

**ВЛИЯНИЕ ТИПА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА СОДЕРЖАНИЕ  
ФЕНИЛПРОПАНОИДОВ И ФЛАВОНОИДОВ В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК,  
ТКАНЕЙ И ОРГАНОВ *ECHINACEA PURPUREA* L. MOENCH****Т.И. Дитченко, В.А. Комарова, В.С. Гудель***Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь, ditchenko@bsu.by*

Культивируемые *in vitro* клетки, ткани и органы растений широко используются в качестве модельных объектов в физиолого-биохимических, молекулярно-генетических исследованиях, а также являются важнейшим инструментом в биотехнологии растений [1]. С середины 80-х гг. прошлого века суспензионные культуры клеток лекарственных растений применяются для наработки вторичных метаболитов, используемых в фармацевтической, пищевой промышленности, а также при производстве косметических средств [2-3]. Однако применение культур клеток высших растений в биотехнологических производствах зачастую ограничено их недостаточной продуктивностью по целевым метаболитам и высокой стоимостью выращивания [4-5]. В связи с этим в 90-х гг. наряду с суспензионными культурами для производства биологически активных соединений растительного происхождения стали использоваться культуры генетически трансформированных корней (hairу roots), которые получают при помощи *Agrobacterium rhizogenes* [6]. В природе данные бактерии, попадая в поврежденные части растений, взаимодействуют с клетками и интегрируют в ядерный геном Т-ДНК своей мегаплазмиды, известной под названием Ri-плазмиды (goot-inducing). В отличие недифференцированных клеток суспензионных культур генетически трансформированные корни полностью сохраняют в условиях *in vitro* способность к синтезу корнеспецифичных для данного растения соединений, для них характерна высокая скорость и неограниченность роста на питательных средах без фитогормонов, активное формирование боковых корней из-за отсутствия апикального доминирования и потери геотропной ориентации [7]. В связи с этим hairу roots активно исследуются в качестве продуцентов ценных вторичных метаболитов, имеющих промышленное значение.

Перспективными объектами биотехнологии лекарственных растений являются культуры клеток и органов эхинацеи пурпурной (*Echinacea purpurea* (L.) Moench) [8-9]. Биомасса суспензионных культур и культур адвентивных корней эхинацеи выступает в качестве источника фенилпропаноидов (гидроксикоричные кислоты и их производные), полисахаридов. Экстрактивные вещества из недифференцированных клеток представителей рода *Echinacea* используются при производстве косметических средств либо в качестве биологически активных добавок (в частности, субстанции Echinan 4P, Echinaceae Stems GX и Echigena plus) [11]. Для культивирования клеточных суспензий и культур генетически трансформированных корней *Echinacea purpurea* в подавляющем большинстве работ используют питательную среду по прописи Мурасиге и Скуга (МС), которая является наиболее широко применяемой питательной средой для выращивания растительных объектов *in vitro*. Вместе с тем представляет интерес исследование возможности использования других питательных сред, в частности, среды Гамборга и Эвелега (В5) для культивирования клеток, тканей и органов данного лекарственного растения в качестве продуцентов вторичных метаболитов фенольной природы.

Целью настоящей работы явилось установление характера влияния типа питательной среды на содержание фенилпропаноидов и флавоноидов в культурах клеток, тканей и органов эхинацеи пурпурной (*Echinacea purpurea* L. Moench).

Объектами исследования служили каллусная и суспензионная культуры корневого происхождения, каллусная и суспензионная культуры листового происхождения, культура генетически трансформированных корней. Исследуемые каллусные ткани представляли собой культуры рыхлого типа. Суспензионная культура корневого происхождения, в которой преобладали многоклеточные агрегаты, включающие десятки клеток, относилась к высокоагрегированному типу. Суспензионная культура листового происхождения, напротив, являлась слабоагрегированной. Культуру генетически трансформированных корней получали путем агробактериальной трансформации листовых эксплантов, изолированных из асептически выращенных проростков эхинацеи пурпурной, с помощью диких штаммов *Agrobacterium rhizogenes* 15834 и А4. Для культивирования растительных объектов в работе использовали питательные среды МС и В5 с добавлением 3% сахарозы в качестве ауксинов питательные среды содержали 2,4-дихлорфеноксисукусную кислоту в концентрации 0,2 мг/л и β-индолил-3-уксусную кислоту в концентрации 1 мг/л, в качестве цито-

кинина – кинетин в концентрации 0,5 мг/л. Культуры генетически трансформированных корней инкубировали на безгормональных средах МС и В5. Продолжительность ростового цикла суспензионных культур составляла 15 сут, каллусных культур и культуры генетически трансформированных корней – 30 суток. В конце ростового цикла производили отбор биомассы культивируемых *in vitro* клеток, тканей и органов *Echinacea purpurea*, для которой проводили определение активности ключевого фермента фенилпропаноидного метаболизма L-фенилаланинаммоний-лиазы. Остаток биомассы высушивали в сушильном шкафу при 60°C для последующего биохимического анализа. Содержание фенилпропаноидов в пересчете на цикориевую кислоту, флавоноидов в пересчете на кверцетин производили с помощью спектрофотометрического метода.

Установлено, что среди изученных объектов наиболее эффективными продуцентами фенилпропаноидов являются культуры генетически трансформированных корней. Использование питательной среды В5 для культивирования всех исследуемых объектов приводило к достоверному росту содержания фенилпропаноидов. Стимуляция продукции гидроксикоричных кислот и их производных в результате замены среды МС на среду В5 в наибольшей степени (в 1,5 раза) проявлялась для каллусной культуры корневого происхождения, которая имела самые низкие уровни их содержания при культивировании в стандартных условиях на среде МС. В случае культуры генетически трансформированных корней, которая изначально характеризовалась наиболее высоким биосинтетическим потенциалом, величина стимулирующего эффекта была минимальной (1,3 раза). Для суспензионной культуры корневого происхождения, каллусной и суспензионной культур листового происхождения прирост составлял в среднем 1,4 раза.

В отличие от фенилпропаноидов наиболее высокое содержание флавоноидов было характерно для суспензионной культуры листового происхождения, культивируемой на питательной среде В5. В каллусной культуре корневого происхождения уровни накопления данной группы вторичных метаболитов не зависели от типа питательной среды. В случае суспензионной культуры корневого и листового происхождения инкубация клеток на питательной среде В5 сопровождалась ростом их содержания в 1,5 и 1,6 раза, соответственно. Для культуры генетически трансформированных корней прирост составил 1,4 раза. В наибольшей степени (в 1,75 раза) стимулирующий эффект наблюдался для каллусной культуры листового происхождения.

Активность L-фенилаланинаммоний-лиазы в исследуемых объектах несущественно различалась при их культивировании на питательной среде МС. Использование среды В5 приводило к росту активности данного фермента в клетках каллусной и суспензионной культур корневого происхождения в среднем в 1,3-1,4 раза, а в клетках суспензионной культуры листового происхождения в 1,3 раза, тогда для культуры генетически трансформированных корней и каллусов листового происхождения достоверные отличия по сравнению со средой МС отсутствовали. На основании полученных данных не выявлена положительная корреляция между уровнями активности L-фенилаланинаммоний-лиазы и содержанием анализируемых вторичных метаболитов. Однако можно предположить, что для культур корневого происхождения, а также клеточной суспензии листового происхождения рост продукции фенилпропаноидов связан с повышением активности данного фермента.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что питательная среда В5 представляет собой хорошую альтернативу для культивирования *in vitro* культур клеток, тканей и генетически трансформированных корней *Echinacea purpurea* в качестве биотехнологических источников вторичных метаболитов фенольной природы. Стимулирующий эффект, вероятно, обусловлен гораздо более низким содержанием в ее составе аммонийного и нитратного азота, дефицит которых, как известно, приводит к усилению биосинтеза вторичных метаболитов разных классов в культурах клеток, тканей и органов лекарственных растений [11-12]. Установленные закономерности могут быть использованы при разработке продукционной питательной среды для культивирования клеток, тканей и органов *Echinacea purpurea* (L.) Moench в качестве продуцентов вторичных метаболитов фенольной природы.

#### Список использованных источников

1. Носов, А.М. Культура клеток высших растений – уникальная система, модель, инструмент / А.М. Носов // Физиология растений. – 1999. – Т. 46, №6. – С.837–844.
2. Yue W. Medicinal plant cell suspension cultures: pharmaceutical applications and high-yielding strategies for the desired secondary metabolites / Yue W. [et al.]. // Critical Reviews in Biotechnology. – 2014. – Vol. 36, № 2. – P. 215–232.

3. Production of Plant Secondary Metabolites: Examples, Tips and Suggestions for Biotechnologists / G. Guerriero [et al.] // *Genes*. – 2018. – Vol. 9, № 309. – P. 1–22.

4. Носов, А.М. Использование клеточных технологий для промышленного получения биологически активных веществ растительного происхождения / А.М. Носов // *Биотехнология*. – 2010. – №5. – С. 8–28.

5. Karuppusamy, S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures / S. Karuppusamy // *Journal of Medicinal Plants Research*. – 2009. – Vol. 3, № 13. – P. 1222–1239.

6. Srivastava S. Hairy root culture for mass-production of high-value secondary metabolites. / S. Srivastava, A.K. Srivastava // *Crit. Rev. Biotechnol.* – 2007. – Vol. 27. – P. 29–43.

7. «Косматые» корни растений – важный инструмент для исследований и мощная фитохимбиофабрика для производителей / Б.Р. Кулуев [и др.] // *Биомика*. – 2015. – Т. 7, № 2. – С. 70–120.

8. Echinacea biotechnology: challenges and opportunities. In *Vitro Cellular & Developmental Biology* / B. Abbasi [et al.] // *Plant*. – 2007 – Vol. 43, № 6. – P. 481–492.

9. Echinacea biotechnology: advances, commercialization and future considerations / J.L. Parsons [et al.] // *Pharm Biol*. – 2018. – Vol. 56, №1. – P. 485–494.

Plant cell culture technology in the cosmetics and food industries: current state and future trends / R. Eibl [et al.] // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2018. – Vol. 102, № 20. – P. 8661–8675.

10. Isah T. Secondary metabolism of pharmaceuticals in the plant in vitro cultures: strategies, approaches, and limitations to achieving higher yield / T. Isah [et al.]. // *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. – 2018. – Vol. 132. – P. 235–369.

11. Villarreal M.O. Plant cell culture strategies for the production of natural products / M.O. Villarreal [et al.] // *BMB Reports*. – 2016. – Vol. 49, № 3. – P. 149–158.