

ОЦЕНКА СТЕПЕНИ АУКСИН- И ЦИТОКИНИН-НЕЗАВИСИМОСТИ КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ *ALTHAEA OFFICINALIS* L. ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Т.И. Дитченко, Я.Н. Архипенко

Белорусский государственный университет, Минск, ditchenko@bsu.by

Одним из направлений современной фитобиотехнологии является применение культур тканей и клеток высших растений в качестве источников вторичных метаболитов, имеющих фармацевтическое значение, используемых в пищевой промышленности, а также при производстве косметических средств [1-3]. Возрастающий интерес к биотехнологии лекарственных растений обусловлен, с одной стороны, нарастающим спросом медицины в уникальных по структуре и активности природных соединениях, с другой стороны, ограниченностью естественных ресурсов растений-продуцентов, многие из которых являются редкими и исчезающими видами, а также сокращением площадей произрастания интродуцированных видов. К преимуществам культур клеток лекарственных растений относят экологически чистую технологию производства биомассы, гарантированное ее получение независимо от сезона и погодных условий, возможность создания клеточных линий-сверхпродуцентов, экономию площадей и др. [4-5].

Алтей лекарственный оказывает противовоспалительное, обволакивающее, противокашлевое действие, что обусловлено достаточно высоким содержанием в водных извлечениях из корней слизи, в состав которой входит арабиноза, глюкоза, галактоза. Листья и соцветия алтея лекарственного, интродуцированного в условиях Беларуси, являются основными накопителями хлорогеновой кислоты, биофлавоноидов и дубильных веществ, в связи с чем весьма перспективны в качестве источников природного сырья для получения лекарственных препаратов Р-витаминного действия [6]. Показано, что культуры клеток и тканей *Althaea officinalis* L. сохраняют способность интактных растений к синтезу вторичных метаболитов фенольной природы [7]. Следует отметить, что запасы сырья алтея лекарственного в естественных условиях ограничены и недостаточны для широкой промышленной заготовки. В связи с этим значительный практический интерес представляет использование культуры клеток алтея лекарственного в качестве источника биологически активных веществ, обладающих противовоспалительным, антиоксидантным действием. При длительном культивировании растительных клеток в условиях *in vitro* может возникать специфическое свойство гормон-независимости, т.е. автономности по отношению к ауксинам и цитокинам. Культуры, которые приобрели свойство автономности от присутствия в среде гормонов, называют «привыкшими». Гормон-независимость составляющих их клеток, как правило, связана с изменением активности генов, ответственных за синтез ферментов, участвующих в синтезе гормонов. С практической точки зрения «привыкшая» культура представляет значительный интерес, поскольку рост на безгормональных средах позволяет снизить затраты на производство биомассы, а данный тип культур можно рассматривать в качестве перспективного сырья для получения ценных вторичных метаболитов.

Целью настоящей работы явилось установление различий в степени ауксин- и цитокинин-независимости каллусных тканей *Althaea officinalis* L.

Объектом исследования служила длительно культивируемая (более 300 пассажей) каллусная культура алтея лекарственного. Для ее поддержания использовалась питательная среда по прописи

Мурасиге и Скуга, включающая 3% сахарозы, 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д) в концентрации 0,2 мг/л, β-индолил-3-уксусную кислоту (ИУК) в концентрации 1 мг/л, кинетин в концентрации 0,5 мг/л. Опытные варианты питательных сред отличались по наличию регуляторов роста ауксиновой и цитокининовой природы: среда без цитокининов (вариант 1), среда без ауксинов (вариант 2), безгормональная среда (вариант 3). Величина pH питательных сред составляла 5,7-5,8. Для сравнительной оценки физиолого-биохимических характеристик каллусов, культивируемых на разных вариантах питательных сред, измеряли индекс роста, степень оводненности культур, дегидрогеназную активность клеток, содержание фенолокси кислот и антирадикальную активность получаемых экстрактов. Статистическую обработку данных производили с помощью пакета анализа данных программы Microsoft Excel. Проверку статистической значимости эффектов культивирования на ауксин- и цитокинин-дефицитных питательных средах относительно контроля производили с помощью однофакторного дисперсионного анализа One-Way ANOVA.

Установлено, что исследуемая каллусная культура *Althaea officinalis* проявляла выраженную зависимость от присутствия экзогенного цитокинина в питательной среде. Исключение 0,5 мг/л кинетина из состава среды культивирования в течение двух пассажей приводило к 4-х кратному ингибированию прироста биомассы, более чем 3-х кратному возрастанию дегидрогеназной активности клеток и 1,5-кратному повышению уровней накопления фенолокси кислот, что свидетельствует о развитии стрессовой реакции. В условиях исключения ауксинов (0,2 мг/л 2,4-Д и 1,0 мг/л ИУК) из состава питательной среды для каллусной культуры *Althaea officinalis* отмечалось полное сохранение ростовой активности в первом пассаже, отсутствие достоверных изменений в содержании сухого вещества, а также активности дегидрогеназ по сравнению с контролем, что указывает на проявление ауксин-независимости полученной клеточной линии. Полученная клеточная линия была использована на следующем этапе для проведения исследований, направленных на установление динамики изменения анализируемых показателей при более длительном культивировании (10 пассажей) в условиях дефицита регуляторов роста в питательной среде.

В контрольном варианте отмечались достаточно высокие показатели прироста биомассы исследуемой каллусной культуры в течение 10 пассажей. Индекс роста составлял в среднем $(7,2 \pm 0,5)$, т.е. в течение ростового цикла наблюдался более чем 7-ми кратный прирост сырой биомассы. Каллусная ткань, инкубируемая в течение 5 пассажей в условиях отсутствия ауксинов в питательной среде, практически не отличалась по внешней морфологии от контрольного варианта, тогда как на безгормональной среде происходило изменение окраски культуры. Каллусы приобретали серую либо желтовато-серую окраску. В случае дефицита ауксина в питательной среде показатели индекса роста для пятого пассажа составили в среднем $(4,7 \pm 0,3)$, а к десятому пассажу снижались до значения $(1,2 \pm 0,1)$. Аналогичная закономерность отмечалась и в результате использования безгормональной питательной среды. Для пятого пассажа индекс роста был равен $(3,0 \pm 0,4)$, а к десятому снижался до $(1,1 \pm 0,2)$. Следует отметить, что прирост биомассы происходил крайне неравномерно. Наряду с каллусами, которые увеличивались по биомассе, присутствовали транспланты, для которых рост не наблюдался. При пассировании культуры использовались только те транспланты, которые сохраняли ростовую активность, остальные выбраковывались. Таким образом, на протяжении, как минимум, пяти пассажей каллусная культура алтея лекарственного сохраняла ростовую активность на среде без ауксинов, тогда как на безгормональной питательной среде прирост биомассы был нестабильным и проявлялся не для всех трансплантов. К десятому пассажу для обоих опытных вариантов ростовые процессы практически полностью ингибировались, что, вероятно, свидетельствует о полном истощении пула эндогенных ауксинов. Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что сохранение ростовой активности каллусной культуры алтея лекарственного на питательной среде без ауксинов не связано с генетическими изменениями, а является результатом физиологической адаптации. Причем адаптационный потенциал практически полностью нивелируется к десятому пассажу.

Одной из особенностей «привыкших» тканей является витрификация либо супероводненность. В связи с этим на следующем этапе проводилась оценка изменения степени оводненности исследуемой каллусной культуры. Согласно полученным данным в опытных вариантах отмечалось существенное возрастание процента сухого вещества по сравнению с контролем. В частности, на среде без ауксинов значение анализируемого показателя составило в среднем $(5,0 \pm 0,1)\%$, а на безгормональной питательной среде – $(4,7 \pm 0,2)\%$, что было, соответственно, в 1,8 и 1,7 раза выше относительно контрольного варианта. Таким образом, можно констатировать, что длительное культивирование каллусов алтея лекарственного на среде без ауксинов и безгормональной питательной среде приводит к изменению их консистенции. Культура становится менее оводненной и

более плотной, что вероятно, связано с торможением роста клеток растяжением, уменьшением их размеров.

Для оценки жизнеспособности и метаболической активности клеток каллусов алтея лекарственного использовался тетразолиевый тест. Установлено, что в опытных вариантах не обнаружено существенных отличий в степени восстановления 1,3,5-трифенилтетразолий хлорида по сравнению с контролем. Следовательно, на средах с дефицитом регуляторов роста клетки сохраняли не только жизнеспособность в течение 10 пассажей, но и дегидрогеназную активность на достаточно высоком уровне.

Следующим этапом работы было определение содержания фенолоксилов. Согласно полученным данным в течение 7-8 пассажей на среде без ауксинов отмечался рост уровней накопления анализируемых вторичных метаболитов. Величина стимулирующего эффекта составляла в среднем 1,3 раза. При увеличении продолжительности культивирования до 9-10 пассажей дефицит регуляторов роста в питательной среде приводил к снижению содержания фенолоксилов в каллусах алтея лекарственного в среднем в 1,5-1,6 раза ниже по сравнению с контролем. Поскольку фенолоксилолы могут отвечать за проявление антирадикальной активности экстрактов из лекарственных растений, в т.ч. полученных из культур клеток и тканей, то на заключительном этапе работы была проведена оценка ингибирования радикалов 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразида экстрактами из каллусных культур алтея лекарственного, выращенных в условиях дефицита регуляторов роста в питательной среде. Статистически достоверное возрастание антирадикальной активности отмечалось в седьмом и восьмом пассажах для экстрактов, полученных из каллусов, культивируемых на среде без ауксинов. Данные, зарегистрированные для каллусов, инкубируемых на безгормональной питательной среде, не отличались от контрольного варианта. К девятому пассажиру отмечалось снижение антирадикальной активности экстрактов из каллусов, выращенных на среде без ауксинов по сравнению с восьмым пассажем, однако полученные значения были выше относительно контроля. Данная тенденция сохранялась и для десятого пассажа. В случае каллусов, культивируемых на безгормональной среде, происходило незначительно снижение анализируемого показателя по сравнению с контролем.

Таким образом, длительное культивирование каллусов алтея лекарственного в условиях дефицита регуляторов роста в питательной среде позволяет заключить, что при увеличении продолжительности культивирования свойство ауксин-независимости постепенно ослабевает. В частности, уже к девятому и десятому пассажам отмечается более чем 5-ти кратное ингибирование прироста биомассы. Клетки при этом сохраняют жизнеспособность и дегидрогеназную активность. Культура приобретает более плотную консистенцию и характеризуется возрастанием процентного содержания сухого вещества. Биосинтетический потенциал в отношении вторичных метаболитов фенольной природы также снижается, что приводит к уменьшению антирадикальной активности получаемых экстрактов. Частичное сохранение признака ауксин-независимости обеспечивается на протяжении, как минимум, пяти пассажей. Данное свойство, вероятнее всего, является результатом физиологической адаптации и обеспечивается за счет достаточно высокого уровня эндогенных ауксинов, контролирующих пролиферацию клеток. Можно предположить, что количество клеток, эффективно продуцирующих ауксины, в анализируемой популяции гораздо меньше, чем в типичных гормон-независимых каллусных тканях, которые полностью автономны и не нуждаются в присутствии экзогенных ауксинов в инкубационной среде.

Установленные закономерности могут быть использованы для оптимизации гормонального состава сред культивирования культур клеток алтея лекарственного с целью стимуляции продукции биологически активных соединений фенольной природы, а также разработки приемов депонирования штаммов-продуцентов.

Список использованных источников

1. Yue W. Medicinal plant cell suspension cultures: pharmaceutical applications and high-yielding strategies for the desired secondary metabolites. / W. Yue [et al.]. // *Critical Reviews in Biotechnology*. – 2014. – Vol. 36, № 2. – P. 215–232.
2. Kreis W. Exploiting plant cell culture for natural product formation / W. Kreis // *Journal of Applied Botany and Food Quality*. – 2019. – Vol. 92. – P. 216–225.
3. 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.

4. Перспективные биотехнологии: коллекции культур клеток высших растений как основа разработки и производства лекарственных препаратов / Е.В. Попова [и др.] // Физиология растений. – 2021. – Т. 68, № 3. – С. 277–244.

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

6. Особенности сезонного накопления фенольных соединений в растениях алтея лекарственного (*Althaea officinalis* L.) при интродукции в Беларуси / Ж.А. Рупасова [и др.] // Весці Нацыянальнай Акадэміі навук Беларусі. – 1999. № 3. – С. 10-14.

7. Характеристика суспензионной культуры как объекта для промышленного производства фармакологически активных веществ / В.М. Юрин [и др.] // Труды Белорусского государственного университета. Серия «Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем». – 2016. – Т. 11. – С. 9–31.