094	2.44	C ₁₇ H ₂₀ O ₈	189	Россолизид	[15]
9	18.7	254; 357	463.0882	463.087	2.59	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	301	Кверцетин 3-О-глюкозид	[16]
10	19.2	248; 370	491.0831	491.0825	1.25	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₃	476; 329; 314	3,3'-ди-О- метилэллаговая кислота гликопиранозид	[18]
11	33.3	249; 377	329.0303	329.031	2.15	C ₁₆ H ₁₀ O ₈	314; 299	3,3'-ди-О-метилэллаговая кислота	[16]

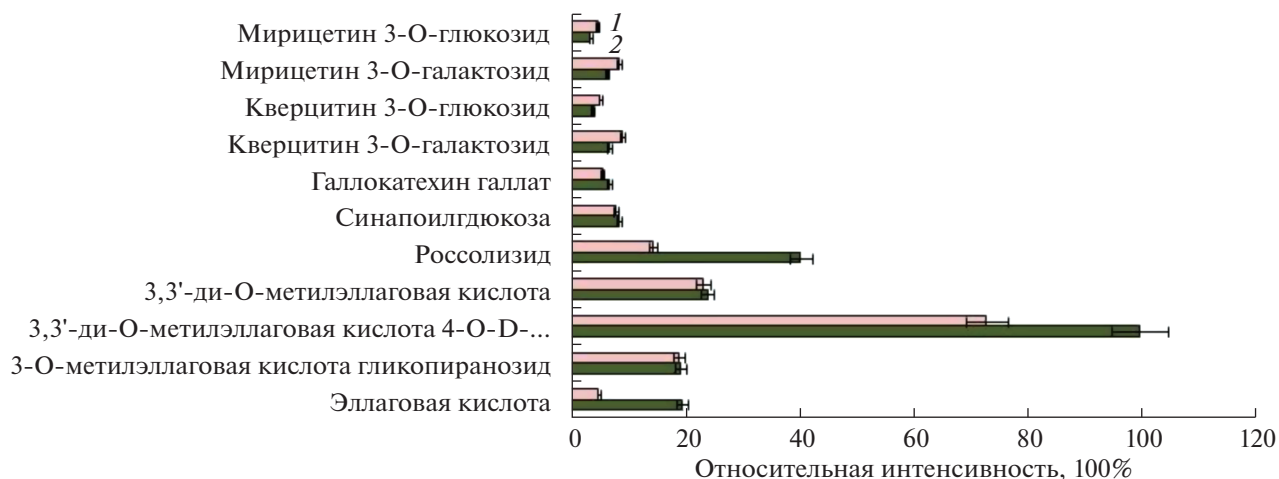


Рис. 5. Относительная интенсивность сигнала основных соединений двух линий *Drosera rotundifolia* L. при длине волны 245 нм. 1 — линия Red, 2 — линия Green.

ки [16] компоненты 3 и 4 были определены, как галактозид и глюкозид мирицетина, а компоненты 7 и 9 — кверцетина, соответственно.

УФ-спектры компонентов 5, 6, 10 и 11 характерны для производных эллаговой кислоты, с интенсивной полосой поглощения при 248–254 нм, плечами при ~300 и 350 нм и небольшим максимумом при ~370 нм (табл. 1). Соединение 6 ($C_{14}H_6O_8$ для $[M-H]^-$ с m/z 300.9996) определено, как эллаговая кислота [16]. Компонент 11 продемонстрировал интенсивный сигнал депротонированных ионов с m/z 329.0310, что соответствует молекулярной формуле $C_{16}H_{10}O_8$. В МС/МС спектре 11 наблюдались фрагментные ионы с m/z 314 и 299, соответствующие потере двух метильных радикалов (–15 Да каждый). Компонент 11 был определен как диметил-О-эллаговая кислота [16]. Соединения 5 ($C_{21}H_{18}O_{13}$ для $[M-H]^-$ с m/z 477.0679) и 10 ($C_{22}H_{20}O_{13}$ для $[M-H]^-$ с m/z 491.0825) показали характерный для О-гликозидов профиль фрагментации — интенсивные сигналы (с m/z 315 для 5 и с m/z 329 для 10), соответствующие элиминированию остатков гексозы (–162 Да). Причем компоненты 5 и 10 отличаются друг от друга на CH_2 фрагмент. Компоненты 5 и 10 были определены, как гликопиранозиды метилэллаговой и диметилэллаговой кислот [18].

Спектральные данные компонента 2 — интенсивная полоса поглощения при 275 нм и сигнал депротонированных ионов с m/z 457.0764 ($C_{22}H_{18}O_{11}$) — позволили определить его как галлат галлокатехина. Профиль фрагментации $[M-H]^-$ ионов также не противоречил идентификации. МС/МС спектр показал наличие ионов фрагментов с m/z 331 (соответствует потере декарбоксилированных молекул галловой кислоты), 305 и 169 (депротониро-

ванные галлокатехин и галловая кислота соответственно) [18].

УФ-профиль компонента 1 с интенсивной полосой поглощения при ~320–335 нм характерен для транс-оксикоричных кислот и их производных. МС/МС фрагментация депротонированных ионов (с m/z 385.1132, $C_{17}H_{22}O_{10}$) соединения 1 выявила интенсивный сигнал с m/z 223, соответствующей потере остатка гексозы (–162 Да). Также наблюдались сигналы фрагментов с меньшей интенсивностью — с m/z 265 (потеря части кольца гексозы), с m/z 248 (последующее отщепление воды). Таким образом, соединение 1 определено как гликозид синапиновой кислоты [17].

Компонент 8 был определен как О-гликозид благодаря наблюдаемому в МС/МС спектре интенсивному сигналу иона-фрагмента с m/z 189, который соответствует элиминированию остатка гексозы (–162 Да). Рассчитанная молекулярная формула для депротонированных ионов ($C_{17}H_{20}O_8$ для $[M-H]^-$ с m/z 351.1094) соединения 8 соответствует выделенному и описанному ранее для видов росянки [15] глюкозиду гидроплюмбагина, известному как россолизид (1,4-нафтохинон).

Содержание эллаговой кислоты в зеленой морфогенной клеточной линии практически в четыре раза, россолизид в три раза превышает таковой в линии Red (рис. 5). В экстракте каллуса линии Red содержание флавонолов на одну четвертую превышало содержание в экстракте каллуса линии Green, кроме вещества галлат эпигаллокатехина.

ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование процессов, определяющих биосинтетические и морфологические свойства куль-

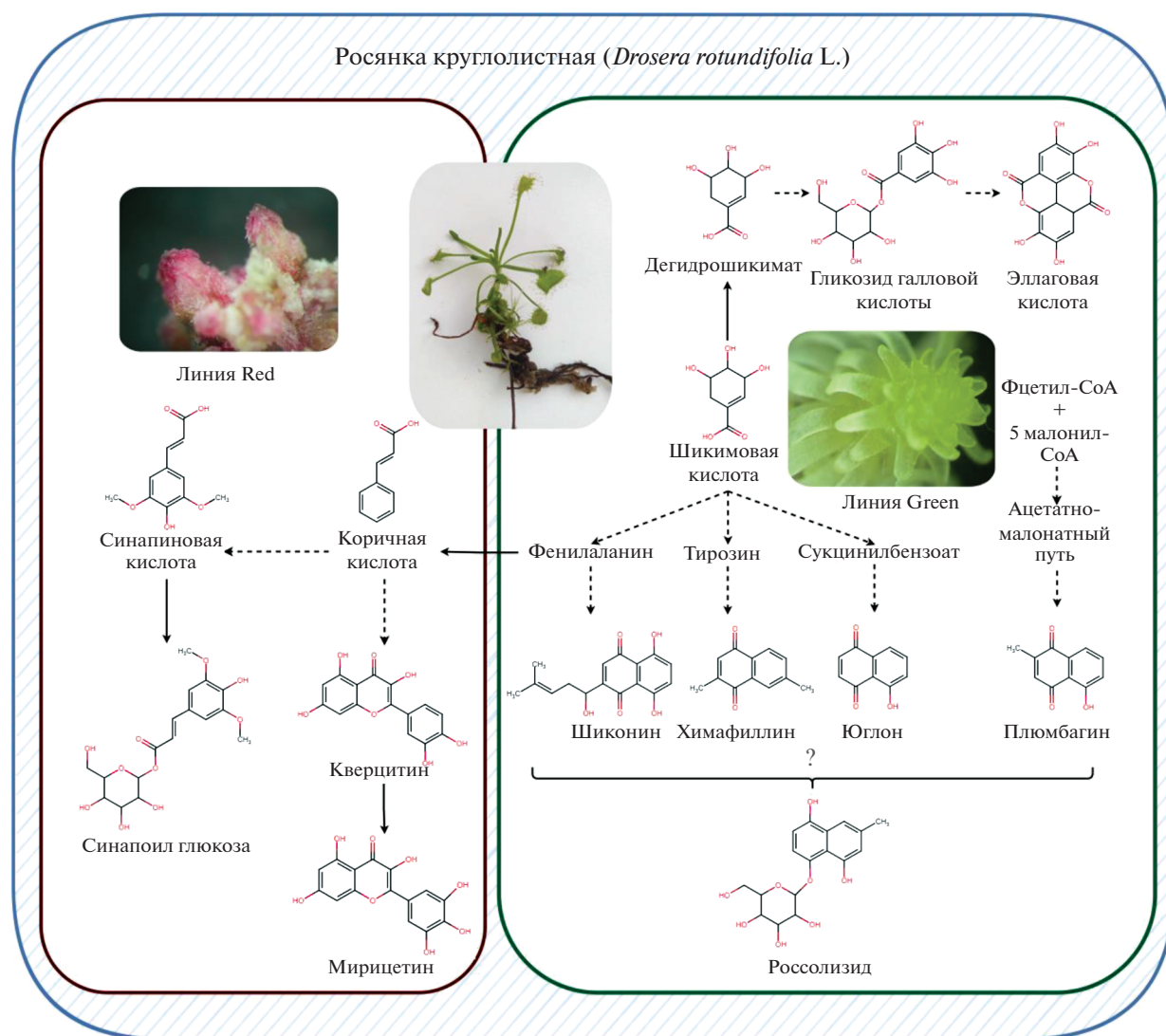


Рис. 6. Пути образования основных соединений культуры клеток *D. rotundifolia*. Стрелками показаны одноэтапные переходы; пунктирными стрелками указаны пути, проходящие в несколько этапов.

тур клеток высших растений, имеет как фундаментальное, так и прикладное значение. Для многих культур клеток при длительном культивировании (более двух лет выращивания в системе *in vitro*) характерна потеря способности к дифференциации и переход на активное деление однородных клеток. Однако, наши исследования и литературные данные показывают, что некоторые виды растений способны формировать *in vitro* стабильные длительно выращиваемые морфогенные культуры [19, 20]. Такие системы расширяют возможности исследования морфогенеза и сопутствующих процессов, характерных для этих видов растений, поскольку стабильность генома в них выше [19]. Во многих исследованиях показано, что в морфогенной структуре сохраняется биосинтез вторичных метаболитов исходного растения [20, 21]. Известно, что с дедифференциацией клеток в условиях

in vitro, каллусы теряют и/или меняют биосинтетические свойства [1]. Показано, что интактное растение *D. rotundifolia* богато флавоноидами, 1,4-нафтохинонами и эллаговой кислотой [7], большинство из этих веществ идентифицированы в исследуемых линиях (табл. 1). При этом морфогенез в культуре клеток, по-видимому, способствовал накоплению эллаговой кислоты, ее производных и 1,4-нафтохинона. Нафтохиноны и флавоноиды *Drosera in vivo* и *in vitro* достаточно хорошо исследованы и обобщаются в обзорных работах [22, 23]. Структурное разнообразие производных эллаговой кислоты в культуре клеток *Drosera*, идентично описанному в литературе для интактных растений *D. rotundifolia* [7]. Высокая концентрация эллаговой кислоты содержится в плодах и орехах высших растений [24]. Скорее всего, эллаговая кислота участвует в привлечении насекомых, подобно

другим органическим кислотам в хищных растениях [25]. У плотоядных растений 1,4-нафтохиноны участвуют в переваривании пищи, защищая от содержащихся в ней микроорганизмов, которые могут заразить ткани самого растения [25]. Обе функции сугубо организменные и сохранение соединений ответственных за них в большей степени в морфогенной культуре, нежели в дидифференцированной, согласуется с классическим пониманием вторичного метаболизма в клетках *in vitro* [1].

Трансформация геном *rolC* является мощным инструментом в регуляции вторичного метаболизма и морфогенеза растений [26]. В нашем случае не обнаружено изменений качественного состава метаболитов между двумя исследуемыми линиями, однако наблюдаются существенные изменения в соотношении групп соединений. Красная окраска трансформированной линии может быть обусловлена различными пигментами аналогично секреторным клеткам интактного растения: флавонов, антоцианов, каротиноидов и нафтохинонов [27]. По гистологическому анализу (рис. 2, 3) можно понять, что накопление данных соединений идет в наружном слое структур с частичной дифференциацией. Это, вероятно, связано с защитной функцией данных соединений [28]. При этом, эти структуры напоминают элементы корневой системы росянки, произрастающей в естественных условиях. Корни *Drosera* умеренного пояса обычно короткие и слабо разветвленные, с анатомическими адаптациями для роста в почвах с дефицитом кислорода и длинными тонкими волосками, не формирующимися в культуре клеток [29].

Схема формирования основных веществ в растениях и клеточных линиях *Drosera* представлена на рис. 6. Увеличение синтеза кверцетина и мирецитина и их производных при трансформации геном *rolC*, вероятно, связано с эффектом сайленсинга. Экспрессия генов, кодирующих ферменты-участники вторичного метаболизма, обычно регулируется (подавляется) с помощью miРНК. Продукт гена *rolC* предположительно нарушает этот процесс, в результате синтез данных соединений повышается [26]. Это же объясняет отсутствие эффекта на галлат эпикатехина, который синтезируется по другой ветви фенилпропаноидного пути. Активация биосинтеза полифенолов геном *rolC* подтверждается результатами других авторов [30]. Это также сочетается с его функцией стимуляции корнеобразования в культуре ткани [26] и усилением биосинтетических процессов, сопряженных с ним. Тогда как эллаговая кислота, и ее производные, нафтохинон россоллизид больше накапливались в морфогенной культуре, что скорее всего, обусловлено организменной ролью данных соединений. Основное соединение *D. rotundifolia* [15] — плюмбагин, не был идентифицирован в настоящей работе. Возможно, минорное

содержание вызвано многолетним пассированием каллуса в условиях *in vitro*.

Таким образом, впервые получены длительно растущая морфогенная каллусная культура *D. rotundifolia* линия Green, и частично дифференцированная *rolC*-трансгенная линия Red. Проведен анализ гистологического строения линий; масс-спектрометрический анализ их основных соединений; выявлены различия в накоплении нафтохинонов, эллаговой кислоты и ее производных, флавонов в зависимости от типа сформированных тканей и органов. Однако, для более глубокого понимания связи исследуемых веществ с процессами морфогенеза необходимы дополнительные исследования.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nosov A.M., Popova E.V., Kochkin D.V. Isoprenoid production via plant cell cultures: biosynthesis, accumulation and scaling-up to bioreactors // Production of Biomass and Bioactive Compounds Using Bioreactor Technology / Eds. Paek K.Y., Murthy H., Zhong J.J. Dordrecht: Springer. 2014. P. 563. https://doi.org/10.1007/978-94-017-9223-3_23
2. Crowder A.A., Pearson M.C., Grubb P.J., Langlois P.H. *Drosera* L. // J. Ecol. 1990. V. 78. P. 233. <https://doi.org/10.2307/2261048>
3. Barthlott W., Hostert A., Kier G., Kueper W. Geographic patterns of vascular plant diversity at continental to global scale // ERDKUNDE. 2007. V. 61. P. 305.
4. Baranyai B., Joosten H. Biology, ecology, use, conservation and cultivation of round-leaved sundew (*Drosera rotundifolia* L.): a review // Mires Peat. 2016. V. 18. P. 1. <https://doi.org/10.19189/MaP.2015.OMB.212>
5. Bobák M., Blehová A., Křištin J., Ovečka M., Šamaj J. Direct plant regeneration from leaf explants of *Drosera rotundifolia* cultured *in vitro* // Plant Cell Tiss Organ Cult. 1995. V. 43. P. 43. <https://doi.org/10.1007/BF00042670>
6. Jadczyk P., Kulpa D., Zbrojewska A. *In Vitro* micropropagation of *Drosera rotundifolia* // World Scientific News. 2017. V. 66. P. 75.
7. Tienaho J., Reshamwala D., Karonen M., Silvan N., Korpela L., Marjomäki V., Sarjala T. Field-grown and *in vitro* propagated round-leaved sundew (*Drosera rotundifolia* L.) show differences in metabolic profiles and biological activities // Molecules. 2021. V. 26. P. 3581. <https://doi.org/10.3390/molecules26123581>
8. Grishchenko O.V., Kiselev K.V., Tchernoded G.K., Fedoreyev S.A., Veselova M.V., Bulgakov V.P., Zhuravlev Y.N. *RoIB* gene-induced production of isoflavonoids in transformed *Maackia amurensis* cells // Appl Microbiol Biotechnol. 2016. V. 100. P. 7479. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7483-y>
9. Хафизова Г.Б., Мамеева Т.В. Ген *rolC* агробактерий: на пути к пониманию функции // Биотехно-

- логия и селекция растений. 2021. Т. 4. С. 36.
<https://doi.org/10.30901/2658-6266-2021-1-o4>
10. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures // *Physiol Plant*. 1962. V. 15. P. 473.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
 11. Spena A., Schmölling T., Koncz C., Schell J.S. Independent and synergistic activity of *rol* A, B and C loci in stimulating abnormal growth in plants // *EMBO J*. 1987. V. 6. P. 3891.
<https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1987.tb02729.x>
 12. Inyushkina Y.V., Kiselev K.V., Bulgakov V.P., Zhuravlev Yu.N. Specific genes of cytochrome P450 monooxygenases are implicated in biosynthesis of caffeic acid metabolites in *rolC*-transgenic culture of *Eritrichium sericeum* // *Biochem*. 2009. V. 74. P. 917.
<https://doi.org/10.1134/S0006297909080148>
 13. Bulgakov V.P., Veselova M.V., Tchernoded G.K., Kiselev K.V., Fedoreyev S.A., Zhuravlev Yu.N. Inhibitory effect of the *Agrobacterium rhizogenes rolC* gene on rhabdosiin and rosmarinic acid production in *Eritrichium sericeum* and *Lithospermum erythrorhizon* transformed cell cultures // *Planta*. 2005. V. 221. P. 471.
<https://doi.org/10.1007/s00425-004-1457-5>
 14. Жинкина Н.А., Воронова О.Н. К методике окраски эмбриологических препаратов // *Ботанический журнал*. 2000. Т. 85. С. 168.
 15. Budzianowski J. Naphthohydroquinone glucosides of *Drosera rotundifolia* and *D. intermedia* from *in vitro* cultures // *Phytochem*. 1996. V. 42. P. 1145.
[https://doi.org/10.1016/0031-9422\(96\)00076-3](https://doi.org/10.1016/0031-9422(96)00076-3)
 16. Zehl M., Braunberger C., Conrad J., Crnogorac M., Krasteva S., Vogler B., Beifuss U., Krenn L. Identification and quantification of flavonoids and ellagic acid derivatives in therapeutically important *Drosera* species by LC-DAD, LC-NMR, NMR, and LC-MS // *Anal. Bioanal. Chem*. 2011. V. 400. P. 2565.
<https://doi.org/10.1007/s00216-011-4690-3>
 17. Oszmiański J., Kolniak-Ostek J., Wojdyło A. Application of ultra-performance liquid chromatography-photodiode detector-quadrupole/time of flight-mass spectrometry (UPLC-PDA-Q/TOF-MS) method for the characterization of phenolic compounds of *Lepidium sativum* L. sprouts // *Eur. Food Res. Technol*. 2013. V. 236. P. 699.
<https://doi.org/10.1007/s00217-013-1925-x>
 18. Singh A., Bajpai V., Kumar S., Sharma K.R., Kumar B. Profiling of gallic and ellagic acid derivatives in different plant parts of terminalia arjuna by HPLC-ESI-QTOF-MS/MS // *Nat Prod Commun*. 2016. V. 11. P. 239.
<https://doi.org/10.1177/1934578X1601100227>
 19. Betekhtin A., Rojek M., Jaskowiak J., Milewska-Hendel A., Kwasniewska J., Kostyukova Y., Kurczynska E., Rumyantseva N., Hasterok R. Nuclear genome stability in long-term cultivated callus lines of *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn // *PLoS ONE*. 2019. V. 12: e0173537.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173537>
 20. Gorpenchenko T.Y., Grigorchuk V.P., Bulgakov D.V., Tchernoded G.K., Bulgakov V.P. Tempo-spatial pattern of stepharine accumulation in *Stephania glabra* morphogenic tissues // *Int. J. Mol. Sci*. 2019. V. 20. P. 808.
<https://doi.org/10.3390/ijms20040808>
 21. Le K.C., Jeong C.S., Lee H., Peak K.-Y., Park S.-Y. Ginsenoside accumulation profiles in long- and short-term cell suspension and adventitious root cultures in *Panax ginseng* // *Hortic. Environ. Biotechnol*. 2019. V. 60. P. 125.
<https://doi.org/10.1007/s13580-018-0108-x>
 22. Widhalm J., Rhodes D. Biosynthesis and molecular actions of specialized 1,4-naphthoquinone natural products produced by horticultural plants // *Hort. Res*. 2016. V. 3. P. 16046
<https://doi.org/10.1038/hortres.2016.46>
 23. Braunberger C., Zehl M., Conrad J., Wawrosch C., Strohbach J., Beifuss U., Krenn L. Flavonoids as chemotaxonomic markers in the genus *Drosera* // *Phytochem*. 2015. V. 118. P. 74.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.08.017>
 24. Vatter D.A., Shetty K. Biological functionality of ellagic acid: a review // *J. Food Biochem*. 2005. V. 29. P. 234.
<https://doi.org/10.1111/j.1745-514.2005.00031.x>
 25. Hatcher C.R., Ryves D.B., Millett J. The function of secondary metabolites in plant carnivory // *Ann. Bot*. 2020. V. 123. P. 399.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcz191>
 26. Bulgakov V.P., Veremeichik G.N., Grigorchuk V.P., Rybin V.G., Shkryl Y.N. The *rolB* gene activates secondary metabolism in *Arabidopsis* calli via selective activation of genes encoding MYB and bHLH transcription factors // *Plant Physiol. Biochem*. 2016. V. 102. P. 70.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.02.015>
 27. Иванова А.Н., Андропова Е.В., Шаварда А.Л., Муравник Л.Е. Ультраструктура секреторных клеток железистых волосков *Drosera rotundifolia* (*Droseraceae*) в культуре *in vitro* // *Ботанический журнал*. 2005. Т. 90. С. 878.
 28. Макаренко О.А., Левицкий А.П. Физиологические функции флавоноидов в растениях // *Физиология и биохимия культурных растений*. 2013. Т. 45. С. 100.
 29. Adlassnig W., Peroutka M., Lambers H., Lichtscheidl I.K. The roots of carnivorous plants // *Plant Soil*. 2005. V. 274. P. 127.
<https://doi.org/10.1007/s11104-004-2754-2>
 30. Dubrovina A.S., Manyakhin A.Y., Zhuravlev Y.N., Kiselev K. Resveratrol content and expression of phenylalanine ammonia-lyase and stilbene synthase genes in *rolC* transgenic cell cultures of *Vitis amurensis* // *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2010. V. 88. P. 727.
<https://doi.org/10.1007/s00253-010-2792-z>