

ОСОБЕННОСТИ РОСТА КУЛЬТУР ГЕНЕТИЧЕСКИ ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ (БОРОДАТЫХ) КОРНЕЙ ТАБАКА И ВИТАНИИ ПРИ ИЗМЕНЕНИИ ОБЪЕМА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ

Х.Г. МУСИН^{1*}, А.Б. ЯКУПОВА¹, Е.В. МИХАЙЛОВА², Б.Р. КУЛУЕВ^{1,2}

¹ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный университет»,

²ФГБУН «Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук», Уфа

Генетически трансформированные (бородатые) корни растений являются перспективной системой в биотехнологии для продуцирования первичных и вторичных метаболитов как растительного, так и нерастительного происхождения. В лабораторных условиях бородатые корни выращивают в колбах с жидкой питательной средой на орбитальных шейкерах. Для промышленного выращивания бородатых корней разрабатываются различные биореакторы, однако многие из них сложно устроены и довольно трудно воспроизводимы. Поэтому остается актуальной возможность использования колб и орбитальных шейкеров для выращивания бородатых корней в промышленных масштабах. В связи с этим целью настоящего исследования стало определение биомассы бородатых корней при выращивании их в колбах и питательных средах разного объема. На культурах бородатых корней табака (*Nicotiana tabacum* L.) и витании (*Withania somnifera* L.) было показано, что с увеличением объема колбы и питательной среды скорость роста корней также увеличивается. Полученные данные указывают на перспективность выращивания культур бородатых корней в больших колбах не только для научных целей, но и для промышленного производства.

Ключевые слова: *Nicotiana tabacum*, *Withania somnifera*, бородатые корни, генетически трансформированные корни, *Agrobacterium rhizogenes*, скорость роста.

Введение

Многие современные лекарственные препараты имеют растительное происхождение, часть из которых извлекается из подземных частей различных лекарственных растений. При этом довольно часто содержание действующих веществ в таких растениях относительно невелико. Более того, некоторые лекарственные растения занесены в Красные книги разных уровней и/или встречаются на ограниченной территории, что затрудняет, либо даже исключает заготовку из них в массовых количествах ценного лекарственного сырья. В этой связи удобную альтернативу растениям, произрастающим как в дикой природе, так и на возделываемых площадях может составить биотехнологическое выращивание культур бородатых (или «косматых») корней этих растений, которые способны к неограниченному росту на безгормональных питательных средах [1].

Генетически трансформированные (бородатые) корни получают при помощи бактерий семейства *Rhizobiaceae Agrobacterium rhizogenes*. В природе данные бактерии, попадая в поврежденные части растений, взаимодействуют с клетками растений и интегрируют в ядерный геном Т-ДНК своей мегаплазмиды, известной под названием Ri-плазмиды (root-inducing). Благодаря своим биологическим особенностям *A. rhizogenes* широко применяется в генной инженерии растений, прежде всего для получения культур бородатых корней. Это связано с тем, что корни сохраняют в условиях *in vitro* генетическую стабильность и довольно часто способность к синтезу корнеспецифичных для данного растения вторичных метаболитов, что кардинально отличает их от культур недифференцированно растущих клеток и тканей [1].

В биотехнологии растений применяют три основных способа выращивания бородатых корней: в чашках Петри на твердых питательных средах, в колбах в жидкой среде и специально сконструированных для выращивания корневых культур биореакторах. Наиболее быстрого роста бородатых корней, а значит и наибольшей их продуктивности можно добиться, выращивая их в специальных биореакторах с хорошей аэрацией и аэрозольной подачей питательной среды, однако не все трудности при их конструировании на сегодняшний день преодолены

© 2017 г. Мусин Х.Г., Якупова А.Б., Михайлова Е.В., Кулуев Б.Р.

* Автор для переписки:

Мусин Халит Галеевич

аспирант

ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный университет»

E-mail: lu2666@yandex.ru

[5]. Медленнее всего бородатые корни растут на твердых питательных средах. Поэтому выращивание культур бородатых корней в колбах с жидкой средой продолжает оставаться перспективным, в том числе для их промышленного культивирования. Однако на сегодняшний день остается неясным, как будут меняться параметры роста бородатых корней при увеличении объема колб и питательной среды, то есть при масштабировании.

В связи с этим целью данного исследования стало определение параметров роста бородатых корней при выращивании их в колбах и питательных средах разного объема. В качестве объектов исследования были выбраны модельная система бородатых корней табака, а также генетически трансформированные корни витании *Withania somnifera* L. Известно, что в корнях *N. tabacum* содержится токсичное вещество никотин и ценный алкалоид анатабин. Однако ценность для биотехнологических исследований представляет другое свойство этого растения. Оно достаточно легко трансформируется агробактериями и потому часто используется в качестве модельного объекта [4]. *W. somnifera* (Ашваганда) — это ценное лекарственное растение, используемое как в традиционной медицине, так и в качестве биологически активной добавки. В его состав входят более 12 различных алкалоидов, флавоногликозиды, лигнаны, стероидные лактоны группы витанолидов [9]. Эти вещества выделяют из корней *W. somnifera* и применяют в лечении туберкулеза, ревматизма, рака, воспалительных заболеваний, заболеваний сердечно-сосудистой системы, а также в качестве общеукрепляющего средства [3].

Материалы и методы

Линии бородатых корней *W. somnifera* были получены ранее путем трансформации семядольных эксплантов, используя штаммы A4 и 15834 *A. rhizogenes* [2]. Для получения трансформированных корней табака использовали здоровые, молодые листья 4-месячных растений, стерилизованные с использованием 70% этилового спирта и 10% раствора гипохлорита натрия. Полученные стерильные листовые диски заражались штаммом A4 *A. rhizogenes*, выращенных предварительно на жидкой среде LB с добавлением 100 мг/л рифампицина. Совместное культивирование листовых эксплантов и агробактерий проводилось на твердой среде Мурасиге — Скута (МС) [6] в течение 3 суток при температуре +26 °С, после чего растительные экспланты были перенесены на твердую среду МС (соли МС, сахара — 30 г/л, 120 мг/л инозитола, 2 мг/л глицина, 1 мг/л тиамина и 1 мг/л никотиновой

кислоты, 350 мг/л антибиотика аугментина). После полного избавления от агробактерий экспланты переносили на полутвердую среду МС, не содержащую антибиотики, где они культивировались в течение месяца. Бородатые корни начинали появляться через неделю. Все образованные на эксплантах бородатые корни растений фрагментами длиной по 1,5–2 см переносились в отдельные колбы с жидкой средой МС и использовались как отдельные линии генетически трансформированных корней.

Дальнейшие исследования проводились с использованием полученных линий растений на жидкой среде МС. Двухнедельные культуры корней переносились в колбы объемами 100, 250, 500, 2000 мл, где объем питательной среды составлял 10% от указанных объемов колб, и культивировались на орбитальном шейкере (100 об/мин) при комнатной температуре (22–24 °С). Длительность культивирования составила 6 недель. Первоначальный вес корней составил порядка 30±0,4 мг. Независимо от объема колб среды обновлялись каждые 3 дня. В конце каждой недели осуществлялось измерение массы корней. Статистическая обработка проводилась в программе Microsoft Excel 2003. В целом было исследовано по 4 линии генетически трансформированных корней табака и витании.

Результаты и обсуждение

Бородатые корни табака начинали появляться на 7-й день после инокуляции. Эффективность трансформации для штамма агробактерий A4 составила 77%. Многие листовые пластинки с течением времени приобретали коричневый оттенок и образовывали каллус. Разные линии корней характеризовались различной толщиной корня, характером ветвления и интенсивностью образования каллуса. Можно предполагать, что каллусные наросты образуются в результате деятельности встроенных агробактерией Rol-генов, так как это способствует изменению содержания и активности фитогормонов в растениях [8].

После переноса культуры корней в колбы они интенсивно росли в длину и довольно быстро охватывали весь объем раствора. После заполнения всего пространства бородатые корни начинали усиленно ветвиться и разрастаться, появлялись каллусные наросты. Когда весь объем колбы заполнялся и возможность для дальнейшего разветвления корней отсутствовала, начиналось развитие каллуса.

Как показано на рисунке 1, в первые три недели масса корней росла по экспоненте. По истечении четвер-

той недели начинали интенсивно расти боковые корни. При этом наблюдалась закономерность: чем меньше объем питательной среды, тем быстрее останавливался рост боковых корней, поскольку объем колбы заполнялся быстрее. После того как уже все пространство было заполнено, корни начинали расти в толщину; при этом часто укрупнялись каллусные наросты. В колбах с большим объемом, даже в конце шестой недели каллусные образования были достаточно мелкими. Подобная закономерность наблюдалась у всех линий бородачатых корней (рис. 2).

Сравнивая результаты нескольких линий бородачатых корней *N. tabacum*, можно прийти к выводу, что наиболее быстро растущей линией является N.T.A4 (4) (рис. 3). Отметим, что линия N.T.A4 (1) в колбах с большим объемом образовывала массивные каллусы, после достижения шестой недели из них появлялись зеленые побеги. Имеются сведения, что после двухмесячного культивирования без пересадки корни с небольшим объемом колб начинали терять в массе, даже при том, что питательные среды постоянно обновлялись [10].

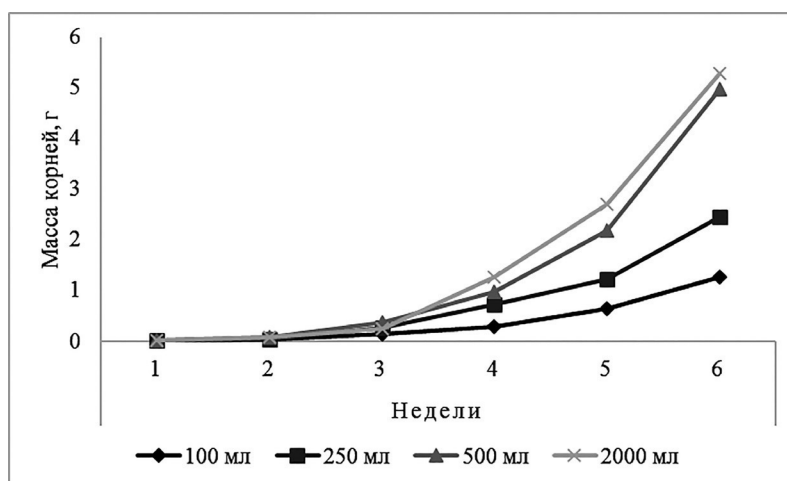


Рис. 1. Динамика роста массы культуры бородачатых корней табака линии N.T.A4(2) в зависимости от объема колб и питательной среды

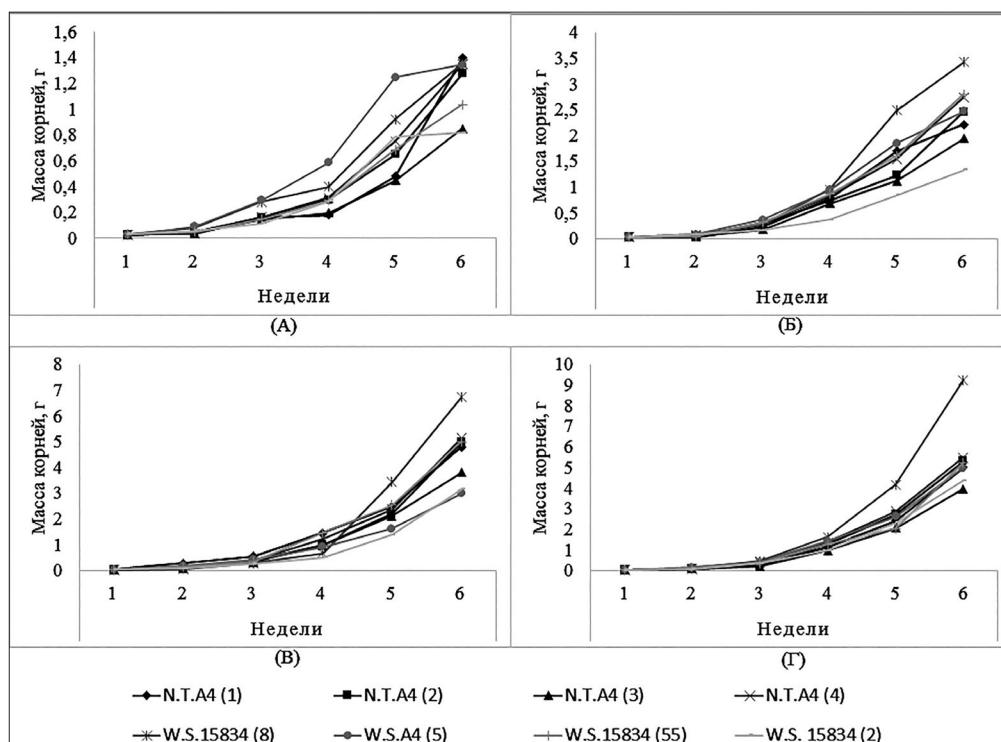


Рис. 2. Сравнительный анализ динамик роста массы культуры бородачатых корней в колбах объемами 100 мл (А), 250 мл (Б), 500 мл (В), 2000 мл (Г)

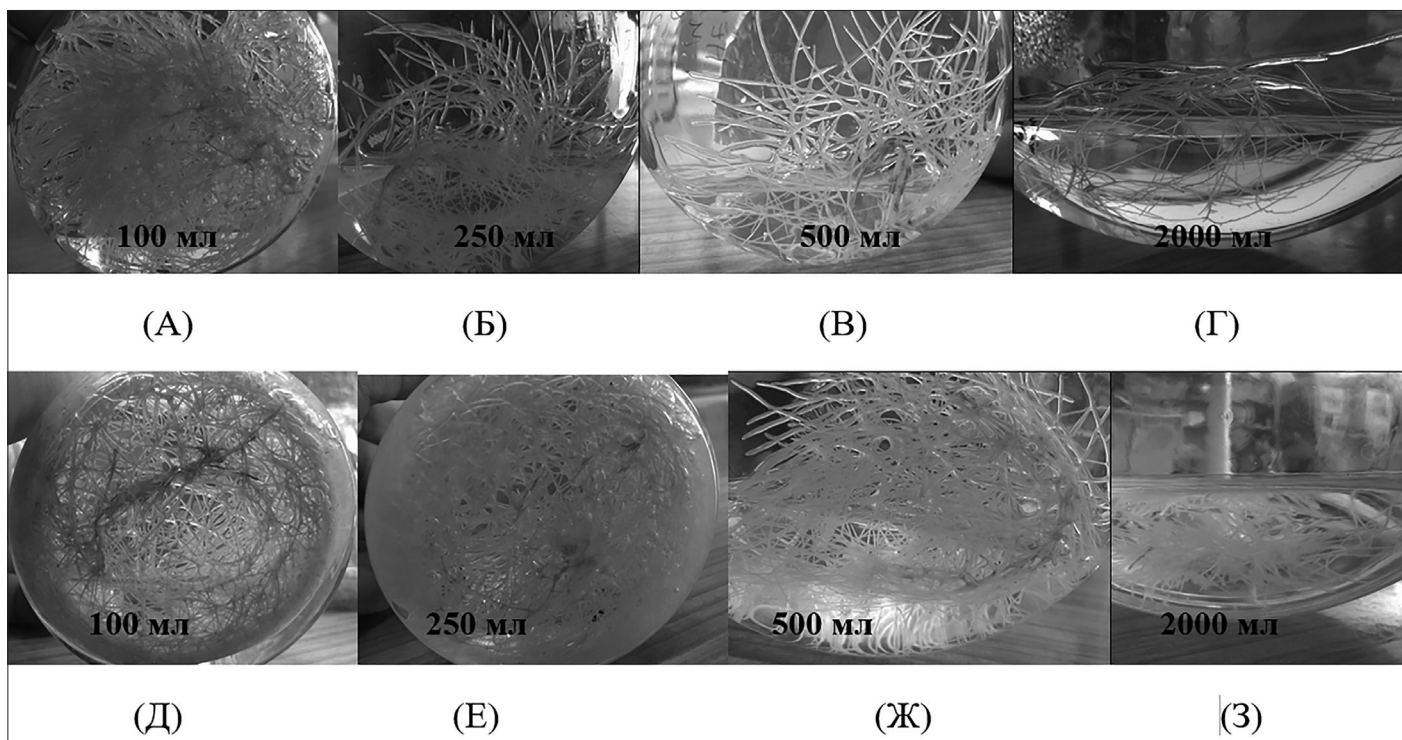


Рис. 3. Четырехнедельные корни табака линии N.T.A4 (4) (А, Б, В, Г) и витании линии W.S.15834 (55) (Д, Е, Ж, З) в колбах разного объема и с разным количеством питательной среды

При сравнении интенсивности роста культуры корней *W. somnifera* и *N. tabacum* выявлено, что корни витании быстрее набирают массу, чем корни табака. К примеру, в колбе объемом 2000 мл линия корней W.S.15834 (55) за шесть недель увеличила массу в 280 раз, тогда как наиболее быстрорастущая линия бородатых корней табака N.T.A4 (4) увеличилась лишь в 189 раз. Существенных различий между линиями бородатых корней витании, трансформированными с помощью различных штаммов *A. rhizogenes*, мы не наблюдали.

Бородатые корни линии W.S.15834 (2) быстро теряли способность к росту и рано образовывали каллус. В колбе объемом 100 мл при достижении 5-недельного возраста они бурели, а их масса увеличивалась лишь за счет роста каллусных клеток. Аналогичный результат получили Михайлова Е.В. с соавт. (2017) [2]. Murthy H.N. (2008) и его коллеги [7] приводят примерно те же результаты, утверждая, что оптимальный период роста трансформированных корней *W. somnifera* в 100 мл колбе ограничивается 28 днями. Для трансформации ростков витании они использовали агробактерии *A. rhizogenes* штамма R1601. Другие же линии, например, W.S.15834 (55) продолжали активно образовывать корни даже после шестой недели культивирования.

Заключение

Таким образом, бородатые корни растений в колбах с жидкой средой растут в геометрической прогрессии, и параметры их роста сильно зависят от объема колбы и питательной среды. При этом бородатые корни растут тем быстрее, чем больше объем колбы и питательной среды. Это означает, что масштабирование лабораторных способов культивирования бородатых корней может идти по довольно простому алгоритму, а именно: увеличению объема колбы и питательной среды; причем это будет способствовать существенному увеличению их продуктивности. Исходя из полученных нами результатов исследования, можно предполагать, что выращивание культур бородатых корней в больших колбах на орбитальных шейкерах перспективно не только для научных целей, но и для промышленного производства.

Литература

1. Кулуев Б.Р., Вершинина Э.Р., Князев А.В., Чемерис Д.А., Баймиев Ан.Х., Чумаков М.И., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. «Косматые» корни растений — важный инструментальный для исследователей и мощная фитохим-биофабрика для производителей // Биомика. — 2015. — № 2. — С. 70–120.

2. Михайлова Е.В., Кулчев Б.Р., Ясыбаева Г.Р., Чеме-рис А.В. Создание культур бородатых корней *Withania somnifera* и оценка параметров их роста при выращивании на твердых и жидких питательных средах // Вестник физико-химической биологии и биотехнологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2017. — Т. 13. — № 2. — С. 40–45.
3. Asthana R., Raina M.K. Pharmacology of *Withania somnifera* — a review // *Drugs*. — 1989. — Vol. 26. — P. 1–7.
4. Häkkinen S.T., Moyano E., Cusidó R.M., Palazón J., Piñol M.T., Oksman-Caldentey K.M. Enhanced secretion of tropane alkaloids in *Nicotiana tabacum* hairy roots expressing heterologous hyoscyamine-6 β -hydroxylase // *Journal of Experimental Botany*. — 2005. — Vol. 56(420) — P. 2611–2619.
5. Mishra B.N., Ranjan R. Growth of hairy-root cultures in various bioreactors for the production of secondary metabolites // *Biotechnology Application Biochemistry*. — 2008. — Vol. 49(Pt. 1). — P. 1–10.
6. Murashige T. and Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. // *Physiologia Plantarum*. — 1962. — N 15. — P. 473–497.
7. Murthy H.N., Dijkstra C., Anthony P., White D.A., Davey M.R., Power J.B., Paek K.Y. Establishment of *Withania somnifera* hairy root cultures for the production of withanolide A // *Journal of Integrative Plant Biology*. — 2008. — Vol. 50(8). — P. 975–981.
8. Nemoto K., Hara M., Suzuki M., Seki H., Oka A., Muranaka T., Mano Y. Function of the aux and rol genes of the Ri plasmid in plant cell division in vitro // *Plant Signaling & Behavior*. — 2009. — Vol. 4(12) — P. 1145–1452.
9. Ray A.B., Gupta M. Withasteroids, a growing group of naturally occurring steroidal lactones // *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe / Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. — Springer Vienna, 1994. — P. 1–106.
10. Zayed R. and Wink M. Induction of pyridine alkaloid formation in transformed root cultures of *Nicotiana tabacum* // *Zeitschrift für Naturforschung C*. — 2009. — Vol. 64(11–12). — P. 869–943.

GROWTH CHARACTERISTICS OF TABACCO AND *WITHANIA SOMNIFERA* HAIRY ROOT CULTURES IN DIFFERENT VOLUME OF FLASKS AND NUTRIENT MEDIA

Kh.G. MUSIN¹, A.B. YAKUPOVA¹, E.V. MIKHAYLOVA², B.R. KULUEV^{1,2}

¹ *Bashkir State University,*

² *Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Scientific Center,
Russian Academy of Sciences, Ufa, Russian Federation*

Hairy roots of plant are a promising system in biotechnology for the production of primary and secondary metabolites. In the laboratory, hairy roots are grown in flasks with a liquid nutrient medium on orbital shakers. For the industrial cultivation of hairy roots, various bioreactors are being developed, but many of them are complex and difficult to reproduce. Therefore, it remains relevant to use flasks and orbital shakers for growing hairy roots on an industrial scale. In this regard, the purpose of this study was to determine the biomass of hairy roots when growing them in flasks and nutrient media of different volumes. On hairy root cultures of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) and ashwagandha (*Withania somnifera* L.) it was shown that with the increase in the volume of the flask and nutrient medium, the growth rate of the roots also increases. The received data indicate the prospects of growing hairy root cultures in large flasks not only for scientific purposes, but also for industrial production.

Keywords: *Nicotiana tabacum*, *Withania somnifera*, hairy root, genetically transformed roots, *Agrobacterium rhizogenes*, growth rate