

РОСТОВАЯ И БИОСИНТЕТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ *AGASTACHE RUGOSA* O. KUNTZE

Т.В. МАЗУР

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, г. Минск, Республика Беларусь

Введение

В настоящее время для получения биологически активных веществ растительного происхождения успешно используют культуру клеток и тканей *in vitro* [1, 7, 10]. При культивировании клеток *in vitro* возможно создание условий, позволяющих выделить отдельные новые штаммы клеток с устойчивой направленностью метаболизма на синтез веществ вторичного происхождения. Особое внимание уделяется исследованиям, в которых изучается взаимосвязь синтеза вторичных метаболитов с ростом культуры и концентрацией фитогормонов в среде культивирования. Одними из наиболее распространенных в растении веществ вторичного происхождения являются фенольные соединения, широко применяемые в современной фармакотерапии [2].

Известно, что для получения биологически активных веществ используют суспензионные культуры [5, 6, 7].

Agastache rugosa O. Kuntze содержит ряд биологически активных веществ, обладающих атерогенным эффектом, а также имеющих антивирусную, капилляроукрепляющую, противовоспалительную и спазмолитическую активность [2, 8]. Однако среди доступной научной литературы отсутствовали какие-либо публикации, посвященные исследованию этой культуры в условиях *in vitro*.

Поэтому целью настоящей работы было получение суспензионной культуры *A. rugosa* и выявление взаимосвязи между биосинтетической и ростовой активностью суспензионной культуры данного вида.

Объекты и методы исследования

Многоколосник морщинистый *Agastache rugosa* относится к роду многоколосников *Agastache* Clauy. Ex Cronow семейства яснотковых *Lamiaceae*. Зеленая масса *A. rugosa* содержит такие биологически активные вещества, как тилианин, акацетин, апигенин, розмариновая и хлорогеновая кислоты.

Для получения каллусной культуры использовали листовые и стеблевые экспланты *A. rugosa* в культуре *in vitro*. Каллусную ткань инициировали и выращивали на среде Мурасиге-Скуга с добавлением различных концентраций ауксинов – 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д), индолилуксусной кислоты (ИУК) и цитокининов – бензиламинопурина (БАП), кинетин.

Суспензионную культуру *A. rugosa* получали из рыхлого каллуса, перенося его в жидкую среду МС, с различным содержанием гормонов. При разработке метода получения суспензионной культуры из стеблевого и листового каллуса *A. rugosa* установлено, что добавление 0,5 мг/л 2,4-Д в сочетании с 0,1 мг/л БАП в среду культивирования, является оптимальным для активной пролиферации клеток.

Культивировали суспензионную культуру в круглодонных колбах при 23-24⁰С на роторной качалке (100-110 об/мин). Пассирование культуры на свежую питательную среду проводили с интервалом 16-25 дней.

В течение цикла выращивания клеток определяли следующие параметры: сырую и сухую массу, плотность, жизнеспособность клеток, общее содержание фенольных соединений.

Для определения массы суспензии клетки отделяли от питательной среды с помощью вакуумного насоса и взвешивали до и после высушивания, которое проводили в сушильном шкафу при температуре 60⁰С. Количество клеток в суспензионной культуре измеряли каждые вторые сутки, в течение всего пассажа, в камере Фукса-Розенталя. Для этого клетки предварительно мацерировали 20%-м раствором хромовой кислоты при 60⁰С в течение 15 мин.

Жизнеспособность клеток определяли после окрашивания 0,1%-м раствором нейтральным красным. Живыми считались клетки, цитоплазма которых прокрашивалась в течение 20 мин.

Общее содержание фенольных соединений определяли в свободных клетках, а также в среде их инкубирования методом Фолина-Чокальтеу [3]. Для построения калибровочного графика была использована галловая кислота. Измерения проводили на спектрофотометре Agilent 8453 при длине волны 765 нм в кювете толщиной 1 см.

Результаты и обсуждение

Необходимым условием дедифференцировки растительной клетки и превращения ее в каллусную является присутствие в питательной среде представителей двух групп фитогормонов: ауксинов и цитокининов. Инициация каллусообразования зависит от соотношения эндогенных гормонов эксплантов и экзогенных гормонов питательной среды [4, 10]. Интенсивный каллусогенез листовых и стеблевых эксплантов *A. rugosa* наблюдали на питательной среде, содержащей 2 мг/л ИУК и 0,3 мг/л кинетина, а также на среде с добавлением 1 мг/л 2,4-Д в сочетании с БАП в концентрации 0,1 мг/л (табл. 1). На среде, содержащей 2 мг/л 2,4-Д и 0,1 мг/л БАП, отмечена активная инициация каллусогенеза листовых эксплантов. Однако для стеблевых эксплантов характерна более интенсивная инициация каллусогенеза по сравнению с листовыми. Первичный каллус эксплантов был плотной консистенции. Для наращивания большей массы каллусной ткани и получения рыхлого каллуса его несколько раз пассировали на среду МС с добавлением 1 мг/л 2,4-Д и 0,1 мг/л БАП.

Суспензионные культуры имеют S-образную форму роста клеток, включающую лаг-фазу, экспоненциальную, стационарную и фазу деградации. Форма ростовых кривых разных культур отличается продолжительностью фаз. Это зависит от генетики популяции, количества инокулюма и состава питательной среды. Скорость нарастания биомассы клеток для разных суспензионных культур колеблется от 15 до 70 суток [1].

Оптимальные условия культивирования клеток *A. rugosa* определяли по жизнеспособности клеток на всех этапах роста культуры. Наибольшая жизнеспособность клеток приходилась на экспоненциальную фазу роста и достигала 80%.

При рассмотрении динамики нарастания стеблевой и листовой суспензионной культуры *A. rugosa* (рис. 1, 2) отмечено неодновременное их вступление в экспоненциальную фазу роста (на 4 и 6 сутки, соответственно). На 8 сутки культивирования листовая суспензионная культура вступала в экспоненциальную фазу роста, а на 15 сутки – в стационарную. На 20 сутки начиналась фаза деградации клеток (рис. 2).

Таблица 1

Каллусогенная активность листовых и стеблевых эксплантов многоколосника морщинистого на разных питательных средах

Среда	Гормональный состав среды культивирования, мг/л				Интенсивность каллусогенеза	
	ИУК	Кинетин	БАП	2,4-Д	лист	стебель
I	1	0,2	-	-	+	+
II	2	0,2	-	-	+	+
III	3	0,2	-	-	-	+
IV	1	0,3	-	-	+	++
V	2	0,3	-	-	++	+++
VI	3	0,3	-	-	+	++
VII	1	0,5	-	-	+	+
VIII	2	0,5	-	-	+	++
IX	3	0,5	-	-	+	+
X	-	-	0,1	0,5	+	++
XI	-	-	0,1	1	++	+++
XII	-	-	0,1	2	+++	+

Примечание: + - интенсивность каллусогенной активности эксплантов.

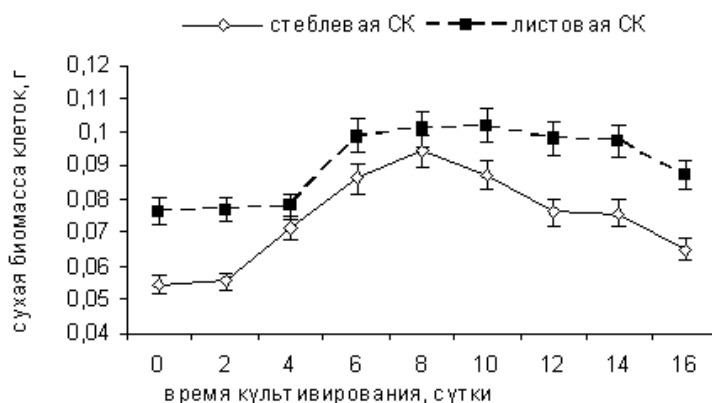


Рис. 1. Динамика роста листовой и стеблевой суспензионной культуры *A. rugosa* по сухой биомассе

Стационарная фаза роста клеток для стеблевой суспензионной культуры началась на 14 сутки. Установлено, что ростовой цикл полученных листовой и стеблевой культур составляет 16 и 25 суток. Таким образом, латентная фаза длилась трое и шестеро суток. В экспоненциальной фазе роста, которая длилась 12 суток (лист) и 8 суток (стебель), клетки активно делятся. Характер роста кривой листовой и стеблевой суспензионной культуры отличается длительностью фаз роста. Согласно результатам исследований, представленным на рис. 2, внутриклеточное содержание фенольных соединений через 4 суток после начала инкубации возросло незначительно – от 0,99 мг до 1,36 мг/г (в 1,3 раза) для стеблевой суспензионной культуры. Затем, в течение 8 суток (период интенсивного роста культуры), концентрация фенольных соединений в клетках менялась от 1,36 до 3,4 мг/г. На 16 сутки инкубирования суспензии наблюдали интенсивное увеличение внутриклеточного содержания фенольных соединений – до 4,8 мг/г. Для листовой суспензионной культуры количество фенольных соединений в конце культивирования составляло 3,6

мг/г сухой массы. Одновременно изучали зависимость оптической плотности среды инкубации от времени инкубирования клеток суспензионной культуры. Характер кривой аналогичен зависимости внутриклеточного содержания фенольных соединений от времени роста культуры. Таким образом, одновременно с синтезом фенольных соединений в клетках происходит их экскреция в среду инкубации.

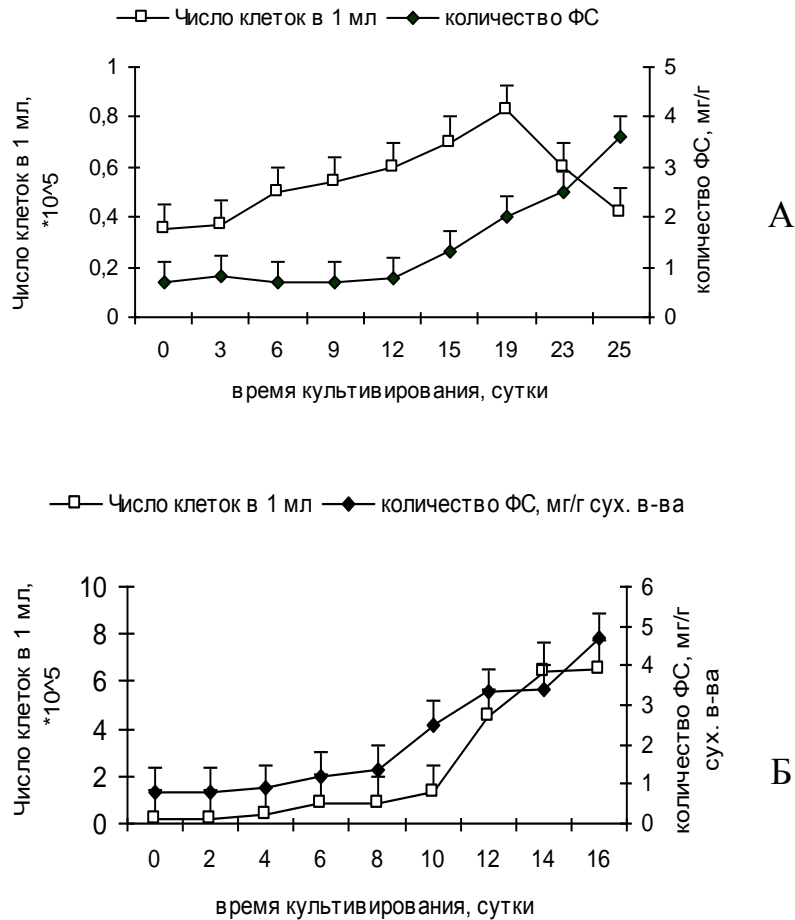


Рис. 2. Зависимость содержания фенольных соединений от плотности суспензионной листовой (А) и стеблевой (Б) суспензионной культуры

Показано, что наиболее интенсивный синтез фенольных соединений в клетках суспензионной культуры *A. rugosa* происходит на тех этапах роста культуры, когда кривая роста клеток соответствует стационарной фазе роста и фазе деградации клеток. Протекание активных ростовых процессов в суспензионной культуре не коррелирует с синтезом фенольных соединений, который активизируется с экспоненциальной фазы роста и продолжается в стационарной и фазе деградации клеток.

Выводы

Разработан метод индукции активной пролиферирующей каллусной культуры, что позволило подобрать оптимальные условия получения и культивирования суспензионной культуры *A. rugosa*. Выявлены условия синтеза и экскреции фенольных соединений клетками суспензионной культуры при сохранении высокой жизнеспособности клеток данной культуры. Показано, что наиболее активный синтез фенольных соединений происходит во время замедления ростовых процессов в стационарной фазе роста суспензионной культуры.

Список литературы

1. Демидова Е.В., Решетняк О.В., Орешников А.В., Носов А.М. Ростовые и биосинтетические характеристики культивируемых клеток женьшеня ползучего при глубинном выращивании в биореакторах // Физиология растений. – 2006. – Т. 53, №1. – С. 148-154.
2. Запрометов М.Н. Фенольные соединения: Распространение, метаболизм и функции в растениях. – М.: Наука, 1993.
3. Методы биохимического исследования растений / Под ред. А.И. Ермакова. – Л., 1987. – С.117-119.
4. Сидоров В.А. Биотехнология растений. Клеточная селекция. – Киев: Наукова думка, 1990.
5. Benzothiadiazole enhances the elicitation of rosmarinic acid in a suspension culture of *Agastache rugosa* O. Kuntze / Kim H.K., Oh S-R., Lee Y-K., Huh H. // Biotechnology Letters. – 2001. – Vol. 23. – P. 55-60.
6. Induction of rosmarinic acid in cell suspension cultures of *Orthosiphon aristatus* after treatment with yeast extract / Sumaryono W., Proksh P., Hartmann T., Nimitzs M., Wray V. // Phytochemistry. – 1991. – Vol. 30. – P. 3267-3271.
7. Mizukami H., Tabira Y., Ellis B.E. Induction of rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures // Plant cell Rep. – 1993. – Vol. 12. – P.706-709.
8. Vogelmann J. E. Flavonoids of *Agastache* section *Agastache*. Biochemical Systematic and Ecology. – 1984. – Vol. 12, №4. – P. 363-366.
9. Berl W. J. Secondary products from plant cell cultures // Biotechnology. – 1986. – Vol. 4. – P. 630-658.
10. Fehér A. // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2003. – Vol.74. – P. 201-228.

Рекомендовано к печати д.б.н. Митрофановой И.В.