

ОСОБЕННОСТИ БИОТЕХНОЛОГИИ РАСТИТЕЛЬНЫХ ТКАНЕЙ, ОРГАНОВ И КЛЕТОК *IN VITRO* ПРИ ПОЛУЧЕНИИ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИ ЦЕННЫХ МЕТАБОЛИТОВ

Савушкин Андрей Иванович¹, Сидорова Наталья Анатольевна², Прокопюк София Михайловна²

¹ Филиал ФГБУ "Госсорткомиссия" по Республике Карелия и Мурманской области, Петрозаводск, Россия

² ФГБОУ ВПО «Петрозаводский государственный университет», Петрозаводск, Россия

Сидорова Н.А.

185910 Россия, Республика Карелия, Петрозаводск, пр. Ленина, 33

E-mail: vanlis@petsu.ru

Аннотация. В статье рассмотрены вопросы перспективных исследований в области биотехнологии растений как раздела прикладных наук, аккумулировавшего в себе новейшие достижения биологических наук и технологий; обобщены результаты исследований по разнообразию биоинженерных подходов к созданию продуцентов биологически активных веществ. В контексте биотехнологии с использованием растительных организмов апробированы методы введения в культуру каллусных тканей *Maclura pomifera* (Raf.) *Schneid.* В серии экспериментов представлены примеры модификации состава питательных сред для получения первичного каллуса. Установлена зависимость между концентрацией фитогормонов в среде и особенностью формирования каллуса у эксплантов. Максимальный размер экспланта 10.3 мм получен с использованием среды с добавлением ауксинов 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) и 3-индолилуксусной кислоты (ИУК) в диапазоне концентраций 0.5-1 мг/л и 1-5 мг/л, соответственно. Сделано предположение, что вариабельность тканей соплодий *Maclura pomifera* (Raf.) *Schneid* по способности к калусообразованию может быть связана с изменениями направленности метаболических процессов у растения.

Ключевые слова: биотехнология, культура растительных тканей, каллус, фитогормоны, метаболические процессы, биологически активные вещества

ASPECTS OF BIOTECHNOLOGY OF PLANT TISSUES, ORGANS AND CELLS *IN VITRO* FOR PRODUCING FARMACOLOGICALLY VALUABLE METABOLITES

Andrey I. Savushkin¹, Natalia A. Sidorova², Sofia M. Prokopyuk²

¹ The Karelian Republic Branch of «Gossortkomissiya», Petrozavodsk, Russia

² Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Russia

N.A. Sidorova

33 Lenin str., Petrozavodsk, Russia 185910

E-mail: vanlis@petsu.ru

Abstract. The article considers matters relating to the advanced research in plant biotechnology as the field of applied sciences accumulated the latest achievements of biological sciences and technologies; the results of studies on the diversity of bioengineering approaches for creation of producers of biologically active substances are summarized. In the context of plant biotechnology, specific methods for introducing the tissues of *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid into culture were tested. A series of experiments were conducted to provide examples of modifying the composition of culture medium in order to obtain the primary callus. The dependence between the concentration of phytohormones in the medium and the peculiarity of callus formation from explants was established. The maximum size explant reaching 10.3 mm was obtained by using the medium with auxins 2.4-D and IAA in concentration range of 0.5-1 mg/l and 1-5 mg/l, respectively. It is suggested that the variability of *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid stem tissues in their ability to form callus may be associated with changes in directions of metabolic pathways in plants.

Key words: biotechnology, plant tissue culture, callus, phytohormones, metabolic processes, biologically active compounds

Введение

В последнее время в биотехнологии растений наблюдается повышенный интерес к новым источникам ценных биологически активных веществ для получения из них фармакологических препаратов, не обладающих побочными эффектами, и их синтетических аналогов. В связи с этим, разрабатываются и апробируются промышленные технологии культивирования растительных тканей и органов, обладающих повышенным биосинтетическим потенциалом. Так, на основе клеточной культуры воробейника краснокорневого (*Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc.) в Японии налажено биотехнологическое производство шиконина, обладающего антибактериальным, противовоспалительным и противоожоговым (ранозаживляющим) действием. На его основе созданы препараты «Гешиспон», «Дигиспон-А», используемые в качестве раневого коллагенового биодеградируемого покрытия с диоксидином и шиконином, а также «Коллахит Ш» – раневое покрытие на основе коллаген-хитозанового комплекса с шиконином. С помощью суспензионной культуры клеток женьшеня (*Panax ginseng*) в ОАО «Биохиммаш» (Институт прикладной биохимии и машиностроения) разработана технология получения биомассы женьшеня для использования в медицинской и косметической промышленности.

Биоинженерные подходы к созданию продуцентов биологически активных веществ (БАВ) из растительных организмов разрабатываются уже приблизительно с середины прошлого века, и на сегодняшний день они претерпели значительные изменения, благодаря развитию различных направлений биологии: геномики, эпигеномики, интерферомики, протеомики, метаболомики, транскриптомики и др. Огромный объём данных, получаемых методами этих разделов науки, очень важен для системной биологии, изучающей сложные биологические системы. К таким системам можно отнести и суспензионные культуры растительных клеток, и культуры каллусных тканей, а также структуру взаимодействий между отдельными клетками в этих культурах. Для оптимизации процессов накопления вторичных метаболитов в таких сложных многокомпонентных системах разрабатываются технологические подходы, основанные на сумме экспериментальных данных, получаемых с помощью вышеупомянутых научных дисциплин. При этом, часто приходится сталкиваться с множеством трудностей как технологического, так и методологического характера. Так, например, секвенирование *de novo* геномов высших растений является сложной задачей, так как многие растения являются полиплоидами и их геномы содержат значительную долю повторяющихся последовательностей. Также, у высших растений имеются так называемые аллополиплоидные формы, содержащие близкие, но не идентичные геномы, что также усложняет задачу и увеличивает стоимость анализа структуры генома. С другой стороны, данный метод геномики, позволяющий определить весь набор нуклеотидных последовательностей неизвестного генома, предоставляет возможность произвести скрининг генов, вовлечённых в пути биосинтеза продуктов обмена веществ лекарственных растений и, далее, с помощью генноинженерных методов активировать их работу для получения биологически активного вещества необходимого качества и количества.

Основными «поставщиками» лекарственных веществ для фармацевтической промышленности, получаемых биотехнологически из растений различных видов, в настоящее время являются каллусные культуры и суспензионные культуры клеток. При этом технология каллусных культур предполагает выращивание на плотной (агаризованной) питательной среде, в то время как суспензионные культуры требуют культивирования в жидких питательных средах. Получают каллусные ткани с помощью твёрдофазной ферментации или с помощью глубинного культивирования клеточных суспензий. На выход вторичных метаболитов в культуре каллусных тканей и в клеточных культурах влияет очень большое количество факторов как эндогенной (генетические, эпигенетические, физиологические, гормональные), так и экзогенной (физические – температура, интенсивность и спектральный состав света, аэрация; химические – pH среды, химический

состав питательной среды и пр.) природы. Таким образом, изменяя и комбинируя эти факторы, можно добиться увеличения выхода вторичных метаболитов. Другим методом, используемым в биотехнологии растений для получения активных продуцентов БАВ, является выделение и селекция соматоклональных вариантов, возникающих в процессе культивирования исходных клеточных линий вследствие их генетической гетерогенности, индуцируемой условиями культивирования клеток *in vitro*. Причины и механизмы возникновения соматоклональной изменчивости разнообразны, но к основным можно отнести следующие: полиплоидия, анеуплоидия, хромосомные перестройки, точечные мутации, соматический (митотический) кроссинговер и обмен сестринских хроматид, изменчивость цитоплазматических геномов, амплификация и редукция генов, активация ранее репрессированных (молчащих) генов, активация мобильных генетических элементов (Воинов, 2015). Возникающее таким образом генетическое разнообразие в растительных клеточных популяциях после проведения соответствующего цитологического и генетического анализа даёт возможность осуществлять скрининг наиболее активных в отношении биосинтеза вторичных метаболитов соматоклонов. Сочетание этого метода с индуцированным мутагенезом *in vitro* позволяет на следующих этапах культивирования клеток и каллусов производить клеточную селекцию, выделяя и отбирая клеточные популяции с искомыми признаками, например, со стабильным и повышенным, по сравнению с исходной линией, выходом целевого вторичного метаболита для получения из него лекарственного препарата.

Одним из перспективных продуцентов БАВ растительного происхождения считают маклюру оранжевую (*Maclura pomifera* (Raf.) Schneid.). Из соплодий маклюры в официальной медицине многих стран изготавливают лекарства для улучшения сердечной деятельности, антибиотики, составы для лечения поверхностных ран. К основным соединениям маклюры, обладающим биологической активностью, в настоящее время относят два наиболее изученных изофлавонона (изомерные соединения флавоноидов) – осайин и помиферин, способные укреплять стенки капилляров. Также большое значение имеют стероидоподобные вещества, найденные в плодах маклюры – лупеол и ситостерол, обладающие противовоспалительными и простатопротекторными свойствами. Исследование этих и других БАВ маклюры на различных объектах в условиях *in vitro* и *in vivo* показало, что они обладают антимикробным, антиоксидантным, кардиопротекторным, противоопухолевым действием. Выделяемые из плодов этого растения соединения обладают также иммуномодулирующим действием.

В лаборатории доклинических исследований, клеточной патологии и биорегуляции Института высоких биомедицинских технологий ПетрГУ разрабатываются новые подходы к культивированию клеток и тканей растений продуцентов БАВ. В период с 2014-2015 г.г. в рамках Программы стратегического развития ПетрГУ проведена серия экспериментов по апробации методов получения каллусной культуры *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid. – продуцента широкого спектра физиологически активных веществ, таких как флавоноиды, тритерпеноиды, стероиды, аминокислоты и витамины.

Материалы и методы

Для введения опытного растения в каллусную культуру готовили питательную среду Мурасиге-Скуга согласно прописи (Murashige, 1969) с добавлением витаминов десятикратной концентрации и стимуляторов роста (ауксины и цитокинины). Для получения первичного каллуса готовили несколько сред с различным соотношением регуляторов роста. В качестве ауксинов использовали 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д) и 3-индолилуксусную кислоту (ИУК) в диапазоне концентраций 0.5-1 мг/л и 1-5 мг/л, соответственно. Концентрация цитокининов (бензиламинопурина) составляла от 10^{-5} до 10^{-7} моль/л. Источником эксплантов служили зрелые плоды маклюры. Сначала их отмывали водой с детергентом от загрязнений, обрабатывали спиртом, после чего стерилизовали

поверхность плодов раствором гипохлорита кальция в 2–5%-ной концентрации с последующим промыванием стерильной дистиллированной водой. После этого плоды разрезали в условиях ламинар-бокса на несколько частей, из которых в дальнейшем извлекали ткани мезокарпия размером, в среднем, 5 мм. После этого экспланты помещали на подготовленные питательные среды в чашки Петри, которые располагали под лампами дневного света. Развитие каллуса наблюдалось через 1-2.5 недели после введения в культуру. Первичный каллус начинал формироваться с краёв эксплантов в средах с повышенным содержанием ИУК и без определённой локализации – в вариантах с высокой концентрацией 2,4-Д. Экспланты на всех типах питательных сред образовывали каллус серовато-белого цвета рыхлой консистенции.

Результаты

В результате серии экспериментов исследована динамика калусообразования на 7-е, 13-е и 18-е сутки. Максимальный размер каллуса *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid установлен для среды с содержанием ауксина 2,4 -Д в количестве 5.0 мг/л и экспозицией – 18 суток. Так, на 7-е сутки опыта в варианте с 2,4-Д и концентрацией фитогормона 5.0 мг/л размер каллуса составил 6.1 мм, а на 18-е сутки – 10.3 мм (разница в приросте составляет 40.8%). В то же время, для ИУК при максимальной концентрации в данном эксперименте (1.0 мг/л) динамика нарастания каллуса выражена не столь резко – 5.5 мм на 7-е сутки и 7.8 мм на 18-е (разница в приросте составляет 29.5%). Таким образом, выявлена положительная корреляция между концентрацией фитогормона и временем экспозиции экспланта на питательной среде, содержащей этот гормон. Установлено, что динамика роста каллусной ткани зависит от типа фитогормона и его концентрации в среде (Таблица).

Таблица. Развитие каллуса у эксплантов *Maclura pomifera* в зависимости от концентрации фитогормонов в питательной среде

Концентрация фитогормонов	7 суток (мм)	13 суток (мм)	18 суток (мм)
ИУК (0.5 мг/л)	5.6	6.2	7.2
ИУК (1.0 мг/л)	5.5	6.7	7.8
2,4-Д (1.0 мг/л)	5.8	6.8	8.1
2,4-Д (5.0 мг/л)	6.1	7.2	10.3

Заключение

Можно предположить, что вариабельность эксплантов *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid по способности к калусообразованию связана с изменениями направленности метаболических процессов в ходе каллусогенеза. Растения обладают метаболическими путями биосинтеза десятков тысяч вторичных продуктов. Набор вторичных метаболитов растений очень разнообразен. Если количество первичных метаболитов, синтезируемых в ключевых процессах первичного метаболизма (фотосинтез, дыхание, углеводородный, липидный и азотный обмен), достигает нескольких сотен, то, по приблизительным оценкам, количество метаболитов, образующихся в процессах вторичного метаболизма, достигает 200 000 (терпены, поликетиды, фенолы, алкалоиды, цианогенные гликозиды, небелковые аминокислоты) (Fett-Neto, 2010; Gupta, 2015). В отличие от первичных метаболитов, присутствующих во всех растительных клетках, вторичные метаболиты могут быть специфичны для одного или нескольких видов растений (Борисова, 2014). Кроме этого, вещества вторичного метаболизма не имеют собственных путей синтеза и для своего образования используют основные метаболические пути растений. Их биосинтез происходит на ответвлениях метаболических путей белков, углеводов, липидов, где функционирует

широкий спектр ферментов, обуславливающих способность растений синтезировать разнообразные соединения (Борисова, 2014; Воинов, 2015). Одним из биотехнологических подходов к изменению метаболизма растений и, в конечном счёте, к увеличению выхода вторичных метаболитов, являющихся во многих случаях конечным целевым продуктом в цикле производства лекарственных препаратов, является контроль экспрессии генов, вовлечённых в данный процесс, на уровне основных регуляторных факторов транскрипции, которые являются привлекательными объектами для инжиниринга вторичных метаболических путей (Kayser, 2007; Воинов, 2015). Эти подходы, основанные на знаниях, накапливающихся в области метаболомики и транскриптомики, служат основой для разработки инструментов метаболической инженерии, дают возможность проектировать и создавать новые метаболические пути в растительных организмах, получать продукты лекарственного назначения с заданными свойствами, которые невозможно получить традиционными способами. Инжиниринг метаболических путей растений направлен на получение в трансгенной клетке новых биохимических реакций путем введения чужеродных генов или модификацией генов клетки-хозяина (Wu, 2008). Иногда такими продуцентами важных лекарственных соединений являются уникальные тропические и эндемические растения, недоступные для их агротехнического производства в умеренных климатических зонах большинства развитых стран мира. Выделение из таких растений генов, определяющих направленный синтез специфических органических соединений, и их перенос в подобранные соответствующим образом растения превращает их в новые продуценты важных биологически активных веществ.

Библиография

1. Arora R. Medicinal Plant Biotechnology. Wallingford: CAB International; 2010.
2. Fett-Neto AG (Ed.) Plant Secondary Metabolism Engineering: Methods and Applications. *Methods in Molecular Biology* 2010, 643.
3. Gupta VK, Tuohy MG, Lohani M, O'Donovan A (eds.). Biotechnology of Bioactive Compounds: Sources and applications. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd; 2015.
4. Kayser O, Quax WJ (eds.). Medicinal Plant Biotechnology. From Basic Research to Industrial Applications. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2007.
5. Murashige T, Tucker DPH. Growth factor requirements of *Citrus* tissue culture. *Proc First Int Citrus Symp* 1969, 3:1155-1161.
6. Wu S, Chappell J. Metabolic engineering of natural products in plants: tools of the trade and challenges for the future. *Curr Opin Biotechnol* 2008,19:145-152.
7. Борисова Г.Г., Ермошин А.А., Малева М.Г., Чукина Н.В. Основы биохимии вторичного обмена растений: учебно-методическое пособие. Екатеринбург: Изд-во Уральского университета, 2014. 128 с.
8. Воинов Н.А., Волова Т.Г. Органогенез в культуре соматических тканей: соматоклональная изменчивость, гормоннезависимые растительные ткани [<http://medbe.ru/materials/problemu-i-metody-biotekhnologii/organogenez-v-kulture-somaticheskikh-tkaney>].
9. Воинов Н.А., Волова Т.Г. Области применения геной инженерии растений [<http://medbe.ru/materials/problemu-i-metody-biotekhnologii/oblasti-primeneniya-gennoy-inzhenerii-rasteniy>].
10. Булгаков В.П., Федорев С.А., Журавлев Ю.Н. Биотехнология – здоровью человека: научные достижения и первые шаги инноваций на Дальнем Востоке // Вестник ДВО РАН. – 2004. – №3. – С.93-99.
11. Дейнеко Е.В. Генетически модифицированные растения – продуценты рекомбинантных белков медицинского назначения // Вестник Томского государственного университета. Биология. – 2012. – №2(18). – С. 41-51.
12. Рощина В.В., Рощина В.Д. Выделительная функция высших растений [<http://cam.psn.ru/default.asp>].