

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ “БОРОДАТЫХ” КОРНЕЙ
ЦЕННОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТЕНИЯ *ASTRAGALUS PENDULIFLORUS* (FABACEAE)
В ГАЗОВИХРЕВОМ БИОРЕАКТОРЕ “VORTEXLAB-10”

Е.В. Амброс, Т.А. Кукушкина, Т.И. Новикова

Центральный сибирский ботанический сад СО РАН,
630090, Новосибирск, ул. Золотодолинская, 101, e-mail: ambros_ev@mail.ru

Впервые апробировано культивирование “бородатых” корней *Astragalus penduliflorus* Lam. в газовихревом биореакторе “VortexLab-10” в жидкой питательной среде Гамборга–Эвелег. Показано, что в условиях биореактора культуры сохранили способность к синтезу биологически активных веществ (БАВ), специфичных для данного вида при сохранении ростовой активности ($I = 13.2$). Кроме того, количество отдельных БАВ в культуре “бородатых” корней в условиях биореактора превосходило их содержание в корнях, выращиваемых в шейкерной культуре. Содержание дубильных веществ увеличивалось в 2.9 раза, каротиноидов – в 5.9 раза.

Ключевые слова: *Fabaceae*, *Astragalus penduliflorus*, “бородатые” корни, биореактор “VortexLab-10”, питательная среда Гамборга–Эвелег, дубильные вещества, тритерпеновые сапонины, каротиноиды.

CULTIVATION OF HAIRY ROOTS
OF VALUABLE MEDICINAL PLANT *ASTRAGALUS PENDULIFLORUS* (FABACEAE)
IN GAS-VORTEX BIOREACTOR “VORTEXLAB-10”

E.V. Ambros, T.A. Kukushkina, T.I. Novikova

Central Siberian Botanical Garden, SB RAS,
630090, Novosibirsk, Zolotodolinskaya str., 101, e-mail: ambros_ev@mail.ru

The cultivation of *Astragalus penduliflorus* Lam. hairy roots in the gas-vortex bioreactor “VortexLab-10” in liquid Gamborg–Eveleg medium was tested for the first time. It was shown that under the conditions of the bioreactor, cultures retained the ability to synthesize biologically active compounds (BAC) specific for this species with maintaining the growth activity ($I = 13.2$). In addition, the using of gas-vortex bioreactor allowed to increase the content of individual BAC in hairy roots in comparison with shaker culture. The content of tannins increased 2.9 times, carotenoids – 5.9 times.

Key words: *Fabaceae*, *Astragalus penduliflorus*, hairy roots, bioreactor “VortexLab-10”, Gamborg–Eveleg’s medium, tannins, triterpenoid saponins, carotenoids.

ВВЕДЕНИЕ

Культивирование растительных клеток и тканей на искусственных питательных средах в биореакторах помимо решения ряда экономических, экологических и технологических задач позволяет использовать их как “фабрики” для производства биологически активных веществ (БАВ). Технологии *in vitro* имеют ряд преимуществ перед традиционным сбором сырья лекарственных растений, которые состоят в возможности круглогодичного получения ценных метаболитов в контролируемых условиях, обеспечивающих стандартизацию процесса. Поскольку в большинстве случаев биосинтез вторичных метаболитов в каллусных и суспензионных культурах протекает не так активно как в исходных растениях, наиболее перспективной системой *in vitro* является культура “бородатых” корней.

Эти корни, полученные в результате целенаправленного встраивания T-ДНК Ri плазмиды штаммов *Agrobacterium rhizogenes* в геном растительной клетки, характеризуются быстрым ростом на безгормональных питательных средах, их морфологической особенностью является утрата геотропической ориентации корней и проявление у них плагиотропного роста. Культуры “бородатых” корней способны продуцировать как ценные метаболиты, типичные исходному растению (Parr, Hamill, 1987; Zárate, 1999), так и новые вещества, являющиеся их предшественниками или производными (Fukui et al., 1998). Причем уровень биосинтеза этих веществ сопоставим, а в некоторых случаях и превышает уровень их биосинтеза в интактных растениях (Sevón, Oksman-Caldentey, 2002).

Корни лекарственного растения астрагала по-вислоцветкового (*Astragalus penduliflorus*) наряду с корнями *A. propinquus* Schischkin, *A. membranaceus* (Fischer) Bunge, *A. mongholicus* Bunge. широко используются в традиционной китайской, тибетской, монгольской, корейской медицине, а также в отечественной народной медицине в качестве иммуностимулирующих, тонизирующих, диуретических, антидиабетических, анальгезирующих, отхаркивающих и седативных лекарственных средств (Sinclair, 1998; Хобракова, Николаев, 2009; Смирнова, 2013). Их лекарственное действие обусловлено присутствием таких соединений, как

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использована культура “бородатых” корней *A. penduliflorus* – линия № 6, полученная при трансформации гипокотилей проростков. Генетическую трансформацию осуществляли с использованием дикого штамма *Agrobacterium rhizogenes* 15834 Swiss по методике, описанной М.Ю. Вдовитченко с соавторами (Vdovitchenko et al., 2007). Штамм был любезно предоставлен И.Н. Кузовкиной (Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Россия). Корневые культуры выращивали при температуре 23 ± 2 °С в темноте при постоянном качании (90 об./мин) на орбитальных шейкерах Elmi S-3.02 L (Латвия). Пересев культур повторяли каждые 30 дней в 250 мл колбы Эрленмейера, содержащие по 100 мл жидкой питательной среды Гамборга и Эвелегга (B_5) (Gamborg, Eveleigh, 1968).

При масштабировании процесса культивирование осуществляли в газовихревом биореакторе “VortexLab-10” (Россия, ООО “Центр вихревых технологий”). Культуры выращивали в течение 30 дней в темноте при скорости потока 1 л/мин. Температуру поддерживали автоматически в пределах 25 °С. Объем жидкой среды B_5 в биореакторе составил 5 л. Перемешивание среды осуществляли путем создания в ней трехмерного движения типа “вращающегося вихревого кольца” при 500–600 об./мин. Исходная сырая масса корней для шейкерной культуры и биореактора составила 4 г/л.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнение ростовых параметров “бородатых” корней в шейкерной культуре и биореакторе. Сырая масса корней *A. penduliflorus* в биореакторе увеличилась в 14.2 раза. Однако по сравнению с шейкерной культурой ($I = 22.4 \pm 0.35$) корни в биореакторе характеризовались снижением уровня накопления биомассы ($I = 13.2 \pm 0.52$). При выращивании в колбах масса корней была в 1.6 раза больше, чем при культивировании в биореакторе (см. рисунок).

изофлавоноиды, полисахариды, гамма-аминомасляная кислота и различные микроэлементы (Wagner et al., 1997). Получение биомассы “бородатых” корней *A. penduliflorus* в условиях *in vitro* позволит не только масштабировать, но, и, возможно, увеличить содержание целевых БАВ по сравнению с интактными растениями.

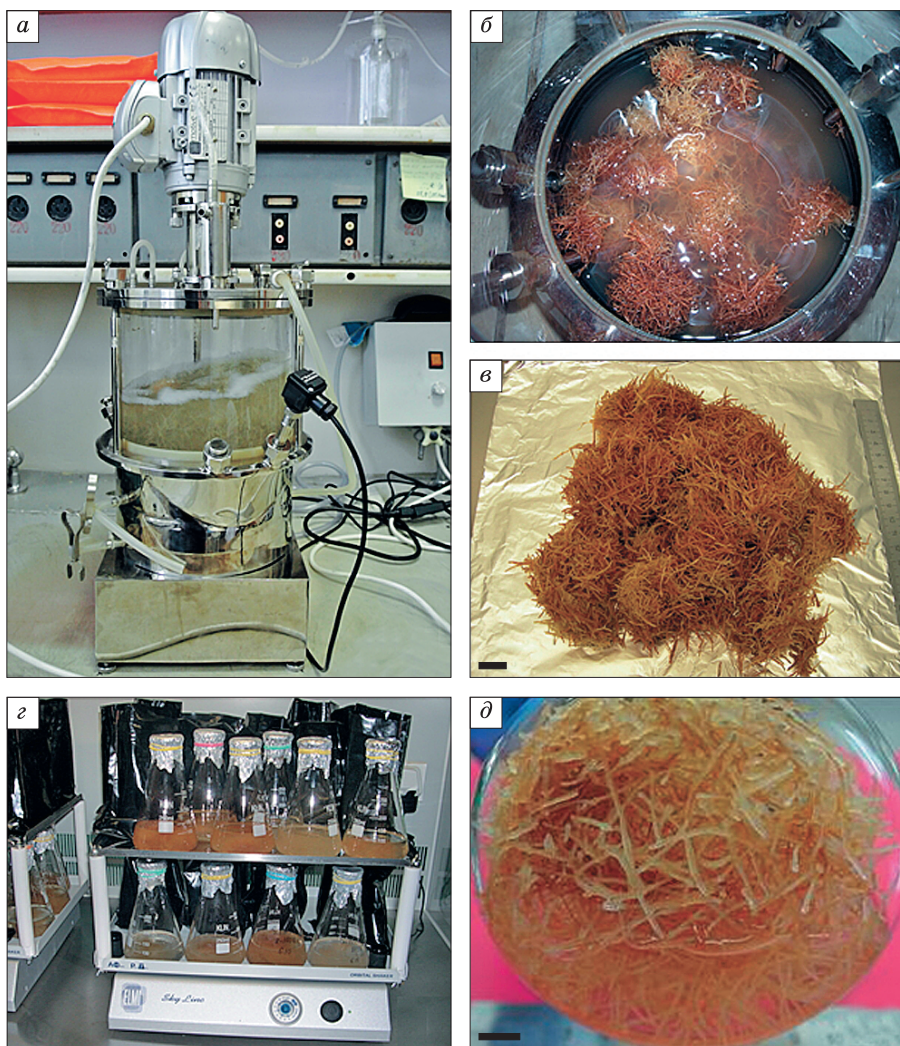
Цель работы состояла в изучении особенностей культивирования “бородатых” корней лекарственного растения *A. penduliflorus* в газовихревом биореакторе “VortexLab-10” и оценки качественного и количественного состава метаболитов в сравнении с шейкерной культурой.

Для определения сырой биомассы культуры “бородатых” корней отделяли от питательной среды и взвешивали. Прирост биомассы оценивали по ростовому индексу, который рассчитывали по формуле $I = \frac{\overline{M}_{\max} - \overline{M}_0}{\overline{M}_0}$, где \overline{M}_0 и \overline{M}_{\max} – средняя масса корневых культур в начале и конце цикла выращивания (Godoy-Hernandez, Vazquez-Flota, 2006).

Содержание флавонолов, катехинов, каратиноидов, дубильных веществ, пектинов, протопектинов у *A. penduliflorus* определяли спектрофотометрическим методом (Беликов, Шрайбер, 1970; Полевой, Максимова, 1978; Кривенцов, 1989; Кукушкина и др., 2003; Федосеева, 2005). Содержание флавонолов рассчитывали на рутин. Качественными реакциями на тритерпеновые сапонины были: пенообразование, равное по объему и стойкости, при встряхивании пробирок с растворами кислоты и щелочи при добавлении извлечения сапонинов и выпадение белого хлопьевидного осадка при добавлении к вытяжке сапонинов ацетона. Сапонины определяли весовым методом (Киселёва и др., 1991). Все показатели, кроме каротиноидов (мг%), рассчитаны в процентах от абсолютно сухой массы сырья.

Эксперименты по культивированию “бородатых” корней проводили в двух повторностях, а анализ БАВ – в четырех. Данные представлены в виде средних значений и стандартных ошибок ($M \pm m$).

Химический анализ БАВ “бородатых” корней *A. penduliflorus* показал, что в условиях биореактора культуры сохранили способность к синтезу метаболитов, специфичных для данного вида, в количестве, сопоставимом с их содержанием не только в корнях, но и в надземной части интактного растения (табл. 1, 2). Причем содержание отдельных БАВ в условиях биореактора превосходило их содержание в шейкерной культуре. Количество дубильных веществ увеличивалось в 2.9 раза,



Культура “бородатых” корней *A. penduliflorus*:

в биореакторе “VortexLab-10” через 15 дней (а) и 30 дней культивирования (б, в); шейкерная культура (з) через 30 дней культивирования на жидкой безгормональной среде В₅ (д). Масштаб 1 см.

Таблица 1

Содержание БАВ в органах растений-интродуцентов *A. penduliflorus* в фазу цветения, % от абсолютно сухой массы сырья

Орган растения	Флавонолы	Дубильные вещества	Катехины	Пектины	Протопектины	Тритерпеновые сапонины
Лист	5.63 ± 0.05	23.79 ± 0.12	0.05 ± 0.01	0.52 ± 0.04	4.49 ± 0.09	12.91 ± 0.15
Соцветие	4.44 ± 0.02	6.30 ± 0.08	0.11 ± 0.03	0.47 ± 0.04	3.62 ± 0.11	20.41 ± 0.08
Стебель	0.59 ± 0.09	1.80 ± 0.02	0.05 ± 0.01	0.48 ± 0.05	4.47 ± 0.06	7.94 ± 0.13
Корень	0.07 ± 0.02	1.08 ± 0.15	0.06 ± 0.01	0.25 ± 0.01	2.92 ± 0.12	2.57 ± 0.13

Таблица 2

Содержание БАВ в “бородатых” корнях *A. penduliflorus* при разных способах культивирования, % от абсолютно сухой массы сырья

Способ культивирования	Флавонолы	Дубильные вещества	Катехины	Пектины	Протопектины	Тритерпеновые сапонины	Каротиноиды, мг%
Шейкерная культура	0.53 ± 0.02	1.35 ± 0.08	1.81 ± 0.06	1.07 ± 0.03	2.96 ± 0.16	5.50 ± 0.10	1.25 ± 0.04
Биореактор “VortexLab-10”	0.60 ± 0.05	3.98 ± 0.12	0.24 ± 0.02	1.26 ± 0.07	3.19 ± 0.19	6.12 ± 0.19	7.34 ± 0.09

каротиноидов – в 5.9 раза. Необходимо отметить, что культуры не только поглощали макро- и микроэлементы из питательных сред, но и выделяли в них некоторое количество продуктов вторичного метаболизма. Анализ питательной среды в конце цикла выращивания выявил наличие сапонинов, как в шейкерной культуре, так и при культивировании в биореакторе. Количество сапонинов в питательной среде для шейкерной культуры составило 11.74 ± 0.16 мг/мл, для биореактора – 9.22 ± 0.11 мг/мл.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, сохранение ростовой активности, содержание и многокомпонентный состав метаболитов в корневых культурах являются показателями для дальнейшей оптимизации крупномасштабного культивирования “бородатых” корней *A. penduliflorus* с целью получения ценных БАВ.

Благодарности. Выражаем глубокую признательность Уварову Ивану Павловичу за предоставление оборудования для проведения эксперимента.

Известно, что на выход биомассы и накопление БАВ влияют не только состав питательной среды, ее объем, но и другие кинетические параметры (Neelwarne, Thimmaraju, 2009). Увеличение содержания метаболитов в нашем эксперименте, возможно, связано с конструкцией газовыхревого биореактора, обеспечивающей эффективное перемешивание жидкой среды, что согласуется с результатами других исследователей при масштабном культивировании “бородатых” корней в биореакторах (Steingroewer et al., 2013; Кулуев и др., 2015).

В статье использовался материал Биоресурсной научной коллекции ЦСБС СО РАН, УНУ “Коллекции живых растений в открытом и закрытом грунте”, № USU 440534.

Работа выполнена в рамках государственного задания ЦСБС СО РАН по проекту “Оценка морфогенетического потенциала популяций растений Северной Азии экспериментальными методами”, № АААА-А17- 117012610051-5.

ЛИТЕРАТУРА

- Беликов В.В., Шрайбер М.С.** Методы анализа флавоноидных соединений // Фармация. 1970. № 1. С. 66–72.
- Киселёва А.В.** Биологически активные вещества лекарственных растений Южной Сибири / А.В. Киселёва, Т.А. Волхонская, В.Е. Киселёв. Новосибирск, 1991. 136 с.
- Кривенцов В.И.** Бескарбазольный метод количественного спектрофотометрического определения пектиновых веществ // Тр. Никит. ботан. сада. 1989. Т. 109. С. 128–137.
- Кукушкина Т.А., Зыков А.А., Обухова Л.А.** Манжетка обыкновенная (*Alchemilla vulgaris* L.) как источник лекарственных средств // Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения: материалы VII Междунар. съезда. СПб., 2003. С. 64–69.
- Кулуев Б.Р., Вершинина З.Р., Князев А.В., Чемрис Д.А.** “Косматые” корни растений – важный инструментарий для исследователей и мощная фитохимикофабрика для производителей // Биомика. 2015. Т. 7, № 2. С. 70–120.
- Полевой В.В.** Методы биохимического анализа растений / В.В. Полевой, Г.Б. Максимова. Л., 1978. 192 с.
- Смирнова Ю.А.** Лекарственные растения и сырье традиционной китайской медицины. Сообщ. 1. Корень астрагала (*Radix Astragali*) // Рефлексотерапия и комплементарная медицина. 2013. Т. 5, № 3. С. 3–18.
- Федосеева Л.М.** Изучение дубильных веществ подземных и надземных вегетативных органов бада-на толстолистного (*Bergenia crassifolia* (L.) Fitch.), произрастающего на Алтае // Химия раст. сырья. 2005. № 2. С. 45–50.
- Хобракова В.Б., Николаев С.М.** Иммуномодулирующие свойства отвара астрагала перепончатого // Сиб. мед. обозрение. 2009. Т. 59, № 5. С. 45–48.
- Fukui H., Feroj-Hasan A.F.M., Ueoka T., Kyo M.** Formation and secretion of a new brown benzoquinone by hairy root cultures of *Lithospermum erythrorhizon* // Phytochemistry. 1998. V. 47. P. 1037–1039.
- Gamborg O.L., Eveleigh D.E.** Culture methods and detection of glucanases in suspension cultures of wheat and barley // Can. J. Biochem. 1968. V. 46, No. 5. P. 417–421.
- Godoy-Hernandez G., Vazquez-Flota F.A.** Growth measurements: estimation of cell division and cell expansion // Plant Cell Culture Protocols. Series: Methods in Molecular Biology. 2006. V. 318, No. 2. P. 51–58.
- Neelwarne B., Thimmaraju R.** Bioreactor for cultivation of red beet hairy roots and in situ recovery of primary and secondary metabolites // Eng. Life Sci. 2009. V. 9. P. 227–238.
- Parr A.J., Hamill J.D.** Relationship between *Agrobacterium rhizogenes* transformed hairy roots and intact, uninfected *Nicotiana* plants // Phytochemistry. 1987. V. 26, No. 12. P. 3241–3245.
- Sevón N., Oksman-Caldentey K.M.** *Agrobacterium rhizogenes* – mediated transformation: root cultures as a source of alkaloids // Planta Med. 2002. V. 68, No. 10. P. 859–868.
- Sinclair S.** Chinese herbs: a clinical review of *Astragalus*, *Ligusticum*, and *Schizandrae* // Altern. Med. Rev. 1998. V. 3, No. 5. P. 338–344.
- Steingroewer J., Bley T., Vasil G., Ivanov I., Lenk F., Marchev A., Pavlov A.** Bioprocessing of differentiated plant *in vitro* systems // Eng. Life Sci. 2013. V. 13, No. 1. P. 26–38.

Vdovitchenko M.Yu., Kuzovkina I.N., Paetz Ch., Schneider B. Formation of phenolic compounds in the roots of *Hedysarum theinum* cultured *in vitro* // Russ. J. Plant Physl. 2007. V. 54, No. 4. P. 536–544.

Wagner H., Bauer R., Xiao P.G., Chen J.M., Michler G. Radix astragali (Huang Qi) // Chin. Drug Monogr. Anal. 1997. V. 1. P. 1–17.

Zárate R. Tropane alkaloid production by *Agrobacterium rhizogenes* transformed hairy root cultures of *Atropa baetica* Wilk. (Solanaceae) // Plant Cell Rep. 1999. V. 18. P. 418–423.

Поступила в редакцию 11.08.2019 г.,
после доработки – 23.09.2019 г.,
принята к публикации 15.10.2019 г.