

ОПТИМИЗАЦИЯ РЕЖИМОВ СТЕРИЛИЗАЦИИ ЛИСТОВЫХ ЭКСПЛАНТОВ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ *TAXUS SPP.* ПРИ ВВЕДЕНИИ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO*

С. Н. Филиппова, А. О. Логвина

Белорусский государственный университет
Минск, Беларусь, svetlan_rom@mail.ru

Исследованы различные режимы стерилизации эксплантов листового происхождения растений *Taxus baccata Semperaurea* L., *Taxus cuspidata* Sieb. et Zucc. и *Taxus Wallichiana* Zucc. с целью дальнейшего получения калусных культур. Выявлено, что среди протестированных режимов стерилизации, максимальная эффективность (до 93 %) наблюдалась при этапной процедуре асептики в этаноле (70 %, 5 мин), дезинфицирующем средстве «Domestos» (10 %, 5 мин) и сочетанном воздействии бензилпенициллина (1 %) и флуконазола (0,2 %) в течении суток.

Ключевые слова: биотехнология; культура *in vitro*; стерилизация эксплантов; бактериальная инфекция; микотическая инфекция; *Taxus spp.*

OPTIMIZATION OF EXPLANTS SURFACE STERILIZATION OF YEW SPECIES (*TAXUS SPP.*) FOR ESTABLISHMENT OF *IN VITRO* CULTURE

S. N. Filipava, H. O. Lohvina

Belarusian State University
Minsk, Republic of Belarus, E-mail: svetlan_rom@mail.ru

Different sterilization regimes for leaf explants from *Taxus baccata Semperaurea* L., *Taxus cuspidata* Sieb. et Zucc. and *Taxus Wallichiana* Zucc. were investigated with the aim of establishment of callus culture. It was revealed that among the tested sterilization regimes, the maximum efficiency (up to 93%) was observed with a staged asepsis procedure in ethanol (70%, 5 min), a Domestos disinfectant (10%, 5 min) and the combined effect of benzylpenicillin (1%) and fluconazole (0.2%) during the day.

Key words: biotechnology; *in vitro* culture; sterilization of explants; bacterial infection; mycotic infection; *Taxus spp.*

Известно, что в настоящее время возможности получения некоторых высоко ценных лекарственных субстанций в достаточном количестве зачастую ограничены. Это связано с низким их содержанием в тканях интактных растений и сокращением ресурсов ценных дикорастущих видов растений. К таким биологическим объектам относятся растения рода *Taxus spp.* Так, для удовлетворения потребностей фармацевтических производств при получении из тиса целевой лекарственной субстанции требуется значительный объем исходного сырья. Как отмечается некоторыми авторами [1], для получения одного килограмма таксола необходимо около 10000 кг коры от более чем 3000 деревьев тиса, а одному пациенту на курс химиотерапии требуется примерно 2,5–3 г паклитаксела [2], т.е. необходимо уничтожить около восьми 60-летних деревьев тиса. При этом нужно отметить, что Беларусь не обладает достаточными запасами растительного сырья для производства противоопухолевых лекарств. В частности, тис в естественных условиях произрастания в Беларуси не распространен.

Использование биотехнологических подходов позволяет перевести на кардинально новый уровень получение продукции растительного происхождения. Культуры клеток и тканей растений широко используются в качестве источников

получения лекарственных субстанций. Однако при введении в каллусную культуру клеток растительных объектов остро стоит проблема стерильности и заражения эксплантов бактериальной и микотической инфекцией.

Исследования клеточных культур *in vitro* различных видов растений рода *Taxus* spp., проводимые в разных лабораториях мира, показали, что этот объект является одним из наиболее сложных для введения в культуру. Во-первых, это связано с тем, что в нативных растениях зачастую содержится высокое количество внутренней инфекции. Поэтому экспланты таких биологических объектов тяжело поддаются поверхностной стерилизации. Во-вторых, в растения тиса накапливается значительное количество фенольных соединений и при посадке эксплантов данных растений на агаризованную питательную среду наблюдается их сверх экскреция. В результате, клетки иницирующей каллусной ткани тиса, в большинстве случаев, темнеют и гибнут от токсичного воздействия экскретируемых самим же эксплантом фенольных соединений и от инфекции. Таким образом, исследования, направленные на изучение эффективных методов борьбы с инфицированием эксплантов тиса и получение жизнеспособных эксплантов при введении в культуру *in vitro* являются крайне актуальными.

С целью получения стерильных эксплантов растений *Taxus baccata Semperaurea* L., *Taxus cuspidata* Sieb. et Zucc. и *Taxus Wallichiana* Zucc. исследовали влияние различных типов стерилизующих агентов на эффективность обеззараживания листьев вышеуказанных растений. Использовалась этапная стерилизация исходного растительного материала. Так, применяли спиртовой раствор, хлорсодержащие препараты, антибиотики и антимикотики.

Для получения стерильных эксплантов использовали листья (хвою) интактных растений. Растительный материал был любезно предоставлен академиком В.Н. Решетниковым (Центральный ботанический сад НАН Беларуси).

На первом этапе осуществляли подбор наиболее эффективного (с точки зрения качественной стерилизации и отсутствия некротизирующего влияния на экспланты) времени воздействия спиртового раствора и хлорсодержащего препарата. Для оптимизации условий стерилизации листьев использовали несколько режимов.

Вначале листья промывали с мыльным раствором в водопроводной воде в течение 5 мин. Все дальнейшие манипуляции осуществлялись в асептических условиях в ламинар-боксе. Затем листья стерилизовали в 70 % этаноле. Время инкубации варьировали от 3 до 10 мин. Далее листья переносили в 10 % раствор «Domestos» – дезинфицирующее средство, содержащее активный хлор (гипохлорит натрия) и инкубировали в течение 3-10 мин. На заключительном этапе листья четырежды промывали автоклавированной дистиллированной водой. На стерильных листьях делали небольшие надрезы (около 2-3 мм) с помощью ножниц для увеличения раневой поверхности. Экспланты переносили на агаризованную питательную среду МС не содержащую фитогормоны.

Эффективность различных режимов стерилизации эксплантов разных видов растений *Taxus* spp. при использовании спиртового раствора и хлорсодержащего препарата представлена в таблице 1.

В эксперименте определяли три показателя: количество асептических живых, некротических и инфицированных эксплантов. При этом наблюдались только некротические экспланты, только инфицированные и некротические и инфицированные одновременно.

В результате проведенных экспериментов было установлено, что среди исследуемых эксплантов наиболее эффективной стерилизации поддавались листья растений *Taxus cuspidata*. Количество асептических живых эксплантов в данном случае варьировало от 44 ± 4 до 65 ± 4 %.

Среди изучаемых режимов стерилизации листьев растений различных видов *Taxus* spp. наиболее оптимальным являлся режим № 4, где время последовательной инкубации эксплантов в 70 % этаноле и 10 % растворе «Domestos» составляло по 5 мин. При этом, максимальное количество асептических живых эксплантов было выявлено для листьев *Taxus cuspidate* (65 ± 4 %). А для эксплантов растений *Taxus Wallichiana* и *Taxus baccata Semperaurea* максимальное количество неинфицированных жизнеспособных эксплантов при указанном способе стерилизации составляло 56 ± 5 % и 50 ± 3 %, соответственно. Также нужно отметить, что, как видно из таблицы 1, повышение времени инкубации листьев в растворах этанола и «Domestos» до 10 мин приводило к существенному увеличению количества некротических эксплантов и уменьшению количества живых эксплантов всех исследуемых видов растений рода *Taxus* spp.

Таблица 1 – Эффективность различных режимов стерилизации листьев растений *Taxus* spp. при использовании спиртового раствора и хлорсодержащего препарата
Table 1 - The effectiveness of various modes of sterilization of leaves of plants *Taxus* spp. when using an alcohol solution and a chlorine-containing preparation

№ режима	Условия стерилизации		Количество эксплантов, %								
	Стерилизующий агент	Время воздействия, мин	асептических живых			некротических			инфицированных		
			<i>T. baccata Semperaurea</i>	<i>T. cuspidata</i>	<i>T. Wallichiana</i>	<i>T. baccata Semperaurea</i>	<i>T. cuspidata</i>	<i>T. Wallichiana</i>	<i>T. baccata Semperaurea</i>	<i>T. cuspidata</i>	<i>T. Wallichiana</i>
1	этанол	3	33 ± 4	44 ± 4	39 ± 3	7 ± 2	5 ± 1	5 ± 1	64 ± 5	52 ± 3	58 ± 4
	«Domestos»	3	4	4	3						
2	этанол	3	35 ± 2	50 ± 3	38 ± 4	15 ± 1	8 ± 2	12 ± 2	61 ± 4	48 ± 6	53 ± 3
	«Domestos»	5	2	3	4	1					
3	этанол	5	39 ± 4	47 ± 3	44 ± 2	12 ± 1	6 ± 2	11 ± 1	55 ± 5	40 ± 6	52 ± 5
	«Domestos»	3	4	3	2	1					
4	этанол	5	50 ± 3	65 ± 4	56 ± 5	19 ± 2	23 ± 4	26 ± 3	43 ± 5	32 ± 4	41 ± 5
	«Domestos»	5	3	4	5	2					
5	этанол	10	46 ± 4	57 ± 3	51 ± 3	40 ± 5	41 ± 6	46 ± 5	27 ± 3	23 ± 4	30 ± 4
	«Domestos»	10	4	3	3	5					

На втором этапе исследований проводили анализ влияния антибактериального и антимикотического препаратов на эффективность стерилизации листьев растений *Taxus baccata Semperaurea*, *Taxus Wallichiana* и *Taxus cuspidate*. В качестве антибактериального препарата использовали бензилпенициллин (бензилпенициллина натриевая соль) в концентрациях от 0,01 до 1 %. Данное вещество является антибиотиком группы биосинтетических

пенициллинов и оказывает бактерицидное действие за счет ингибирования синтеза клеточной стенки микроорганизмов [3]. Он активен в отношении различных штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий.

Также нами были проведены исследования по выявлению действия препарата антимикотической группы – флуконазола в концентрации 0,2 % индивидуально и совместно с вышеуказанным антибиотиком (в концентрации 1 %) на эффективность стерилизации листовых и стеблевых эксплантов растений рода *Taxus spp.* Флуконазол представляет собой противогрибковый препарат класса триазолов и является мощным и селективным ингибитором грибковых ферментов, необходимых для синтеза эргостерола [3]. Ингибирование синтеза эргостерола ведет к нарушению проницаемости клеточной стенки грибов. Флуконазол проявляет широкий спектр активности в отношении различных групп грибов, в том числе демонстрирует активность против – плесневых.

Эффективность различных режимов стерилизации эксплантов разных видов растений *Taxus spp.* при использовании антибактериальных и антимикотических средств представлена в таблице 2. Эксперимент проводили следующим образом. После осуществления первого этапа стерилизации, экспланты переносили в растворы антибактериальных и/или антимикотических препаратов, закрывали стаканы стерильной фольгой и оставляли инкубироваться на качалке роторного типа в течение суток. Потом экспланты промывали дважды дистиллированной стерильной водой и переносили на агаризованную среду без фитогормонов в чашки Петри. Как видно из таблицы 2, инкубация листьев в 0,01 % растворе антибиотика, преимущественно, не приводила к существенной разнице по сравнению с инкубацией в воде в течении суток. Увеличение концентрации раствора антибиотика до 1 % значительно повышало эффективность процедуры стерилизации. Так, например, при инкубации эксплантов в 1 % растворе бензилпенициллина, количество асептических живых эксплантов составляло $77 \pm 4 \%$ – $89 \pm 5 \%$, что является достаточно высоким показателем по сравнению с инкубацией листьев в воде.

Инкубация эксплантов тиса в 0,2 % растворе флуконазола повышала эффективность стерилизации только в случае листьев *T. baccata Semperaurea*. Количество асептических эксплантов составляла в данном случае $69 \pm 4 \%$, а при инкубации в воде – $55 \pm 4 \%$.

Максимальная эффективность стерилизации листовых эксплантов была установлена при сочетанном воздействии бензилпенициллина в концентрации 1% и флуконазола в концентрации 0,2 %, что видно из таблицы 2. Количество асептических живых эксплантов при этом варьировало в диапазоне от $86 \pm 5 \%$ у *T. baccata Semperaurea* до $93 \pm 5 \%$ у *Taxus cuspidate*. Стерильные листовые экспланты растений *Taxus baccata Semperaurea*, *Taxus cuspidata* и *Taxus Wallichiana* далее культивировались в условиях термостата при 25 °С в темноте на агаризованной питательной среде.

Таким образом, были разработаны режимы стерилизации эксплантов листового происхождения с целью дальнейшего получения каллусных культур. Было показано, что среди протестированных режимов стерилизации эксплантов трех видов *Taxus spp.*, максимальная эффективность наблюдалась при этапной процедуре асептики в этаноле (70 %, 5 мин), дезинфицирующем средстве «Domestos» (10 %, 5 мин) и сочетанном воздействии бензилпенициллина (1 %) и флуконазола (0,2 %) в течении суток. При этом количество асептических живых

эксплантов составляло для *T. baccata Semperaurea* – 86 ± 5 %, *T. cuspidata* – 92 ± 4 % и *T. Wallichiana* – 93 ± 5 %.

Таблица 2 – Эффективность различных режимов стерилизации листьев растений *Taxus* spp. при использовании антибактериальных и антимикотических средств
Table 2 - The effectiveness of various modes of sterilization of leaves of plants *Taxus* spp. when using antibacterial and antimycotic agents

№ режима	Стерилизующий агент	Количество эксплантов, %								
		асептических живых			некротических			инфицированных		
		<i>T. baccata Semperaurea</i>	<i>T. cuspidata</i>	<i>T. Wallichiana</i>	<i>T. baccata Semperaurea</i>	<i>T. cuspidata</i>	<i>T. Wallichiana</i>	<i>T. baccata Semperaurea</i>	<i>T. cuspidata</i>	<i>T. Wallichiana</i>
1	Вода	55 ± 4	68 ± 5	69 ± 4	7 ± 1	5 ± 1	22 ± 3	40 ± 4	29 ± 4	30 ± 3
2	Антибиотик, 0,01 %	58 ± 3	62 ± 3	64 ± 4	15 ± 3	14 ± 2	4 ± 1	36 ± 4	34 ± 3	33 ± 4
3	Антибиотик, 0,1 %	67 ± 3	69 ± 4	76 ± 5	14 ± 2	0	13 ± 3	31 ± 5	26 ± 2	21 ± 3
4	Антибиотик, 1 %	77 ± 4	86 ± 5	89 ± 5	5 ± 1	0	6 ± 1	20 ± 3	14 ± 2	10 ± 3
5	Антимикотик, 0,2 %	69 ± 4	75 ± 5	64 ± 4	21 ± 3	18 ± 4	12 ± 2	34 ± 3	23 ± 4	32 ± 2
6	Антибиотик, 1 % + Антимикотик, 0,2 %	86 ± 5	92 ± 4	93 ± 5	5 ± 2	0	0	13 ± 2	8 ± 1	7 ± 1

Библиографические ссылки

1. Рост и биосинтетические характеристики суспензионной культуры *taxus baccata* при выращивании в колбах и биореакторе / Л. В. Орлова [и др.] // Вестник ПГТУ. 2014. № 3 (23). С. 86–96.
2. Malik, S., Rosa M., Cusido B. Production of the anticancer drug taxol in *Taxus baccata* suspension cultures // Process Biochemistry. 2011. Vol. 46. P. 23–34.
3. Справочник Видаль. Лекарственные препараты в России : Справочник / Научно-этический комитет ; редкол.: Ю.Ф. Исаков [и др.]. М.: АстраФармСервис, 2001. 1536 с.