

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **020503**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2014.11.28

(51) Int. Cl. *C12N 5/04* (2006.01)
A01H 4/00 (2006.01)

(21) Номер заявки
201200748

(22) Дата подачи заявки
2012.04.25

(54) **ШТАММ КУЛЬТУРЫ КОРНЯ ШЛЕМНИКА АНДРАХНОВИДНОГО (SCUTELLARIA ANDRACHNOIDES VVED.) SCUT. ANDR. (HRC) - ПРОДУЦЕНТ ВОГОНОЗИДА И АКТЕОЗИДА**

(43) **2013.10.30**

(96) **2012000115 (RU) 2012.04.25**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ
РАСТЕНИЙ ИМ. К.А.
ТИМИРЯЗЕВА РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК (RU);
ИНСТИТУТ БИОТЕХНОЛОГИИ
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ
НАУК КИРГИЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ
(KG)**

(56) КУЗОВКИНА И.Н. и др. Образование флавоноидов в pRi T-ДНК-трансформированных корнях шлемника байкальского (*Scutellaria baicalensis* Georgi) и способы его регуляции. Физиология растений. 2001, т. 48, № 4, с. 523-528

МАЛИКОВ В.М. и др. Фенольные соединения растений рода *Scutellaria* L. Распространение, строение и свойства. Химия природных соединений, 2002, № 4, с. 299-324

ОЛЕННИКОВ Д.Н. и др. Фенольные соединения шлемника байкальского (*Scutellaria baicalensis* georgi). Химия растительного сырья, 2009, № 4, с. 89-98

KOVACS GY. et al. HPLC Determination of Flavonoids in Hairy-Root Cultures of *Scutellaria baicalensis* Georgi. Chromatographia Supplement, 2004, vol. 60, pp. S81-S85

КУЗОВКИНА И.Н. Культивирование генетически трансформированных корней растений: возможности перспективы использования в физиологии растений. Физиология растений, 1992, т. 39, вып. 6, с. 1208-1214

(72) Изобретатель:
**Кузовкина Инна Николаевна,
Прокофьева Мария Юрьевна (RU),
Умралина Анара Рустамовна,
Чернышева Татьяна Петровна (KG)**

(57) Изобретение относится к области физиологии растений, биотехнологии и генной инженерии и может быть использовано в фармацевтической промышленности, так как фенольные соединения шлемников, к которым относятся такие вещества, как флавоны (вогонозид) и фенилэтаноиды (актеозид), обладают высокой антиоксидантной активностью, которая обуславливает их исключительную фармакологическую ценность, находящую применение в медицинской практике. Задачей изобретения является получение штамма культуры корня растения шлемника андрахновидного (*Scutellaria andrachnoides*), интенсивно растущего в условиях *in vitro* на безгормональных питательных средах, сохраняющего способность к синтезу фенольных соединений, характерных для корней целого растения, и обладающего генетической и биохимической стабильностью. Поставленная задача решается созданием нового штамма культуры корня шлемника андрахновидного *Scut. andr. (HRC)* (*Scutellaria andrachnoides* Vved.) - продуцента флавоноидов вогонозида и фенилэтаноида актеозидов.

B1**020503****020503****B1**

Область применения

Изобретение относится к области физиологии растений, биотехнологии и генной инженерии и может быть использовано в фармацевтической и пищевой промышленности, так как фенольные соединения шлемников, к которым относятся такие вещества, как флавоны (вогонозид) и фенилэтаноиды (актеозид), обладают высокой антиоксидантной активностью, которая обуславливает их исключительную фармакологическую ценность, находящую применение в медицинской практике.

Уровень техники

Шлемник андрахновидный (*Scutellaria andrachnoides* Vved.) - многолетнее эндемичное травянистое растение, относящееся к семейству губоцветных (*Lamiaceae*) и к роду *Scutellaria* (Флора СССР, Москва, Ленинград, 1954, т. 20, стр. 514).

Растение имеет ограниченный, почти "точечный" ареал распространения и встречается в Кыргызстане в районе Атойнокского и Ферганского хребтов на высоте 900-1600 м над уровнем моря.

Это невысокое многолетнее растение высотой от 4 до 12 см, которое растет в каменисто-скалистых местах, цветёт в мае-июне, плодоносит в июле (Абдуллаева М.Н. Род *Scutellaria* L., - Шлемник. Определитель растений Средней Азии, Ташкент, 1987, т. 9:13-37; Умралина А.Р., Лазьков Г.А. Эндемики и редкие виды растений Кыргызстана (Атлас), 2008 г., стр. 96-97, Бишкек).

Растение включено в Красную Книгу Кыргызской Республики. Сведения о его культивировании отсутствуют. Семена растения как эндемика сохранены в семенном банке Института биотехнологии Национальной академии наук Кыргызской Республики.

Шлемник андрахновидный относится к числу декоративных растений. Сведений о составе вторичных веществ в корневой системе растения нет даже в последней обширной сводке узбекских фитохимиков, опубликовавших данные химического состава 57 видов шлемников (Маликов В.М., Юлдашев М.П. Фенольные соединения растений рода *Scutellaria*. Распространение, строение и свойства. Химия природных соединений. 2002 г., т. 4:299-324 и т. 5:385-409).

Редкая встречаемость растения и отсутствие данных о составе природных веществ растения послужили причиной для введения в культуру *in vitro* его корней и недифференцированно растущих клеток с целью изучения состава вторичных метаболитов в корнях растения, а также попыток его клонального микроразмножения.

Известен метод культивирования корней *in vitro* другого вида шлемника - шлемника байкальского (И.Н. Кузовкина, А.В. Гусева, И.Е. Альтерман, Р.А. Карначук. Образование флавоноидов в трансформированных корнях *Scutellaria baicalensis* и пути их регуляции, 2001. Физиология растений, 48: 523-528).

Метод заключается в проведении аналогичной процедуры генетической трансформации фрагментов стерильных проростков шлемника байкальского при помощи почвенной агробактерии *Agrobacterium rhizogenes*, но в этом случае был использован другой дикий штамм агробактерии - А4. Последовательность проведения работы по получению штамма культуры корня шлемника байкальского полностью совпадала с последовательностью получения штамма культуры корня шлемника андрахновидного, так как обе работы были проведены сотрудниками одной и той же лаборатории. Отличие метода получения штамма культуры корня шлемника андрахновидного состоит в использовании в качестве исходного растительного материала проростков другого вида шлемника - шлемника байкальского, а также в применении при проведении генетической трансформации иного дикого штамма почвенной агробактерии (А4). Авторам удалось получить штамм культуры корня шлемника байкальского, который содержит комплекс фенольных соединений, состоящий, в основном, из флавонов с высокой физиологической активностью (Kovacs Gy., Kuzovkina I.N., Szoeki E., Kursinszki L. HPLC determination of flavonoids in hairy root cultures of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Chromatographia* 2004,60:81-85).

Апробация мало известного вида шлемника - андрахновидного, как объекта для введения в культуру *in vitro* его корней представляет большой как практический, так и теоретический интерес с точки зрения выяснения состава и количественного содержания в его корнях фенольных метаболитов.

Практически все виды шлемников относятся к числу исчезающих (шлемник байкальский) или эндемиков (шлемник андрахновидный), что диктует необходимость введения их корней, в которых синтезируются флавоны, в культуру *in vitro*. Именно поэтому нами был использован апробированный на примере шлемника байкальского способ введения в культуру *in vitro* штамма культуры корня другого, эндемичного вида шлемника - шлемника андрахновидного.

Задача изобретения

Задачей изобретения является получение штамма культуры корня растения шлемника андрахновидного (*Scutellaria andrachnoides*), интенсивно растущего в условиях *in vitro* на безгормональных питательных средах, сохраняющего способность к синтезу фенольных соединений, характерных для корней целого растения, и обладающего генетической и биохимической стабильностью.

Решение задачи

Поставленная задача решается созданием нового штамма культуры корня шлемника андрахновидного *Scut. andr.* (HRC) (*Scutellaria andrachnoides* Vved.) - потенциального продуцента флавона вогонозида и фенилэтаноида актеозиды.

Штамм культуры корня шлемника андрахновидного (*Scutellaria andrachnoides* Vved.) депонирован в

Коллекции генетически трансформированных корней растений при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологии растений Российской академии наук под обозначением Scut. andr. (HRC) - продуцент вононозида и актеозида.

Справка о депонировании представлена в материалах заявки.

Новизна изобретения - впервые получен штамм Scut. andr. (HRC) культуры корня шлемника андрахновидного (*Scutellaria andrachnoides* Vved.) - продуцент флавоноидов вононозида и фенилэтаноида актеозида.

Сущность изобретения в том, что в результате проведенной генетической трансформации проростков шлемника андрахновидного с помощью дикого штамма А4 почвенной агробактерии получена новая растительная система - штамм Scut. andr. (HRC) культуры корня, который способен к стабильному круглогодичному росту в условиях *in vitro* и к синтезу значительно большего количества вононозида и актеозида, чем содержание этих веществ в медленно растущих и трудно возобновляемых корнях целого растения шлемника андрахновидного.

Реализация изобретения

При получении штамма культуры корня шлемника андрахновидного Scut. andr. (HRC) (*Scutellaria andrachnoides* Vved.) путём rRi T-ДНК трансформации используют стерильные проростки этого растения, выращенные из стерильных семян, с первыми двумя настоящими листочками. Стерилизацию обезжиренных этиловым спиртом семян проводят концентрированной серной кислотой в течение 3 мин, после чего их тщательно отмывают стерильной дистиллированной водой. Простерилизованные семена помещают в чашки Петри на агаризованную питательную среду Стрита и выдерживают их в течение 4-5 дней при 26°C в темноте (Смирнов А.М. Рост и метаболизм изолированных корней в стерильной культуре. М.: Наука, 1970, с. 92). Не контаминированные проросшие семена переносят в биологические пробирки на питательную среду того же состава. Выращивание ювенильных растений проводят при температуре 26°C на свету (12-часовое освещение люминесцентными лампами). После появления пары настоящих листьев надземную часть проростков отделяют, нарезают на сегменты, которые после осторожного накалывания иглой инсулинового шприца помещают в жидкую питательную среду Мурасиге и Скуга (МС), содержащую суспензию 48-часовой почвенной бактерии. Для инокуляции эксплантов проростков используют дикий (не модифицированный) штамм почвенной агробактерии *Agrobacterium rhizogenes* (ATCC 15834). После инкубации с бактериями обработанные экспланты промывают стерильной средой и переносят на агаризованную питательную среду МС, не содержащую гормонов, но с добавлением антибиотика (клафоран - 500 мг/мл среды) для элиминирования бактерии. Через 3-4 недели на семядолях и первых листочках в зонах поранения появляются плагиотропно растущие корни, что является морфологическим признаком успешно прошедшей генетической трансформации (фиг. 1). Эти трансформированные участки отделяют и пересаживают на агаризованную питательную среду Гамборга (В5), содержащую уменьшенную дозу антибиотика (250 мг/мл среды). После 2-3 пассажей (период между пассажами составляет 4-6 недель) и достижения полного элиминирования почвенной агробактерии из культуры полученные корни переносят в чашки Петри с агаризованной средой того же состава, но без антибиотика, и выращивают в темноте при температуре 25°C. Исключение антибиотика из питательной среды приводит к стимуляции роста корней (фиг. 2). Длительное выращивание штамма культуры корня на агаризованной питательной среде способствует закреплению признаков ризогенеза и формированию интенсивно ветвящейся массы тонких корней. Перенос полученной стабильно растущей культуры корня после полуторагодичного выращивания (10 пассажей) на агаризованной среде в жидкую питательную среду того же состава (но без агара), то есть в условия погруженной качалочной культуры (90 об/мин), способствует значительному улучшению роста корней и образованию плотной массы тонких переплетенных корней желтовато-бежевого цвета (фиг. 3). Для поддержания непрерывного роста в условиях *in vitro* полученный таким путем штамм культуры корня шлемника Scut. andr. (HRC) нуждается в регулярных пересадках в свежую жидкую питательную среду через каждые 8 недель. Величина инокулюма при пересадках составляет около 1 г сырого веса корней на 100 мл питательной среды.

Результаты изобретения

К настоящему времени штамм культуры корня шлемника андрахновидного Scut. andr. (HRC) (*Scutellaria andrachnoides* Vved.) растёт стабильно, образуя за счет интенсивного ветвления массу плотно переплетенных корней (фиг. 4). Для поддержания непрерывного роста корневой культуры в период 6-недельного интервала между пересадками в культуральные колбы регулярно добавляют порцию свежей питательной среды (25-50 мл), что продлевает ростовую активность изолированно растущих корней и переводит ее в условия пролонгированного выращивания. При истощении питательной среды корни быстро темнеют, выделяя при этом в питательную среду образовавшиеся в них вторичные метаболиты, которые вызывают интоксикацию и гибель культуры.

Штамм культуры корня шлемника андрахновидного Scut. andr. (HRC) обладает всеми признаками rRi T-ДНК трансформированных корней, а именно интенсивным и стабильным плагиотропным ростом на питательных средах простого состава, не содержащих фитогормоны, способностью к синтезу опинов, которые являются маркерным признаком трансформации, а также генетической и биохимической стабильностью. По своей анатомии, морфологии и биохимии такие корни сопоставимы с корнями ювениль-

ных растений, так как они не имеют вторичного роста, способствующего утолщению корней.

Химический анализ вторичных метаболитов штамма культуры корня *Scut. andr.* (HRC) шлемника андрахновидного (*Scutellaria andrachnoides* Vved.) подтверждает, что штамм сохраняет способность к синтезу вторичных метаболитов, характерных для корней целого растения. Основными вторичными метаболитами корней проростков и штамма культуры корня шлемника андрахновидного *Scut. andr.* (HRC) являются фенольные соединения - флавоны группы байклеина и вогонина, а также фенилэтанол актеозид. Профиль высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) метанольного экстракта штамма культуры корня шлемника андрахновидного *Scut. andr.* (HRC) имеет большое сходство с профилем соответствующего экстракта корней проростков шлемника по времени удерживания (R_t) детектируемых веществ (фиг. 5 и 6). В результате препаративного разделения метанольного экстракта штамма культуры корня *Scut. andr.* (HRC) шлемника андрахновидного (*Scutellaria andrachnoides* Vved.) были выделены и очищены 2 доминирующих вещества, которые на основании данных ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектроскопии идентифицировали флавоны вононозид и фенилэтанол актеозид. Структурные формулы выделенных и идентифицированных вторичных метаболитов представлены на (фиг. 7 и 8). Определено количественное содержание вононозида и актеозидов в штамме культуры корня шлемника андрахновидного *Scut. andr.* (HRC), которое оказалось сопоставимым с содержанием этих метаболитов в корнях проростков и в корнях целого многолетнего растения. Установленный факт свидетельствует об обоснованности причисления штамма культуры корня шлемника андрахновидного *Scut. andr.* (HRC) к разряду продуцентов этих ценных природных веществ, представляющих большой интерес для медицинской практики.

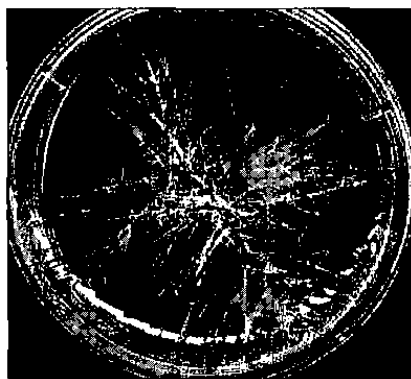
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Штамм культуры корня шлемника андрахновидного (*Scutellaria andrachnoides* Vved.), депонированный в Коллекции генетически трансформированных корней растений (КГТКР) при ФГБУН ИФР РАН под обозначением *Scut. andr.* (HRC) - продуцент вононозида и актеозидов.



Фиг. 1

Первичный ризогенез на листовой пластинке стерильного проростка шлемника



Фиг. 2

Второй пассаж трансформированных корней на агаризованной среде без антибиотика



Фиг. 3

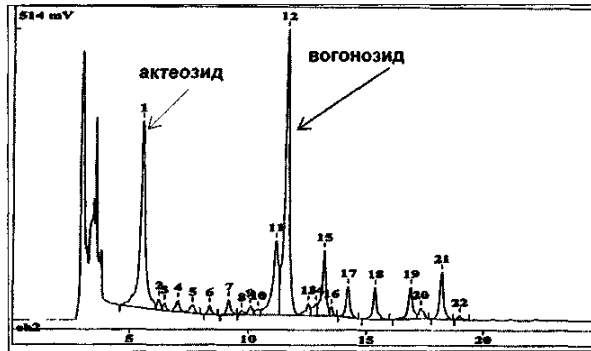
Первый пассаж корней шлемника в жидкой питательной среде



Фиг. 4

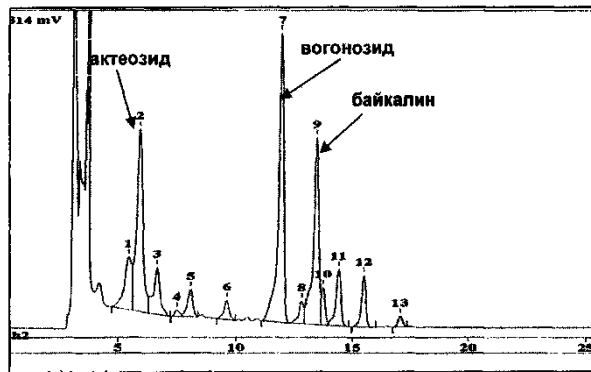
12-й пассаж стабильно растущего штамма 6-недельной культуры корня Scut. andr. (HRC)

Фиг. 5-8. ВЭЖХ профили метанольных экстрактов корней проростков и штамма культуры корня Scut. Andr. (HRC) и структурные формулы идентифицированных в них вторичных веществ



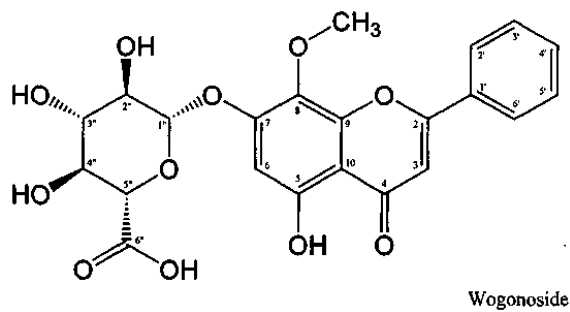
Фиг. 5

ВЭЖХ экстракта корней проростков шлемника

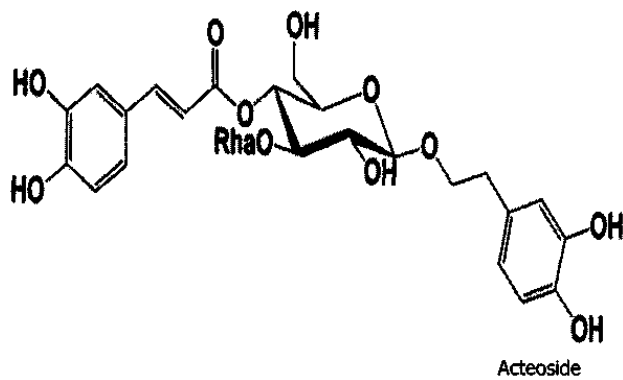


Фиг. 6

ВЭЖХ экстракта штамма культуры корня шлемника



Фиг. 7
Структурная формула вогонозида



Фиг. 8
Структурная формула актеозида

