

РАЗРАБОТКА СОСТАВА ПРОДУКЦИОННОЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КАЛЛУСНОЙ ТКАНИ ЭХИНАЦЕИ ПУРПУРНОЙ В КАЧЕСТВЕ ИСТОЧНИКА ГИДРОКСИКОРИЧНЫХ КИСЛОТ

Т.И. Дитченко, В.М. Юрин

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

Введение

Гидроксикоричные кислоты (ГКК) (пара-кумаровая, кофейная, феруловая, синаповая и др.) являются наиболее распространенными фенолкарбоновыми кислотами в высших растениях и выступают биогенетическими предшественниками большинства других фенольных соединений. Характерная особенность ГКК – способность образовывать сложные эфиры с ациклическими кислотами (хинной, шикимовой и др.). Наиболее известными из таких соединений являются хлорогеновая, цикориевая, кафтаровая и другие кислоты.

Все ГКК и их производные – мощные антиоксиданты, проявляют выраженные антирадикальные свойства в тестах *in vitro*. Хорошо изучены их иммуностимулирующая, противовирусная и противовоспалительная активности. Установлено выраженное желчегонное действие феруловой, кофейной, хлорогеновой кислот и особенно цинарина (1,4-дикофеилхинная кислота). Сумма кофейной, хлорогеновой, феруловой, кумаровой и других кофеилхинных кислот оказывает гипоазотемический эффект, усиливает функцию почек, стимулирует антитоксическую функцию печени, обладает антимикробным, антибластомным действием [1–2].

Высоким содержанием как свободных ГКК, так и их производных характеризуются представители рода *Echinacea*, в частности *Echinacea purpurea*, лекарственное сырье которой широко используется в медицине в качестве источника препаратов для коррекции нарушений функций иммунной системы, таких как «Иммунал», «Эхинафорс», капли доктора Тайса и др.

В последние годы показано, что растительное сырье, содержащее ГКК и их производные, может быть использовано не только в медицинских целях, но и в сельском хозяйстве. В частности, на основе ГКК разработана технология получения препарата «Циркон», который является ростостимулятором растений, иммуномодулятором, корнеобразователем, активатором, обладающим антистрессовым действием [3]. Данный препарат изготавливается из лекарственного растения эхинацеи пурпурной и представляет собой раствор ГКК в этаноле с концентрацией 0,01%.

В условиях Беларуси эхинацея пурпурная является интродуцентом. Поэтому представляется актуальным поиск подходов, позволяющих получать фитомассу данного лекарственного растения независимо от сезонных, погодных и других факторов. В этом плане наиболее перспективным выступает биотехнологический способ наработки биомассы эхинацеи пурпурной, основанный на выращивании *in vitro* ее каллусных и суспензионных культур.

Однако следует отметить, что основной проблемой метода культуры тканей и клеток высших растений в аспекте получения ценных вторичных метаболитов зачастую является низкий конечный выход целевого продукта. Это обусловлено тем, что в условиях *in vitro* клетки выходят из-под организменного контроля, присущего целому растению, и образуют специфическую биологическую систему – популяцию соматических клеток. Основное свойство такой популяции – отбор клеток по интенсивной и (или) устойчивой пролиферации, но не по способности к синтезу ценных для человека веществ [4]. Другими словами, получить в постоянно делящихся клетках растений хороший уровень синтеза целевых продуктов или «веществ интереса» – сложная задача. Только благодаря правильно разработанной стратегии получения высокопродуктивных штаммов к настоящему времени

созданы культуры тканей, в которых содержание вторичных продуктов достаточно велико, чтобы служить лекарственным сырьем [5].

Ключевым моментом повышения выхода продукта выступает оптимизация питательной среды. Результатом подобных исследований являются так называемые продукционные среды, на которых культивируемые клетки синтезируют значительное количество вторичных метаболитов. Следует отметить, что состав продукционной питательной среды и содержание в ней отдельных компонентов (макро- и микроэлементов, источника углерода, фитогормонов и т.д.), как правило, значительно отличаются от оптимальной для роста клеточной культуры питательной среды [6]. В связи с этим на практике обычно применяется двухстадийный способ культивирования. На первом этапе клеточные культуры выращивают на стандартной среде, т.е. создаются оптимальные условия для накопления биомассы, а на втором – их пересаживают на «продуцирующую» среду, после чего метаболизм клеток сдвигается в сторону синтеза продуктов вторичного метаболизма [7].

В предыдущих работах нами были выявлены эффекты модификации состава питательной среды, а также физических условий выращивания (свет, температура) на показатели прироста биомассы и уровни содержания ГKK в клеточных культурах эхинацеи пурпурной [8–9]. Использование указанных подходов позволило добиться повышения биосинтетического потенциала исходно полученной каллусной ткани практически в 4 раза (рост содержания ГKK и их производных составил от 0,29% до 1,13% сух. в.). Однако, несмотря на это, уровни накопления анализируемых соединений по-прежнему оставались ниже, чем в традиционно используемом лекарственном сырье эхинацеи пурпурной [10–11].

Целью настоящей работы явилось более детальное исследование возможностей повышения содержания ГKK и их производных в клеточных культурах эхинацеи пурпурной на основе варьирования концентрации источников азотного и углеродного питания, а также фитогормонов ауксиновой природы, различающихся по своей биологической активности.

Методы исследования

Объектом исследования служила каллусная культура *Echinacea purpurea*, которая была получена из листовых эксплантов, асептически выращенных молодых проростков данного растения. Используемая культура представляла собой умеренно оводненные каллусы рыхлого типа, имеющие светло-оранжевую окраску, которые культивировали в темноте в термостате при температуре 25°C.

Для выращивания каллусов была использована основная питательная среда по прописи Мурасиге и Скуга (МС) [12] с добавлением фитогормонов. В качестве ауксинов среда МС содержала 2,4-дихлорфеноксиуксуную кислоту (2,4-Д) в концентрации 0,2 мг/л и β-индолилуксуную кислоту (ИУК) в концентрации 2,0 мг/л, а в качестве цитокининов – 0,5 мг/л кинетина. Данная питательная среда служила контролем.

В серии экспериментов, направленных на установление роли различных источников азота в питательной среде, было использовано 6 вариантов сред, для которых осуществлялось варьирование концентрации нитратного и аммонийного азота (таблица 1).

Таблица 1 – Варьирование концентраций аммонийного и нитратного азота в питательной среде МС

Концентрация источника азота, моль/л			
NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻		
	40	20	0
20	1 контроль (среда МС)	2	3
0	4	5	6

Во второй серии экспериментов контролем служила модифицированная среда МС, включающая 20 ммоль/л NO_3^- в качестве единственного источника азота (вариант 5), а также 3% сахарозы. В опытных вариантах питательные среды содержали повышенные концентрации сахарозы – 4 и 5%, соответственно.

С целью установления эффектов различных ауксинов 2,4-Д и 1-нафтилуксусной кислоты (1-НУК) в третьей серии экспериментов культивирование каллусов эхинацеи пурпурной осуществлялось как на стандартной среде МС (вариант 1), так и на модифицированной среде (см. вариант 5).

Индекс роста каллусов рассчитывали на основании данных по сырой массе каллусной ткани в конце цикла выращивания (28–30 сут) и начальной сырой массе [13]. Для определения содержания ГKK в каллусах эхинацеи пурпурной (% сух.в.) использовали спектрофотометрический метод согласно [14].

Статистическую обработку результатов измерений проводили с помощью пакета анализа данных Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение

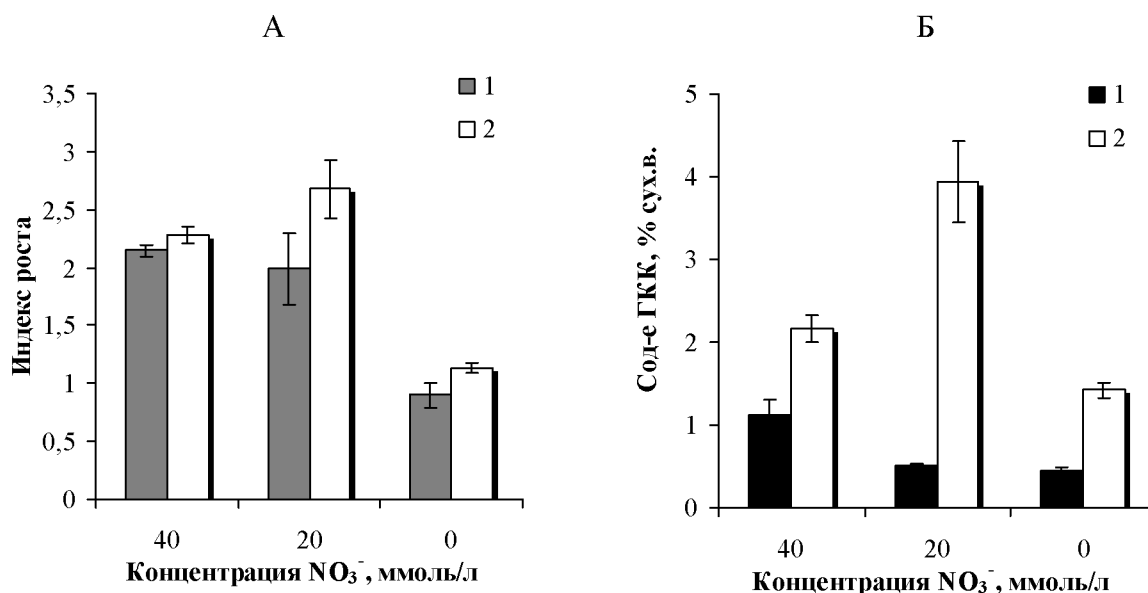
Среди компонентов питательной среды регулирующее воздействие на накопление вторичных метаболитов могут оказывать источники азота, фосфора и калия. Установлено, что уменьшение вдвое уровня азота либо фосфора в питательной среде, а также обоих макроэлементов, приводит к стимуляции накопления ГKK [8].

Как известно, азот в составе большинства сред представлен в виде нитратов либо в виде солей аммония. В качестве дополнительного источника азота могут быть использованы аминокислоты (аланин, глутаминовая кислота, глицин, аргинин, аспарагиновая кислота) или гидролизат казеина – источник аминокислот. Биосинтетическая активность культивируемых *in vitro* растительных клеток и тканей во многом зависит от соотношения неорганических форм азота – NH_4^+ и NO_3^- [15]. Характер влияния отдельных источников азотного питания значительно различается в зависимости от вида растения и синтезируемого соединения. В связи с этим было предпринято исследование влияния разных концентраций аммонийного и нитратного азота в питательной среде на показатели прироста биомассы каллусов эхинацеи пурпурной и содержание в них ГKK. Поскольку в предыдущих исследованиях было установлено, что наиболее выраженные эффекты дефицита азота в питательной среде отмечаются при переходе культуры в стационарную фазу ростового цикла, то в настоящей работе оценку содержания ГKK производили только в конце цикла выращивания.

При варьировании концентрации NO_3^- на фоне 20 ммоль/л ионов NH_4^+ было выявлено, что уменьшение концентрации нитратного азота в питательной среде в 2 раза (от 40 ммоль/л до 20 ммоль/л) не приводило к изменению скорости ростовых процессов. При полном исключении нитратного азота индекс роста каллусов уменьшался более чем в 2 раза относительно контроля (рисунок 1А).

В условиях полного отсутствия аммонийного азота в питательной среде отмечалась аналогичная закономерность: уменьшение концентрации нитрата в 2 раза не вызывало достоверных изменений показателей прироста биомассы каллусов, а при полном его исключении скорость роста замедлялась в 2 раза относительно варианта питательной среды, содержащего 40 ммоль/л NO_3^- . Таким образом, отсутствие аммонийного и нитратного азота в питательной среде по-разному влияло на рост каллусной культуры эхинацеи пурпурной.

Как видно из рисунка 1Б, исключение из питательной среды аммонийного азота сопровождалось резким возрастанием уровней накопления ГKK при всех изученных концентрациях нитрат-ионов. Максимальный стимулирующий эффект отмечался при концентрации NO_3^- равной 20 ммоль/л. Влияние уровня нитратного азота в питательной среде на содержание ГKK в каллусах эхинацеи зависело от концентрации ионов аммония. В частности, в присутствии 20 ммоль/л ионов NH_4^+ отмечалось ингибирование биосинтетического потенциала культуры в среднем в 1,5 раза при уменьшении концентрации нитрата до 20 ммоль/л, а также при полном исключении нитратного азота.



1 – 20 ммоль/л NH_4^+ , 2 – полное исключение NH_4^+

Рисунок 1 – Влияние разных уровней нитратного и аммонийного азота в питательной среде на индекс роста каллусной культуры *Echinacea purpurea* (А) и содержание в ней ГКК и их производных (Б)

В условиях отсутствия аммонийного азота концентрационная зависимость воздействия нитрата отличалась. В этом случае снижение концентрации нитратного азота от 40 до 20 ммоль/л приводило к стимуляции накопления ГКК. На среде, не содержащей неорганических форм азота, содержание ГКК падало относительно варианта, включающего 20 ммоль/л нитратного азота, в 1,9 раза. Таким образом, для каллусной культуры эхинацеи пурпурной эффективным приемом, позволяющим повысить содержание ГКК при сохранении на достаточно хорошем уровне скорости ростовых процессов, является исключение аммонийного азота из состава питательной среды. При этом содержание нитратного азота должно быть снижено по сравнению с его концентрацией в стандартной среде МС в 2 раза – до 20 ммоль/л.

Наряду с минеральным составом питательной среды важнейшую роль в процессах накопления биомассы культивируемыми клетками и синтеза продуктов вторичного метаболизма играет источник углерода, как правило, сахароза. Ранее нами была выявлена зависимость показателей роста и содержания различных биологически активных веществ в каллусах эхинацеи пурпурной от концентрации сахарозы в питательной среде. Было показано, что снижение уровня сахарозы в среде до 1% сопровождалось резким подавлением продукции ГКК, обусловленным ингибированием ростовых процессов и биосинтетического потенциала каллусной культуры [8]. В связи с этим значительный интерес представляло установление эффекта повышенных концентраций сахарозы на содержание ГКК в каллусах эхинацеи в условиях исключения из питательной среды аммонийного азота на фоне снижения вдвое уровня нитрата. Полученные результаты представлены на рисунке 2.

Установлено, что повышение концентрации сахарозы от 3 до 4% не сопровождалось достоверным изменением прироста сырой биомассы каллусов, но приводило к возрастанию содержания ГКК в среднем в 1,4 раза. В результате уровни накопления ГКК в каллусных тканях эхинацеи пурпурной, выращенной на данном варианте питательной среды, достигали $5,46 \pm 0,51\%$ сух. в., что превышает их содержание в тканях интактных растений [10]. Дальнейшее повышение концентрации сахарозы в среде до 5% вызывало замедлением прироста каллусов в 1,5 раза и уменьшение содержания ГКК, в результате чего полученные результаты мало отличались от варианта питательной среды, включающей 3% сахарозы.

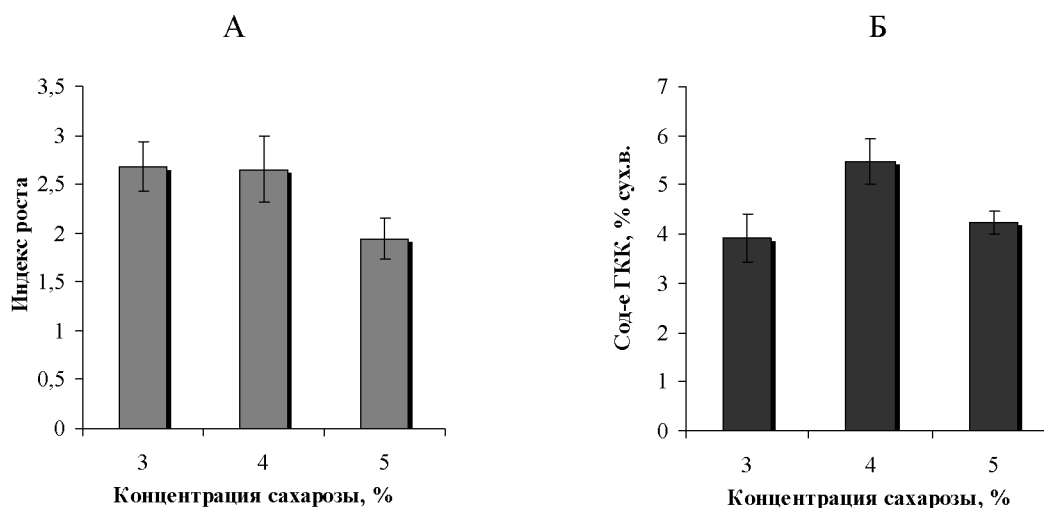


Рисунок 2 – Влияние повышенных концентраций сахарозы в питательной среде на индекс роста каллусной культуры *Echinacea purpurea* (А) и содержание в ней ГСК и их производных (Б) в условиях полного исключения аммонийного азота и в присутствии 20 ммоль/л NO_3^-

Таким образом, сочетание двух подходов, а именно модификация минерального состава питательной среды (исключение аммонийного азота, снижение вдвое уровня нитратного азота) и повышение концентрации источника углерода (сахарозы) до 4%, позволило добиться значительного повышения биосинтетического потенциала каллусной культуры эхинацеи пурпурной по сравнению с культивированием на стандартной питательной среде Мурасиге и Скуга.

Обязательными компонентами любой питательной среды, используемой для культивирования клеток и тканей высших растений в условиях *in vitro*, являются фитогормоны – ауксины и цитокинины. Зачастую они выступают в роли пусковых факторов первичного и вторичного метаболизма, влияя, таким образом, на потенциал продуктивности культур клеток. Изменяя условия (добавляя в состав питательной среды те или иные гормоны), можно вызвать дифференциацию недетерминированных клеток, что, как правило, сопровождается повышением синтеза вторичных метаболитов [15].

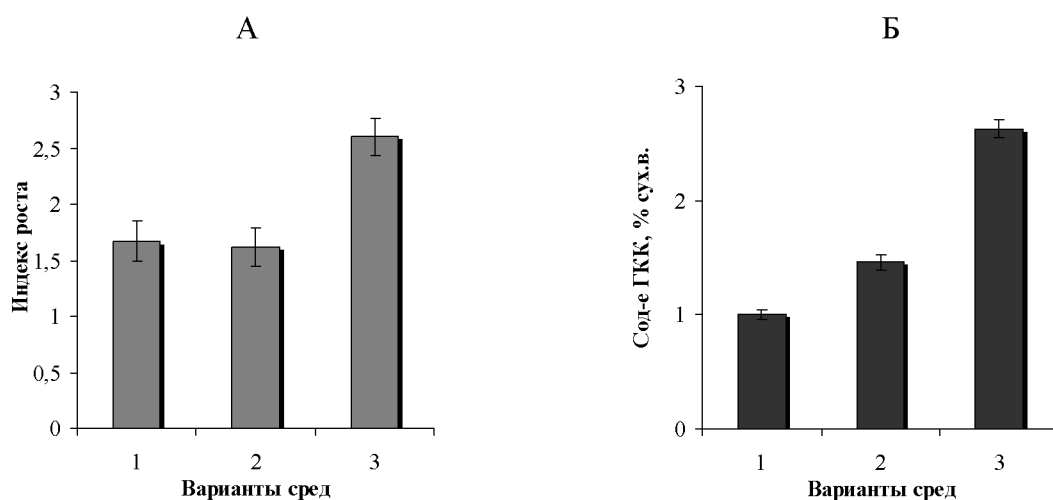
Эффект различных ауксинов на синтез продуктов вторичного метаболизма изучали на культурах многочисленных видов растений. Наиболее широко используемыми ауксинами, которые включают в состав питательных сред, являются 2,4-Д и 1-НУК. Эти два соединения относятся к синтетическим ауксинам, которые практически не подвергаются окислительным превращениям в растительных тканях, и поэтому проявляют гораздо более высокую активность по сравнению с ИУК – главным природным ауксином. К настоящему времени становится все более очевидным, что 2,4-Д и НУК не являются взаимозаменяемыми соединениями. Это проявляется в различиях их действия на физиологические и биохимические процессы, происходящие в культивируемых *in vitro* клетках растений [16].

В связи с этим были проведены исследования влияния 2,4-Д и НУК на ростовые процессы каллусной культуры *Echinacea purpurea* и содержания в ней ГСК. Поскольку по своей ауксиновой активности НУК значительно уступает 2,4-Д, данный фитогормон обычно используют в концентрациях, в 5–10 раз превышающих концентрацию 2,4-Д. По этой причине нами были взяты разные концентрации указанных соединений: 0,2 мг/л 2,4-Д (контроль) и 1,0 мг/л НУК.

На первом этапе в работе использовалась питательная среда МС. Было установлено, что исключение 2,4-Д из состава питательной среды не сопровождалось видимым изменением прироста биомассы каллусов (рисунок 3). Вполне возможно, это связано с тем, что в

результате длительного культивирования (более 70 пассажей) данная культура приобрела относительную ауксин-независимость, по крайней мере, в отношении 2,4-Д. Действительно, образование «привыкших» тканей – достаточно распространенное явление для каллусных культур [17]. Под действием факторов среды в процессе культивирования могут образовываться мутантные клетки – продуценты больших количеств фитогормонов. Если такие клетки получают преимущественное развитие, то в культуре обеспечивается уровень фитогормонов данного класса, необходимый для роста ткани на питательной среде без используемого регулятора роста. В результате могут формироваться или ауксин-независимые или цитокинин-независимые культуры. Такую культуру характеризует морфологическая однородность и выраженная интенсивность клеточного деления.

Из рисунка 3А видно, что замена 2,4-Д на НУК в качестве ауксина вызвала стимуляцию ростовых процессов исследуемой каллусной культуры: значения индекса роста каллусов, культивируемых на среде с НУК, были почти в 1,5 раза выше, чем в присутствии 2,4-Д. Анализ данных по содержанию ГКК свидетельствует, что исключение 2,4-Д из состава питательной среды приводило к заметному росту накопления указанных вторичных метаболитов (см. рисунок 3Б). Однако еще более существенный рост биосинтетического потенциала культуры отмечался в результате замены 2,4-Д на НУК.



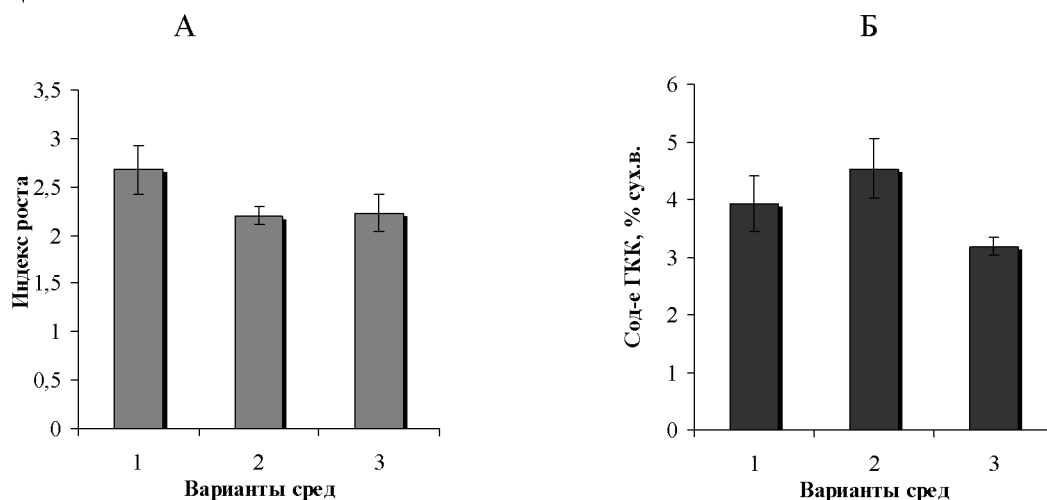
1 – 0,2 мг/л 2,4-Д; 2 – полное исключение 2,4-Д; 3 – замена 2,4-Д на 1,0 мг/л НУК

Рисунок 3 – Влияние 2,4-Д и НУК на индекс роста каллусной культуры *Echinacea purpurea* (А) и содержание в ней ГКК и их производных (Б) при культивировании на полной питательной среде МС

Полученные результаты свидетельствуют, что регуляторы роста играют важную роль в определении потенциальной продуктивности каждой отдельной культуры. Снижая концентрацию ауксинов (в случае каллусной культуры эхинацеи – 2,4-Д) или добавляя менее активные ростовые вещества (например, НУК), можно индуцировать рост через дифференцировку или морфогенез, которые оказывают положительное влияние на синтез вторичных метаболитов в культуре клеток и тканей растений. Таким образом, правильное применение гормональных эффекторов позволяет значительно увеличить образование ценных метаболитов в клеточных культурах в условиях *in vitro*.

Учитывая полученные результаты о положительном влиянии НУК на уровни накопления ГКК в каллусах эхинацеи, а также установленные закономерности воздействия аммонийного и нитратного азота на заключительном этапе работы было предпринято изучение влияния разных концентраций данного синтетического ауксина в модифицированной питательной среде МС на показатели прироста биомассы и содержание в них ГКК.

Установлено, что замена 2,4-Д на НУК в концентрации 1,0 мг/л в отличие от стандартной среды МС приводила к небольшому замедлению ростовых процессов исследуемой культуры, выращиваемой на модифицированной питательной среде (рисунок 4, вариант 5). Практически одинаковый по величине эффект отмечался и при использовании более высокой концентрации НУК – 2,0 мг/л. В присутствии 1,0 мг/л НУК в питательной среде отмечалась тенденция к повышению содержания ГКК в каллусах эхинацеи пурпурной, однако статистически достоверных изменений анализируемого показателя относительно контроля не было обнаружено. Дальнейшее повышение концентрации НУК до 2,0 мг/л сопровождалось ингибированием биосинтетической активности клеток в отношении ГКК и их производных, что свидетельствует о неблагоприятном влиянии НУК в столь высокой концентрации.



1 – 0,2 мг/л 2,4-Д; 2 – 1,0 мг/л НУК; 3 – 2,0 мг/л НУК

Рисунок 4 – Влияние 2,4-Д и НУК на индекс роста каллусной культуры *Echinacea purpurea* (А) и содержание в ней ГКК и их производных (Б) в условиях полного исключения аммонийного азота и в присутствии 20 ммоль/л NO_3^-

Таким образом, степень воздействия НУК зависит от обеспеченности культуры эхинацеи пурпурной источниками азотного питания. В частности, в условиях снижения концентрации нитрата и полного исключения аммония из состава питательной среды стимулирующий эффект НУК на продукцию ГКК заметно снижается.

Выводы

На основании полученных результатов можно сформулировать следующие основные подходы, направленные на создание продукционной питательной среды для клеточной культуры эхинацеи пурпурной в качестве источника ГКК и их производных:

- исключение источников аммонийного азота;
- снижение вдвое концентрации нитратного азота;
- использование повышенной концентрации сахарозы (4%);
- замена 2,4-Д на НУК в концентрации, не превышающей 1,0 мг/л.

Развиваемые приемы позволяют значительно повысить биосинтетический потенциал культуры, которая по своим продукционным характеристикам не уступает традиционно используемому природному лекарственному сырью эхинацеи пурпурной.

Список литературы

1. Фитохимический состав представителей рода Эхинацея (*Echinacea Moench.*) и его фармакологические свойства / В.Н. Самородов [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 1996. – № 4. – С. 32–37.

2. *Echinacea* biotechnology: Challenges and opportunities / B.H. Abbasi [et al.] // In Vitro Cell. Dev. Boil. – Plant. – 2007. – Vol. 43. – P. 481–492.
3. Малеванная, Н.Н. Циркон – препарат нового поколения / Н.Н. Малеванная, К.Л. Алексеева // Защита и карантин растений. – 2006. – № 8. – С. 28.
4. Носов, А.М. Культура клеток высших растений – уникальная система, модель, инструмент / А.М. Носов // Физиология растений. – 1999. – Т. 46, №5. – С. 926–935.
5. Носов, А.М. Культура клеток высших растений: от теории к практике / А.М. Носов // Биология в школе. – 2004. – № 5. – С. 4–8.
6. Биотехнология растений: культура клеток / Г.П. Болвелл, К.Р. Вуд, Р.А. Гонзалес; под. ред. Р.Г. Бутенко. – М.: Агропромиздат, 1989. – 280с.
7. Валиханова, Г.Ж. Биотехнология растений / Г.Ж. Валиханова. – Алма-Ата: Конжык, 1996. – 272 с.
8. Экзогенная регуляция вторичного метаболизма в культуре клеток и тканей растений / В.М. Юрин [и др.] // Труды Белорусского государственного университета. Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. – 2008. – Т. 3, ч. 2. – С. 118–126.
9. Культура растительных клеток и тканей: технология получения, разнообразие фармакологически активных метаболитов и приемы регуляции их синтеза / В.М. Юрин [и др.] // Труды Белорусского государственного университета. Серия «Инновационные биотехнологии в XXI». – 2009. – Т. 4, ч. 2. – С. 168–182.
10. Урожай сырья эхинаеи пурпурной и содержание в нем биологически активных веществ в зависимости от некорневых подкормок азотом, марганцем и цинком / Е.Ю. Бабаева [и др.] // Известия ТСХА. – 1999. – Вып. 3. – С. 72–81.
11. Гетко, Н.В. Культура эхинаеи пурпурной *Echinacea purpurea* (L.) Moench в условиях Беларуси / Н.В. Гетко, И.Н. Бобко // Международный аграрный журнал. – 1998. – № 1. – С. 33–36.
12. Murashige, T.A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T.A. Murashige, F. Skoog // Physiol. Plant. – 1968. – Vol. 15, № 13. – P. 473–497.
13. Загребельный, С.Н. Биотехнология. Часть 1. Культивирование продуцентов и очистка продуктов. / С.Н. Загребельный. – Новосибирск: Изд. НГУ, 2000. – 108 с.
14. Количественное определение суммы гидроксикоричных кислот в надземной части *Echinacea purpurea* / В.А. Куркин [и др.] // Растительные ресурсы. – 1998. – Т. 34, вып. 2. – С. 81–85.
15. Endreb, R. Plant Cell Biotechnology. / R. Endreb. – Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1994. – 353 p.
16. Противоположное влияние синтетических ауксинов – 2,4-дихлорфеноксисукусной и 1-нафтилуксусной кислот на рост культуры клеток женьшеня настоящего и синтез гинзенозидов / И.Н. Смоленская [и др.] // Физиология растений. – 2007. – Т. 54. – С. 243–252.
17. Бутенко, Р.Г. Биология клеток высших растений in vitro и биотехнологии на их основе: учеб. пособие. / Р.Г. Бутенко. – М.: ФБК–ПРЕСС, 1999. – 160 с.

THE DEVELOPMENT OF PRODUCTIONAL MEDIUM FOR *ECHINACEA PURPUREA* CALLUS TISSUE AS A SOURCE OF HYDROXYCINNAMIC ACIDS

T.I. Ditchenko, V.M. Yurin

Belarusian State University, Minsk, Belarus

The approaches to the creation of productional nutrient medium for *Echinacea purpurea* cell culture as a source of hydroxycinnamic acids and their derivatives are considered in article. It is shown that the techniques developed can significantly improve the biosynthetic potential of culture. The production characteristics of *Echinacea purpurea* callus culture is not inferior to traditionally used natural medical material.