

**ИЗМЕНЕНИЕ РОСТОВОЙ АКТИВНОСТИ И ПРОДУКЦИИ
ПОЛИСАХАРИДОВ КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРОЙ *ECHINACEA PURPUREA* ПРИ
ВАРЬИРОВАНИИ СОДЕРЖАНИЯ ФИТОГОРМОНОВ И УГЛЕВОДОВ В
ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ**

Т.И. Дитченко, В.М. Юрин

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

Представители рода эхинацея (*Echinacea Moench.*) становятся чрезвычайно популярными в последнее время благодаря получаемым из них лекарственным препаратам, обладающим иммуностимулирующим действием. Действительно, одной из острейших проблем населения большинства индустриальных городов является сниженный уровень иммунитета, обусловленный влиянием ряда неблагоприятных факторов. Поэтому фитохимики, фармакологи и врачи разного профиля проявляют повышенный интерес к изучению и использованию данного растения, которое зарекомендовало себя как прекрасный иммуностимулятор природного происхождения. Среди веществ, обнаруженных в эхинацее и имеющих значение для медицины, – полисахариды, флавоноиды, производные кофейной кислоты, эфирные масла, алкимиды ненасыщенных кислот, макро- и микроэлементы [1]. Водорастворимый полисахаридный комплекс эхинацеи оказывает регулирующее влияние на иммунную систему: активизирует гистогенные и гематогенные фагоциты, макрофаги, стимулирует синтез интерферона, увеличивает количество и функциональную активность Т-супрессоров лимфоцитов с одновременным угнетением аллергической реакции организма на внешние раздражители [2]. Флавоноиды, а также производные кофейной и цикориевой кислот, содержащиеся в эхинацее, проявляют антиоксидантное, иммуностимулирующее, мембраностабилизирующее, противобактериальное, противовирусное действие [3]. Жирорастворимые компоненты усиливают фагоцитоз [2]. Из всех видов эхинацеи – эхинацея пурпурная (*Echinacea purpurea* (L.)) является лидером по содержанию ценных веществ и представляет наибольший интерес в качестве лекарственного сырья [1], поэтому необходим поиск путей увеличения возможностей получения ее биомассы. Альтернативными источниками биологически активных соединений растительного происхождения могут выступать клеточные культуры, поскольку выращивание клеток и тканей-продуцентов физиологически важных веществ обладает значительными преимуществами по сравнению с традиционным производством растительного сырья: независимость от влияния различных факторов окружающей среды (климат, сезон,

погода, почвенные условия, вредители); более высокий выход и качество продукта благодаря оптимизации и стандартизации условий выращивания, а также экономия посевных площадей [4-6]. Это направление является перспективным и для эхинацеи пурпурной, поскольку уже имеются данные согласно которым полисахариды, продуцируемые культурой ее клеток характеризуются не менее выраженной иммуностимулирующей активностью, чем полученные из интактных растений [7]. В связи с этим целью работы явилось изучение регуляции ростовых процессов каллусной культуры *Echinacea purpurea* под действием фитогормонов, а также определение содержания в ней водорастворимых полисахаридов в зависимости от уровня сахарозы как основного источника углеводов в питательной среде.

Объектом исследований служили каллусы, которые были инициированы из листовых эксплантов, изолированных из асептически выращиваемых трехнедельных проростков *Echinacea purpurea*. Для индукции каллусогенеза и поддержания роста полученной каллусной культуры использовалась питательная среда Мурасиге-Скуга [8], которая содержала регуляторы роста – ауксины (2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д) и индолил-3-уксусную кислоту (ИУК)) и цитокинины (кинетин). С целью получения первичного каллуса, а также на первых этапах его культивирования *in vitro* было использовано 4 варианта питательных сред, для которых концентрации 2,4-Д составляли 0,5 и 1,0 мг/л, а кинетина – 1,0 и 2,0 мг/л. Поскольку при индукции образования каллуса вещества ауксиновой и цитокининовой природы обычно применяются в более высоких концентрациях, чем те, которые используются для поддержания его роста [9], то в последующем для изучения ростовых характеристик полученных каллусных культур применялись среды с более низким содержанием 2,4-Д (0,1 и 0,2 мг/л), а также 0,2; 0,5 и 1,0 мг/л кинетина (всего 6 вариантов). Указанные среды дополнительно включали в качестве ауксина ИУК в концентрации 2,0 мг/л с целью получения каллусов более рыхлого типа [5]. Выращивание каллусов осуществлялось в условиях термостата в темноте при температуре 24,5 °С. Для учета ростовых процессов каллусных культур определяли удельную скорость роста

$$V=(m_i-m_o)/(m_o \cdot t),$$

(1)

где m_o – исходная масса каллуса (г),

m_i – конечная масса каллуса (г),

t – продолжительность культивирования (сут),

а также рассчитывали время удвоения биомассы [10]:

$$T = \ln 2/V$$

(2).

Определение суммарного содержания водорастворимых полисахаридов осуществлялось с помощью антронового метода, который заключается в спектрофотометрическом измерении оптической плотности продуктов реакции полисахаридов с антроном в присутствии концентрированной серной кислоты [11]. Экстракция анализируемых соединений из каллусных тканей осуществлялась водой в течение 2 ч при нагревании на кипящей водяной бане с обратным холодильником. Экстракт фильтровали через бумажный фильтр, отбирали 2 мл, которые переносили в центрифужную пробирку и добавляли 4 мл 95%-ного этилового спирта. Через 1 час содержимое пробирки центрифугировали в течение 10 мин в центрифуге со скоростью вращения 3000 об/мин. Осадок количественно переносили с использованием воды очищенной в мерную колбу вместимостью 25 мл. Объем доводили водой до метки. К 1 мл полученного раствора добавляли 2 мл 0,2%-ного раствора антрона в концентрированной серной кислоте. Контролем служил раствор, включающий 2 мл антронового реактива и 1 мл воды. Пробирки с контрольной и опытной смесью нагревали на кипящей водяной бане в течение 15 мин, затем охлаждали и измеряли оптическую плотность на спектрофотометре Ultrospec 100 pro при длине волны 625 нм в кювете с толщиной поглощающего слоя 10 мм. Вычисление процентного содержания полисахаридов проводили с помощью калибровочного графика, построенного по глюкозе.

На первом этапе было изучено влияние регуляторов роста на индукцию каллусогенеза и показатели роста каллусной культуры *Echinacea purpurea*, поскольку уровень и соотношение фитогормонов – решающий фактор питательной среды, эффективно контролирующий не только скорость ростовых процессов, но и метаболическую и биосинтетическую активность культивируемых *in vitro* растительных клеток. Было установлено, что наиболее интенсивное формирование каллусов через 36-40 сут после переноса листовых эксплантов на питательные среды наблюдалось в присутствии 0,5 мг/л 2,4-Д и 2,0 мг/л кинетина, а также 1,0 мг/л 2,4-Д и 2,0 мг/л кинетина. В двух других вариантах использованных питательных сред (0,5 мг/л 2,4-Д + 1,0 мг/л кинетина, а также 1,0 мг/л 2,4-Д + 1,0 мг/л кинетина) индукция каллусогенеза была гораздо менее выраженной. Таким образом, уменьшение уровня кинетина от 2,0 до 1,0 мг/л приводило к снижению интенсивности формирования первичного каллуса у листовых эксплантов эхинацеи.

В результате культивирования каллусов *Echinacea purpurea* на 6 вариантах питательных сред, которые характеризовались более низкими уровнями содержания 2,4-Д

и кинетина на фоне 2,0 мг/л ИУК, были обнаружены значительные различия в скорости их ростовых процессов. Наиболее активный каллусный рост наблюдался в шестом варианте питательной среды, включавшей 0,2 мг/л 2,4-Д, 1,0 мг/л кинетина и 2,0 мг/л ИУК. Средние значения удельной скорости роста составляли в данном случае $(0,064 \pm 0,008)$ сут⁻¹. Практически равные показатели были получены для четвертого и пятого вариантов питательных сред, при этом величины удельной скорости роста не более чем в 1,2 раза были ниже по сравнению с шестым вариантом. Указанные различия не являлись статистически достоверными. Наиболее низкая удельная скорость роста каллусов *Echinacea purpurea* отмечалась в присутствии 0,1 мг/л 2,4-Д, 1,0 мг/л кинетина, 2,0 мг/л ИУК и составляла $(0,036 \pm 0,005)$ сут⁻¹. Таким образом, она была в 1,8 раза ниже по сравнению со средней скоростью роста каллусов, культивируемых на среде, содержащей 0,2 мг/л 2,4-Д, 1,0 мг/л кинетина, 2,0 мг/л ИУК. Среди протестированных вариантов питательных сред промежуточное положение занимают первый и второй варианты, для которых средние величины удельной скорости роста каллусов в 1,4-1,5 раза были ниже по сравнению с наиболее оптимальным вариантом питательной среды (рис. 1).

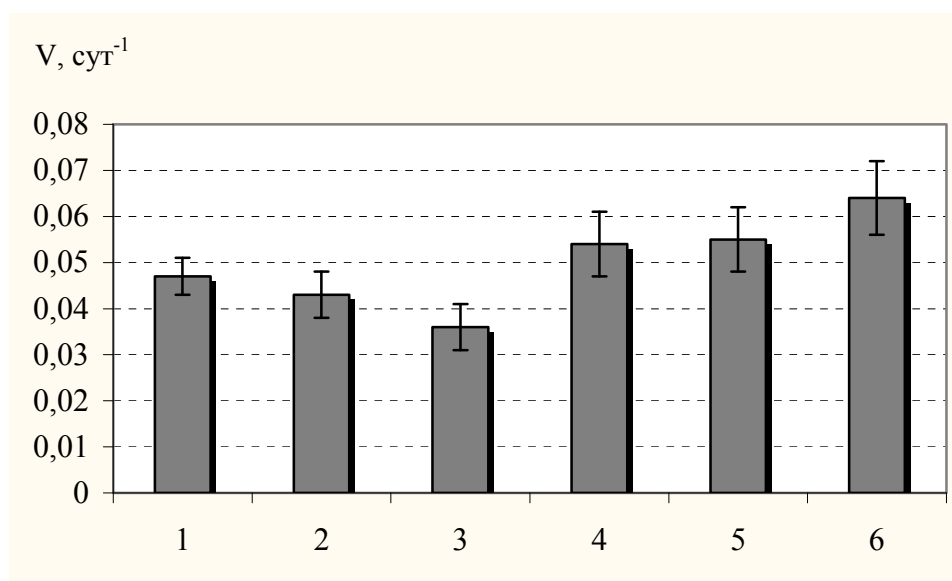


Рисунок 1 - Зависимость удельной скорости роста каллусной культуры *Echinacea purpurea* от концентрации 2,4-Д и кинетина в питательной среде на фоне 2,0 мг/л ИУК:

1 – 0,1 мг/л 2,4-Д и 0,2 мг/л кинетина; 2 – 0,1 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетина;
 3 – 0,1 мг/л 2,4-Д и 1,0 мг/л кинетина; 4 – 0,2 мг/л 2,4-Д и 0,2 мг/л кинетина;
 5 – 0,2 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетина; 6 – 0,2 мг/л 2,4-Д и 1,0 мг/л кинетина.

Приведены средние значения $\pm$ ошибка средней величины для 15-25 экспериментов.

На рис. 2 представлена зависимость времени удвоения биомассы каллусной культуры *Echinacea purpurea* от содержания фитогормонов в питательной среде. Из приведенных

результатов видно, что наименьшее время требуется для удвоения биомассы каллусов, выращиваемых на среде, содержащей 0,2 мг/л 2,4-Д, 1,0 мг/л кинетина, 2,0 мг/л ИУК, и составляет в среднем $(13,2 \pm 1,5)$ сут. Наибольшее время удвоения биомассы отмечается для каллусов, культивируемых в присутствии 0,1 мг/л 2,4-Д и 1,0 мг/л кинетина, 2,0 мг/л ИУК – $(24,8 \pm 2,8)$ сут.

Анализ полученных данных позволяет разделить все использованные варианты питательных сред для роста каллусов *Echinacea purpurea* на две группы. Первую составляют среды, содержащие 2,4-Д в концентрации 0,1 мг/л и характеризующие относительно низкими показателями удельной скорости роста каллусной культуры и соответственно, более продолжительным временем удвоения биомассы.

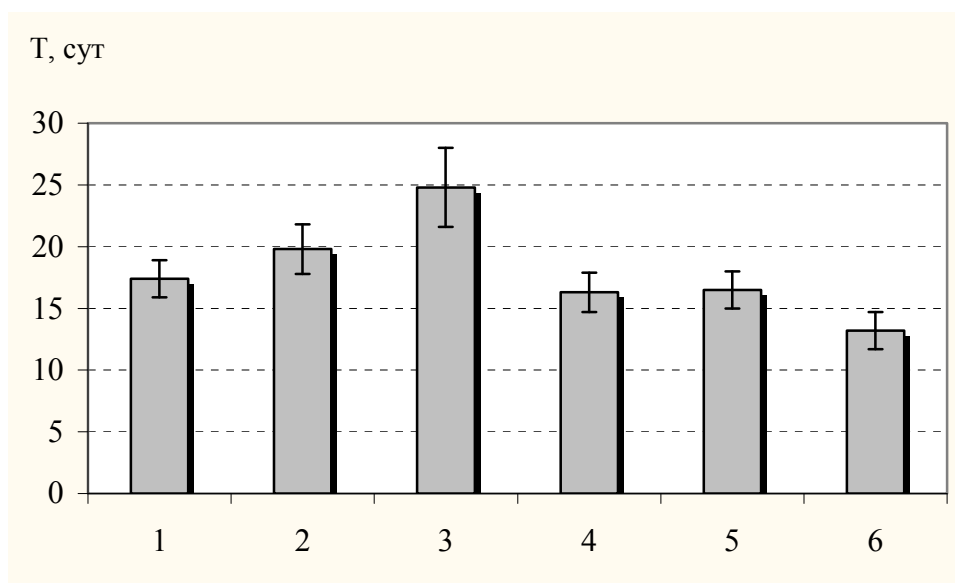


Рисунок 2 - Зависимость времени удвоения биомассы каллусной культуры *Echinacea purpurea* от концентрации 2,4-Д и кинетина в питательной среде на фоне 2,0 мг/л ИУК:

- 1 – 0,1 мг/л 2,4-Д и 0,2 мг/л кинетина; 2 – 0,1 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетина;
- 3 – 0,1 мг/л 2,4-Д и 1,0 мг/л кинетина; 4 – 0,2 мг/л 2,4-Д и 0,2 мг/л кинетина;
- 5 – 0,2 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетина; 6 – 0,2 мг/л 2,4-Д и 1,0 мг/л кинетина.

Приведены средние значения $\pm$ ошибка средней величины для 15-25 экспериментов.

С другой стороны, для таких вариантов питательных сред, которые содержали указанный регулятор роста в концентрации 0,2 мг/л, отмечается гораздо более высокая активность ростовых процессов исследуемой культуры. Таким образом, критическим фактором для поддержания нормального роста каллусов *Echinacea purpurea* может выступать концентрация 2,4-Д в питательной среде, тогда как варьирование концентрации кинетина от 0,2 до 1,0 мг/л не вызывает достоверных эффектов.

Известно, что избыток или недостаток источника углерода в питательной среде вызывает различные реакции культивируемых *in vitro* растительных клеток и оказывает значительное влияние на их метаболизм. Культуры клеток могут расти на различных

углеводах (испытано более 30 соединений), но, как правило, лучший рост отмечается на двух источниках углерода: сахарозе и глюкозе [12]. Для отдельных каллусных культур показано, что природа и концентрация источника углерода оказывает влияние на продуцирование иммуноактивных полисахаридов [13]. Таким образом, установление взаимосвязи между ростовой и биосинтетической активностью каллусной культуры *Echinacea purpurea* на средах с разным уровнем сахарозы представляет значительный интерес. В экспериментах по изучению влияния концентрации сахарозы на уровень накопления водорастворимых полисахаридов в каллусной ткани была использована установленная в результате тестирования рассмотренных ранее вариантов питательных сред наиболее оптимальная комбинация регуляторов роста для культивирования каллусов *Echinacea purpurea*.

Результаты, отражающие изменение удельной скорости роста исследуемой каллусной культуры, при варьировании концентрации сахарозы в среде культивирования от 10 до 50 г/л представлены на рис. 3. Согласно полученным данным, оптимальной для роста каллусов является концентрация сахарозы, которая характерна для питательной среды Мурасиге и Скуга и составляет 30 г/л. Как снижение, так и увеличение ее уровня на 10-20 г/л приводило к подавлению ростовой активности каллусной культуры *Echinacea purpurea*. Наиболее негативным явилось повышение концентрации сахарозы в питательной среде до 50 г/л, поскольку средние значения удельной скорости роста снижались при этом более чем в 2 раза по сравнению с каллусами, культивируемыми в присутствии сахарозы в концентрации 30 г/л.

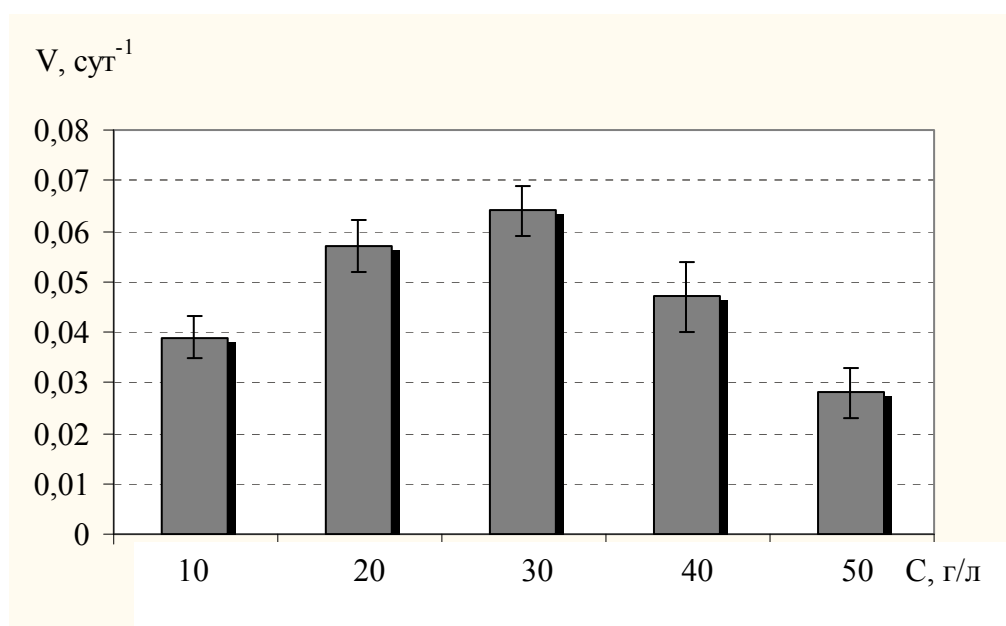


Рисунок 3 - Влияние концентрации сахарозы в питательной среде на удельную скорость каллусной культуры *Echinacea purpurea*.
Приведены средние значения $\pm$ ошибка средней величины для 10-12 экспериментов.

Определение времени удвоения биомассы каллусной культуры *Echinacea purpurea* на средах с разным уровнем сахарозы показало, что в диапазоне концентраций от 20 до 40 г/л не отмечается достоверных различий между средними значениями данного показателя (рис. 4).

Однако более значительное варьирование концентрации сахарозы в питательной среде вызывало практически двукратное возрастание периода, за который происходило удвоение биомассы каллусов.

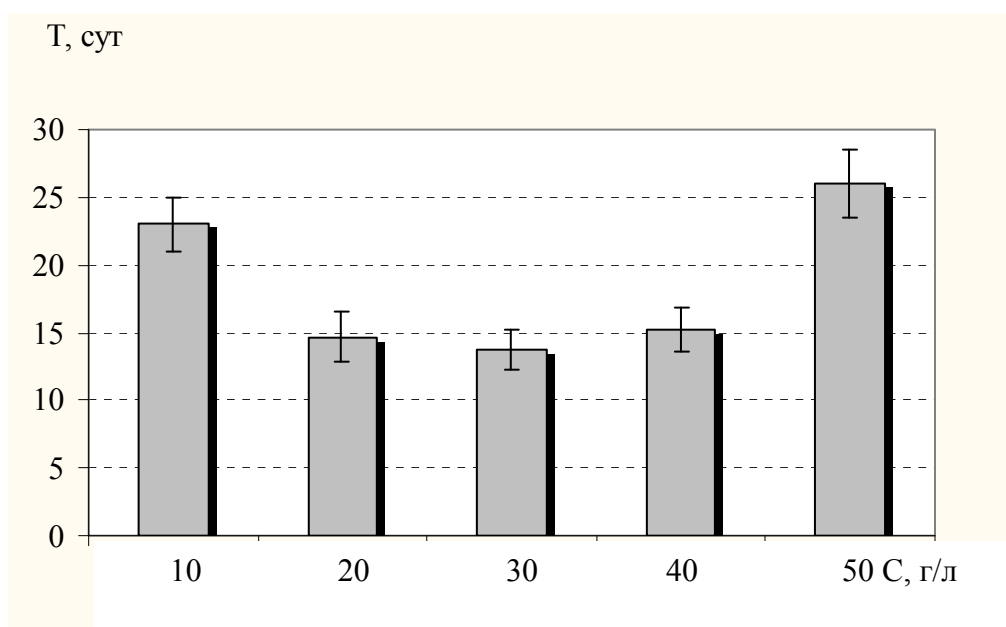


Рисунок 4 - Влияние концентрации сахарозы в питательной среде на время удвоения биомассы каллусной культуры *Echinacea purpurea*.
Приведены средние значения $\pm$ ошибка средней величины для 10-12 экспериментов.

Угнетение роста каллусной культуры *Echinacea purpurea* в присутствии 50 г/л сахарозы может быть вызвано высоким осмотическим давлением (осмотическим стрессом), создающимся при повышенном содержании сахарозы как одного из главных осмотически активных компонентов питательных сред. Аналогичный по величине эффект, наблюдаемый при уменьшении концентрации сахарозы до 10 г/л, несомненно, обусловлен иными причинами. Согласно работам [14, 15] в ответ на недостаток или отсутствие сахара в среде культивирования наблюдалось замедление либо в целом прекращение роста клеток суспензионных культур явора и риса, быстрое потребление углеводов клетки и снижение интенсивности дыхания, деградация липидов и протеинов,

снижение активности ферментов. Вероятно, аналогичные физиологические изменения происходят при выращивании исследуемой каллусной культуры на средах с низкими концентрациями сахарозы, вызывающими угнетение роста клеток.

Для оценки эффективности культивирования каллусов *Echinacea purpurea* было проведено количественное определение в них суммы водорастворимых полисахаридов и в сухом растительном материале «Трава эхинацеи пурпурной». Согласно полученным данным каллусы *Echinacea purpurea*, культивируемые на питательных средах, включающих 20 и 30 г/л сахарозы, не только не уступают по количественному содержанию водорастворимых полисахаридов традиционно используемому сырью данного лекарственного растения, но даже незначительно превосходят его (рис. 5).

Выход полисахаридов,
% от сухой массы

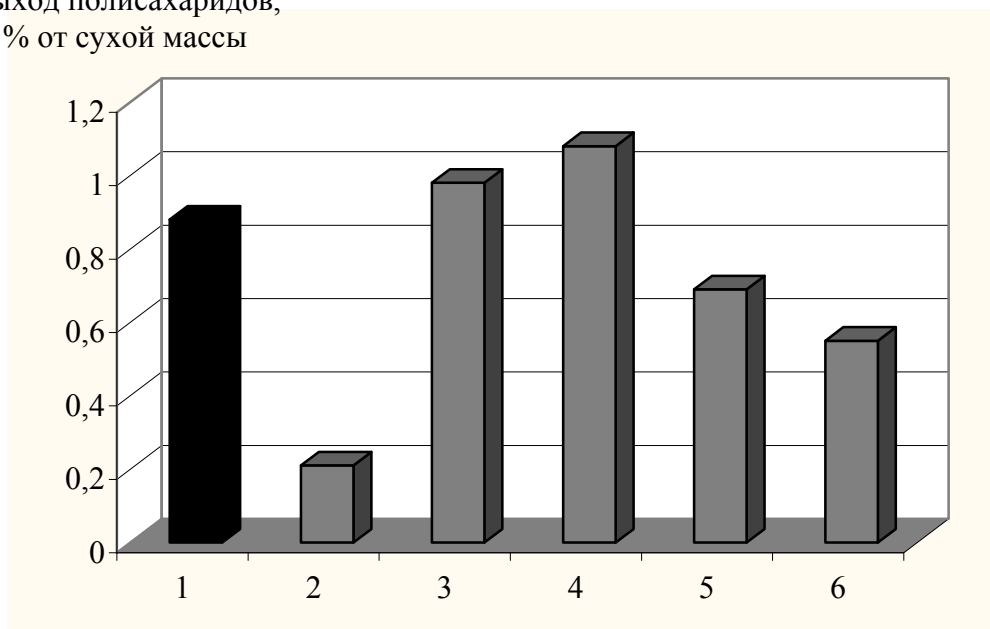


Рисунок 5 - Содержание водорастворимых полисахаридов в растительном материале «Трава эхинацеи пурпурной» (1) и каллусной культуре *Echinacea purpurea* (2-5) при варьировании уровня сахарозы в среде культивирования: 2 – 10 г/л, 3 – 20 г/л, 4 – 30 г/л, 5 – 40 г/л, 6 – 50 г/л.

Приведены средние значения для 3-5 экспериментов.

Подобный эффект отмечается не для всех каллусных культур, которые в настоящее время рассматриваются в качестве альтернативных источников получения данных соединений. В работе [16] показано, что выход полисахаридов из каллусной культуры ряски малой (*Lemna minor*) ниже, чем для нативного растения. В случае смолевки (*Silene vulgaris*) и пижмы обыкновенной (*Tanacetum vulgare*), наоборот, было обнаружено более высокое содержание полисахаридов в каллусных культурах, чем в стеблях нативных

растений. Повышенные концентрации сахарозы в питательной среде обычно приводят к увеличению выхода биологически активных соединений, получаемых из культивируемых *in vitro* растительных клеток [5]. Однако для исследуемой каллусной культуры увеличение уровня сахарозы в среде культивирования от 30 до 40 и 50 г/л вызывало снижению выхода полисахаридов в 1,6 и 1,9 раза, соответственно. Таким образом, каллусные ткани *Echinacea purpurea* оказались достаточно чувствительными к повышению осмотического давления питательной среды, что выразилось в снижении их биосинтетической способности.

Однако еще более значительное падение содержания водорастворимых полисахаридов в каллусах *Echinacea purpurea* наблюдалось в случае использования питательной среды, включающей 10 г/л сахарозы. Снижение уровня их накопления достигало в этом случае 5 раз, что свидетельствует о крайне неблагоприятных сдвигах в метаболических процессах каллусных клеток эхинацеи при резком дефиците углерода в среде культивирования. Таким образом, если повышение концентрации сахарозы в среде культивирования до 50 г/л вызывало более сильное подавление скорости ростовых процессов, чем ее снижение до 10 г/л, то в отношении способности к синтезу водорастворимых полисахаридов наблюдалась обратная закономерность. Это указывает на отсутствие строго выраженной корреляции между удельной скоростью роста и суммарным содержанием полисахаридов в изученных каллусных культурах.

Анализ полученных данных позволяет заключить, что культура клеток *Echinacea purpurea* может выступать в качестве перспективного источника получения иммуноактивных водорастворимых полисахаридов. При этом снижение обычного уровня сахарозы в среде Мурасиге и Скуга до 20 г/л не приводит к уменьшению выхода целевых продуктов, что может рассматриваться как один из способов экономии затрат на их получение.

Литература

1. Самородов, В.Н. Фитохимический состав представителей рода эхинацея (*Echinacea Moench.*) и его фармакологические свойства (обзор) // В.Н. Самородов, С.В. Поспелов, Г.Ф. Моисеева // Химико-фармацевтический журнал. – 1996. – № 4. – С. 32–37.
2. Бирман, Б.Я. Эхинацея – природный адаптоген с широким спектром действия / Б.Я. Бирман, Д.С. Голубев // Ветеринарная наука – производству: научные труды / РНИУП "Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского НАН Беларуси. – Минск, 2005. – Т. 38. – С. 107–111.
3. Серeda, А.В. Биологически активные вещества и стандартизация лекарственных растений рода *Echinacea* / А.В. Серeda, Г.Ф. Моисеева // Фармакон. – 1998. – № 3. – С. 13–23.

4. Vanisree, M. Plant Cell Cultures – An Alternative and Efficient Source for the Production of Biologically Important Secondary Metabolites / M. Vanisree, T. Hsin-Sheng // International Journal of Applied Science and Engineering. – 2004. – V. 2. – P. 29–48.
5. Биотехнология растений: культура клеток / – М.: Агропромиздат, 1989. – 280 с.
6. Бутенко, Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе / Р.Г. Бутенко. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
7. Immunologically polysaccharides of *Echinacea purpurea* cell cultures / H. Wagner [et al.] // Phytochemistry. – 1998. – Vol. 27, № 1. – P. 119–126.
8. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // Physiol. Plant. – 1968. – Vol. 15, №13. – P. 473–497.
9. Калинин, Ф.Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф.Л. Калинин, В.В. Сарнацкая, В.Е. Полищук. – Киев: Наукова думка, 1980. – 356 с.
10. Загребельный, С.Н. Биотехнология. Часть 1. Культивирование продуцентов и очистка продуктов / С.Н. Загребельный. – Новосибирск: Новосиб. гос. ун-т, 2000. – 108 с.
11. Выделение и анализ полисахаридной фракции из биомасс штаммов *Panax ginseng* и *P. quinquefolius* L. с герматраном «LX-5»/ Е.Г. Остроженкова [и др.] // Растительные ресурсы. – 2002. – Т.38. – С. 120–124.
12. Холодова, В.П. Культура клеток растений / В.П. Холодова. – М.: Наука, 1981. – 36 с.
13. Гюнтер, Е.А. Продуцирование полисахаридов каллусной культурой в зависимости от углеводов среды / Е.А. Гюнтер, Ю.С. Оводов // Биохимия – 2003. – Т. 68, вып. 8. – С. 1079–1087.
14. Su-May, Yu Cellular and Genetic Responses of Plants to Sugar Starvation / Yu Su-May // Plant Physiology. – 1999. – V. 121. – P. 687–693.
15. Chen, M.H. Expression of alpha-amylases carbohydrate metabolism and autophagy in cultured rice cells in coordinately regulated by sugar nutrient / M.H. Chen, L.F. Liu // Plant J., – 1994. – V. 6. – P. 625–636.
16. Гюнтер, Е.А. Культуры клеток нетрадиционных растений как продуценты полисахаридов / Е.А. Гюнтер // Химия возобновляемых растительных ресурсов. – 2001, №5. – С. 11–12.