

А.Ш.Додонова

Карагандинский государственный университет им. Е.А.Букетова

**АКТИВАЦИЯ СИНТЕЗА АРГЛАБИНА  
В СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЕ ПОЛЫНИ ГЛАДКОЙ**

*Мақалада морфогенездің индукциясы, ерекше эмбриоидогенез жолымен, тыңыр жусанның жасушалары суспензиясының мақсатты заттың синтезін көбейтуінің мүмкіншіліктері қарастырылған. Осы мақсатқа жету үшін фитогормондардың құрамы оптимизацияланған және суспензияның өнімділігінің көбеюі дәлелденген. Тыңыр жусанның синтетикалық белсенді суспензиялық өнімділігінің көбеюіне алып келетін өзіндік секторлы құрылымы бар ұқсас эмбриодтық ілеспелі жасушалардың қалыптасуы көрсетілген.*

*Possibility of increase of substance synthesis in suspension culture of Artemisia glabella cells by induction of morphogenesis, in particular embryoidogenesis is considered in this article. The content of phytohormones for this aim is optimized and the increase in efficiency suspension cultures is proved. It is revealed, that cells accompanying formation embryoides are similar on the structure with cells of secretion, that, probably, and results in increase in synthetic activity of suspension culture of Artemisia glabella.*

Применение в качестве сырья для получения биологически активных соединений культуры клеток и тканей приобретает в последнее время особую актуальность. Изыскание путей компенсации дефицита некоторых видов лекарственных растений привело к использованию принципиально нового метода получения отдельных биологически активных соединений растительного происхождения, в котором в качестве сырья используются изолированные ткани и клетки, растущие на искусственных питательных средах. Интерес к этому методу непрерывно растет, так как в настоящее время доказано, что, помимо способности растительных клеток синтезировать биологически активные вещества самого различного типа действия (антивирусного, противоопухолевого, антибиотического), клетки культуры тканей могут быть использованы для биотрансформации ряда соединений как источник для получения протеолитических ферментов [1].

Благодаря методам биотехнологии появляется возможность получать биомассу ценных продуцентов биологически активных веществ независимо от климатических условий и времени года. Наиболее целесообразно использование глубинной технологии выращивания клеток высших растений, так как это позволяет использовать стандартное микробиологическое оборудование. Большой интерес для медицины представляют биологически активные терпеноиды, в частности, сесквитерпеновые лактоны. На базе Института фитохимии разработан и введен в клиническую практику противоопухолевый препарат «Арглабин», основу которого составляет одноименный сесквитерпеновый лактон.

Практическому использованию культуры клеток растений в качестве исходного сырья препятствует одно очень важное обстоятельство. Как показывают проведенные экспериментальные работы, в культурах клеток, как правило, резко снижается способность к синтезу вторичных метаболитов [2]. Это объясняется прежде всего тем, что в таких культурах частично теряется способность к реализации генетической информации, относящейся ко вторичному обмену. Скорее всего, это связано с потерей организменного контроля и переходом к популяционным механизмам регуляции метаболизма клеток. В основе физиологического регулирования процессов вторичного синтеза лежит изучение влияния таких факторов культивирования на рост и метаболизм клеток, как регуляторы роста, минеральные вещества, витамины, сахара, свет, аэрация, температура.

Можно предположить, что чем ближе клетка или группа клеток по уровню организации к целому растению, тем более вероятно, что в них будут реализовываться метаболические пути, характерные для целого организма. Вторичный метаболизм — это особенность дифференцированных растительных клеток и тканей. Он присущ только специализированным органам и только определенным фазам развития растений [3]. Имеющиеся в литературе данные о положительной корреляции между накоплением вторичных метаболитов и степенью дифференцировки в культурах клеток подтверждают этот факт [4]. Исследования китайских ученых показали, что выход артемизинина при культивировании полыни однолетней в биореакторах увеличивается, когда создаются условия для появления регенерантов в клеточной суспензии [5]. Выявлена также взаимосвязь между морфогенезом и образованием эфирных масел в культурах тканей полыни лимонной [6] и гладкой [7].

Учитывая все эти факторы, важно было рассмотреть возможность увеличения синтеза целевого вещества в суспензионной культуре полыни гладкой за счет получения агрегированной морфогенной культуры.

#### *Материал и методы исследования*

Объектом исследования является суспензионная культура полыни гладкой (*Artemisia glabella* Kar. et Kir.) — эндемичного растения Центрального Казахстана.

Пересадку культивируемых объектов осуществляли в ламинарном боксе ЛБ-Г с продувкой стерильным воздухом. Культивирование суспензий клеток проводили в аппарате культивирования УВМТ-12–250, в конических колбах на 250 мл.

Культивационные среды и посуда стерилизовались в автоклаве при 1,2 атмосферы в течение 20 мин. Скорость роста оценивали по значению ростового индекса (РИ), вычисляемого по формуле

$$РИ = \frac{W_1 - W_0}{W_0},$$

где  $W_0$  — начальная масса экспланта,  $W_1$  — масса каллуса в конце цикла культивирования.

В экспериментах по культивированию тканей использовали общие методические приемы, описанные в монографиях Р.Г.Бутенко [8], Ф.Л.Калинина и других [9].

Основными факторами, влияющими на дедифференциацию эксплантов и морфогенетические процессы в культуре клеток, являются ауксины и цитокинины. В качестве ауксинов использовали 3-индолилуксусную кислоту (ИУК), нафтилуксусную кислоту (НУК), 2,4 –дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4 -Д); в качестве цитокининов — 6-бензиламинопурин (БАП) и кинетин.

Культивирование суспензионной культуры клеток проводили в жидкой питательной среде, а растений-регенерантов — на агаризованной среде Мурасиге — Скуга [10].

Содержание арглабина в образцах биомассы суспензионной культуры полыни гладкой определяли методом ВЭЖХ на приборе HEWLETT PACKARD Agilent 1100 Series.

#### *Результаты и обсуждение*

Для получения крупных морфогенных агрегатов в суспензионной культуре мы изучали влияние различных сочетаний цитокининов (БАП, кинетин) и ауксинов (ИУК, НУК, 2,4-Д) в концентрациях 2мг/л, так как более низкие концентрации приводят к подавлению эмбриоидогенеза. Анализировали морфологические характеристики и степень агрегированности ткани в суспензионной культуре.

Среди цитокининов наиболее эмбриогенообразующим является БАП. Кинетин в исследуемых дозах не приводил к морфогенезу и формированию эмбриоидов.

Среди ауксинов наименее морфогенным оказался 2,4-Д. Суспензионная культура на среде с 2,4-Д становилась гомогенной, теряла зеленую окраску, вплоть до полного обесцвечивания, степень агрегированности низкая, агрегаты однородные, рыхлые, мелкие, без органоподобных структур.

Использование нафтилуксусной кислоты в сочетании с кинетином также способствовало потере окраски и низкой степени морфогенеза, формирования эмбриоидов или не наблюдали совсем, или формировались очень мелкие эмбриоиды на поверхности плотных агрегатов, которые не созревали и не переходили в стадию органогенеза. В сочетании с БАП использование НУК способствовало появлению у культуры яркой зеленой окраски, что свидетельствует об увеличении фотосинтетической активности культуры, но, однако, эмбриоиды не были получены.

Таким образом, нами выяснено, что для морфогенеза и эмбриоидогенеза необходимо присутствие в культивационной среде фитогормонов БАП и ИУК. Агрегаты, полученные в среде с таким содержанием фитогормонов, обладали наилучшим морфогенетическим потенциалом, ткань имела яркую зеленую окраску, выраженное эмбриогенное строение. Экстраполируя данные по влиянию фитогормонов на морфогенез и синтез арглабина в каллусной культуре полыни гладкой [11], можно предположить, что данное сочетание фитогормонов приведет к увеличению синтеза целевого вещества по сравнению с клеточной суспензией.

Для подтверждения формирования эмбриоидов в суспензионной культуре полыни гладкой нами было проведено гистологическое исследование процессов, происходящих в толще агрегатов. Для этого участки эмбриогенеза были зафиксированы для гистологического изучения. Было обнаружено формирование меристематических очагов в агрегатах суспензионной культуры полыни гладкой. Это участки активно делящихся, поэтому более мелких клеток, тесно связанных между собой, без межклеточного пространства. В толще меристематических очагов такого рода расположено множество сосудистых элементов (рис. 1). Постепенно происходит формирование эмбриоидов, которые на гло-

булярной стадии могут иногда распадаться на деградирующие и компетентные к эмбриогенезу клетки. Этот процесс, возможно, объясняет механизм длительного поддержания эмбриогенного потенциала и тотипотентности в культуре клеток полыни гладкой. Следующим этапом дифференциации является формирование биполярных зародышей, с хорошо заметными, сформированными зонами апексов корней и стебля.

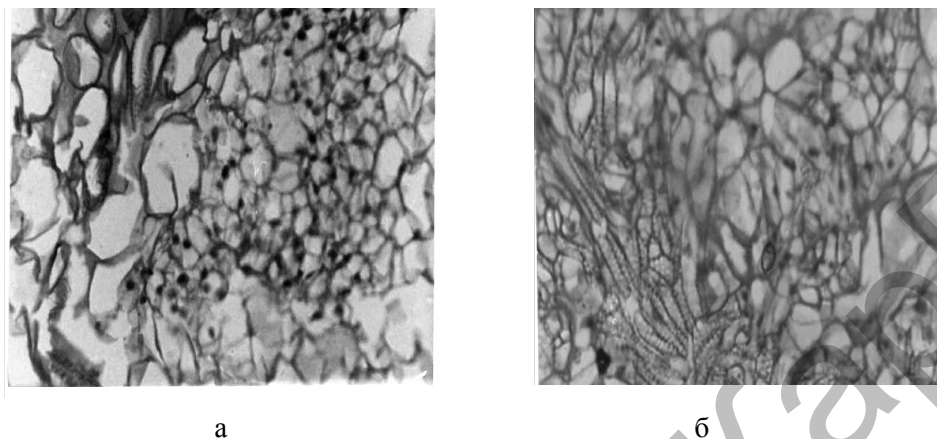


Рис. 1. Гистологическое изучение агрегатов: а — меристематический очаг; б — формирование сосудистых элементов

Процесс формирования соматических эмбриоидов происходит спонтанно и асинхронно. Гистологические исследования показали, что на любой фазе цикла культивирования можно обнаружить эмбриоиды на различных стадиях развития.

Следует отметить, что агрегаты суспензионной полыни гладкой можно условно разделить на два типа — рыхлые и плотные, которые отличаются между собой некоторыми морфологическими характеристиками и способом формирования эмбриоидов. В рыхлых агрегатах формирование глобулярных эмбриоидов происходит во всей толще ткани, тогда как в плотных агрегатах глобулы расположены преимущественно на поверхности. Кроме того, эмбриоиды, формирующиеся из агрегатов различного типа, отличались регенеративной способностью. Приживаемость регенерантов, полученных из рыхлых агрегатов, была ниже, чем у регенерантов из агрегатов плотных.

Исследователями эмбриогенеза в культуре клеток растений [12, 13] отмечено, что деградирующие клетки, образующиеся параллельно с формированием эмбриоидов, характеризуются признаками, которые свойственны большинству секреторных клеток растений. Это увеличение объема клеток, часто извилистая форма, утолщение клеточных стенок и наличие периплазматического пространства (плазмолиз). Возможно, что именно наличие секреторных элементов приводит к увеличению продуктивности вторичных метаболитов в эмбриогенных тканях полыни гладкой по сравнению с культурами, не обладающими морфогенным потенциалом.

Таким образом, с помощью гистологического изучения суспензионной культуры полыни гладкой подтверждено наличие морфогенеза и формирование эмбриоидов при использовании фитогормонов БАП и ИУК в концентрациях 2 мг/л.

Для подтверждения сохранности тотипотентности в суспензионной культуре полыни гладкой были получены растения — регенеранты из эмбриогенных тканей полыни гладкой (рис. 2).

Агрегаты, представляющие собой зрелые эмбриоиды на поздней стадии, из суспензионной культуры высаживали на среду МС без фитогормонов, с половинным содержанием сахарозы (1,5 %). Через 5 суток наблюдали формирование первых листьев, подобных семядольным, без характерных для настоящих листьев рассечений. Через 20 суток сформировавшееся растение высаживали в почвенную смесь. Культивирование растений осуществляли при температуре 20°C и искусственном освещении.

Изучение динамики роста двух типов суспензионных культур показало (рис. 3), что степень ростовой активности агрегированной культуры выше в три раза, чем клеточной (11 и 4,6 соответственно).

При сопоставлении динамики накопления арглабина с кривыми роста суспензионных культур обоих типов видно, что в течение лаг-фазы содержание арглабина в биомассе практически не изменяется. В фазу логарифмического роста, т.е. при интенсивном делении клеток уровень арглабина в культуре клеток полыни гладкой падает до минимальных значений. Увеличение содержания целевого

вещества в биомассе наблюдается на фазе стационарного роста, т.е. при замедлении ростовой активности и снижении уровня делящихся клеток [14].

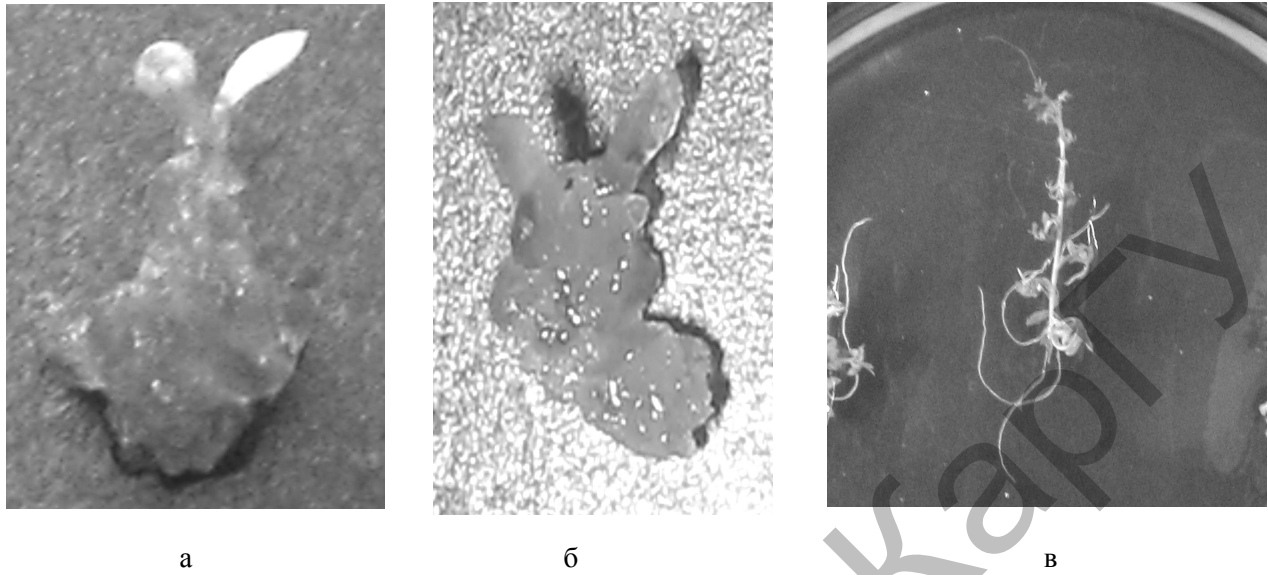


Рис. 2. Регенерация растений полыни гладкой: а — эмбрионный агрегат; б — формирование побега; в — сформировавшееся растение

Сравнение уровня синтеза арглабина у двух типов суспензионных культур показывает несомненное преимущество агрегированной суспензии перед клеточной (рис. 4). Количество арглабина в биомассе, выращенной в агрегированной культуре, в 4 раза больше, чем при клеточном типе суспензии. Этот факт подтверждают литературные данные о том, что для синтеза вторичных метаболитов необходимы дифференцированные ткани.

Таким образом, был выбран перспективный тип культивируемой суспензии, а именно агрегатная суспензионная культура полыни гладкой, в которой сохраняются морфогенетический потенциал и способность к синтезу целевого вещества на уровне, сравнимом с каллусной тканью.

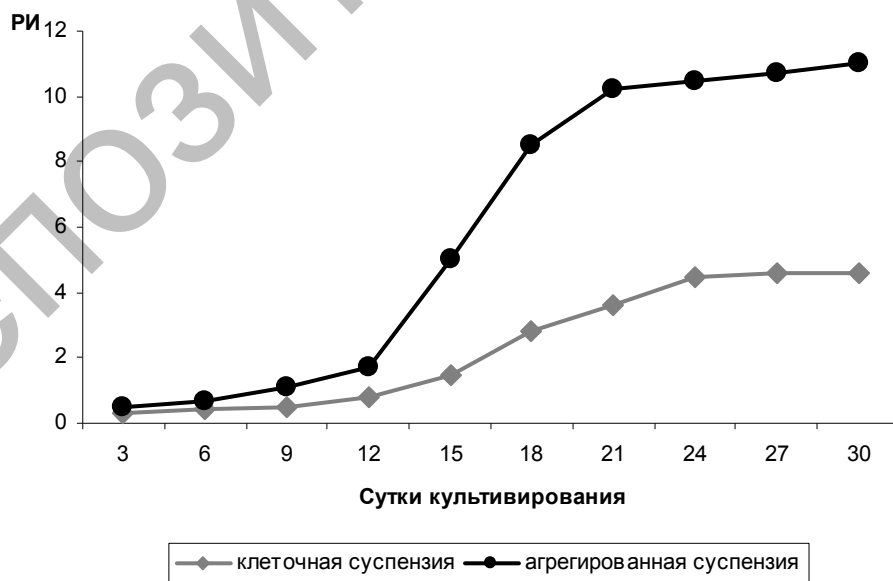


Рис. 3. Сравнение динамики ростовой активности клеточной и агрегированной суспензионной культуры полыни гладкой

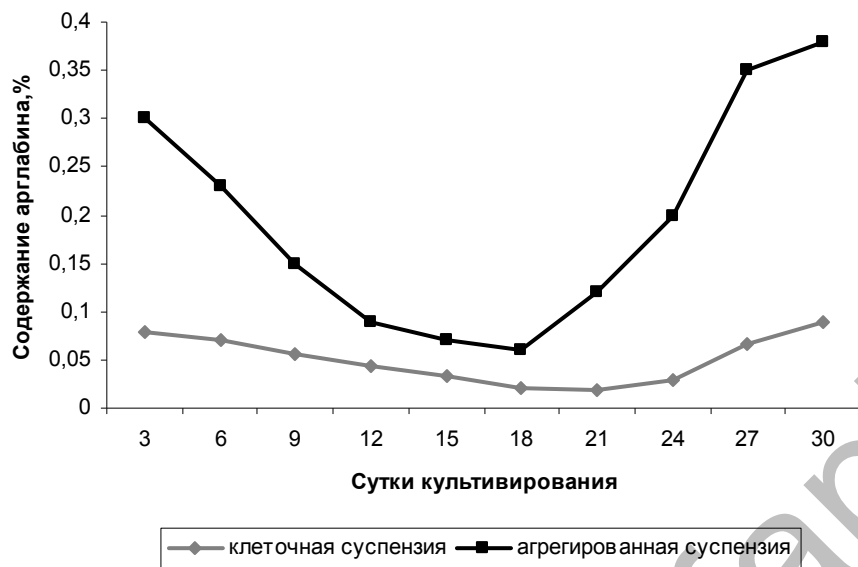


Рис. 4. Сравнение накопления арглабина в суспензионных культурах клеточного и агрегированного типа

### Выводы

1. Оптимизирован состав фитогормонов для эмбриогенеза: ИУК — 2мг/л, БАП — 2мг/л. Гистологическими исследованиями доказано формирование эмбриоидов в агрегатах суспензионной культуры.

2. Исследована взаимосвязь между дифференциацией и уровнем синтеза арглабина. Количество арглабина в биомассе полыни гладкой увеличилось в 4 раза по сравнению с недифференцированной культурой и достигло 0,38 % от сухого веса.

### Список литературы

1. Чиков П.С. Растения — один из важнейших источников лекарственных средств // Химико-фармацевтический журнал. — 1986. — № 1. — С. 97–104.
2. Пасешиченко В.А. Растения — продуценты биологически активных веществ // Соросовский образовательный журнал. — Т. 7. — № 8. — 2001. — С. 171–182.
3. Лукнер М. Вторичный метаболизм у микроорганизмов, растений и животных. — М.: Мир, 1979.
4. Загоскина Н.В. Метаболизм фенольных соединений в связи с дифференциацией растительной клетки в условиях *in vitro* // Физиология растений — наука III тысячелетия: Тез. докл. междунар. конф. — М., 1999. — С. 581–582.
5. Liu C.Z., Wang Y.C., Guo C., Ouyang F., Ye H.C., Li G.F. Production artemisinin by shoot cultures of *Artemisia annua* L. In a modified inner-loop mist bio reactor // Plant Sci. — 1998. — № 2. — P. 211–217.
6. Барвина Т.В., Воробьев А.С., Константинова Т.Н., Сергеева Л.И., Зальцман О.О. Морфогенез и образование эфирных масел у полыни лимонной // Молекул. генет. микробиол. и вирусол. — 1994. — № 4. — С. 18.
7. Аманов С.В., Андреева А.Р. Phytohormones ratio for *Artemisia glabella* *in vitro* cultivation. // В сб. «Medicinal raw material and phytopreparations for medicine and agriculture». — Karaganda, 1999. — P. 190.
8. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. — М.: Наука, 1964. — 250 с.
9. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Метод культуры изолированных тканей в физиологии и биохимии растений. — Киев: Наука, 1980. — 488 с.
10. Murashige I., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiology Plant. — 1962. — № 15. — P. 473–497.
11. Аманов С.В. Изучение роста, морфогенеза культуры клеток полыни гладкой и синтеза в ней биологически активного сесквитерпеноида арглабина: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.23. — Кольцово, ГНЦ ВБ «Вектор», 2001. — 28 с.
12. Денебаева М.Г. Цитофизиологические особенности длительно культивируемых эмбриогенных каллусных тканей ячменя: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.12. — Алматы: Ин-т физиологии, генетики и биоинженерии растений, 2003. — 30 с.
13. Амирова А.К. Соматический эмбриогенез и регенерация растений в длительно культивируемых каллусных тканях пшеницы: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.12. — Алматы: Ин-т физиологии, генетики и биоинженерии растений, 2004. — 30 с.
14. Додонова А.Ш., Аманов С.В., Адеенов С.М. Суспензионная культура полыни гладкой — источник сесквитерпенового лактона арглабина // Биотехнология: состояние и перспективы развития: Третий междунар. конгресс — М., 2005. — С. 80.