

Масштабирование *in vitro* корневой культуры *Tagetes patula* L.

In vitro scaling of *Tagetes patula* L. root culture

Хлебова Л. П., Бровко Е. С.

Khlebova L. P., Brovko E. S.

Алтайский государственный университет, г. Барнаул, Россия. E-mail: hlebova61@mail.ru, alenaplyuscheva.721@mail.ru
Altai State University, Barnaul, Russia

Реферат. Изучены особенности накопления *in vitro* биомассы корневой культуры *Tagetes patula* L. в процессе масштабирования в лабораторных условиях в разных объемах питательной среды и культуральных сосудов. Выявлено, что характер роста линии *hairy roots* и ее морфология зависят от объема инкубационного сосуда. Установлена закономерность увеличения интенсивности роста и удлинения ростового цикла культуры в колбах большего объема (до 500 мл).

Ключевые слова. Биомасса, культура *hairy roots*, масштабирование *in vitro*, ростовой цикл, *Tagetes patula*.

Summary. The features of the *in vitro* accumulation of biomass of *Tagetes patula* L. root culture in the process of scaling under laboratory conditions in different volumes of the nutrient medium and culture vessels were studied. It was revealed that the growth pattern of the hairy roots line and its morphology depend on the volume of the incubation vessel. The pattern of increasing the growth rate and lengthening of the growth cycle of the culture in larger flasks (up to 500 ml) was established.

Key words. Growth cycle, hairy root culture, *in vitro* scaling, root biomass, *Tagetes patula*.

Введение. Культура *hairy roots* («бородатые корни») привлекает все большее внимание исследователей в качестве альтернативного источника ценных вторичных метаболитов и используется для биосинтеза целого ряда биологически активных веществ (Zhou et al., 2007; Sevón, Oksman-Caldentey, 2012; Кузовкова и др., 2015; Олина и др., 2016; Эрст и др., 2017, 2018). Данная система имеет ряд существенных преимуществ как относительно клеточных суспензий, отличающихся генетической нестабильностью, так и в сравнении с корнями интактных растений, характеризующихся относительно медленным ростом (Лучакивская и др., 2012). Генетически трансформированные корни получают при помощи почвенной агробактерии семейства Rhizobiaceae *Agrobacterium rhizogenes*. Попадая в поврежденные части растений, бактерии способны интегрировать в ядерный геном клетки-хозяина T-ДНК своей Ri-плазмиды, стимулируя неограниченный рост корневой системы. При этом корни сохраняют в условиях *in vitro* способность к синтезу корнеспецифичных для данного растения вторичных метаболитов (Кузовкина, Вдовиченко, 2011; Кулуев и др., 2015).

Методом *Agrobacterium*-опосредованной трансформации *in vitro* нами получена активно растущая корневая культура одного из представителей рода *Tagetes* – *T. patula* L. (бархатцы отклоненные) (Buchkova et al., 2018; Khlebova et al., 2019). Известно, что ткани данного вида накапливают ценные ароматические серосодержащие вещества – тиофены, обладающие выраженной биоцидной активностью (Taha et al., 2013; Gupta et al., 2016; Politi et al., 2016; Krzyzaniak et al., 2017; Mir et al., 2019). Однако их содержание в интактных растениях отличается нестабильностью, зависит от стадии развития и условий выращивания. Культура *hairy roots* является альтернативным источником получения данных веществ, позволяющим избежать проблем, связанных с непостоянным уровнем синтеза вторичных метаболитов, а также представляет собой модельную систему для изучения путей их биосинтеза.

Промышленное производство ценных метаболитов предполагает стабильное получение корневой биомассы в больших объемах, характер роста которой может отличаться от мелкомасштабного

культивирования (Кулуев и др., 2015). Выращивание трансформированных корней на твердых средах малоэффективно вследствие низкой скорости роста и используется, как правило, на первоначальных этапах с целью индукции первичной культуры *hairy roots*. Отработка технологии выращивания корней в условиях погруженной культуры в колбах различного объема является необходимым этапом подбора условий для крупномасштабного наращивания биомассы с использованием биореакторов (Михайлова и др., 2017; Мусин и др., 2017). Целью данной работы явилось изучение особенностей роста трансформированных корней *T. patula* при их масштабировании *in vitro* в жидких питательных средах.

Материалы и методы. Объектом исследования служила стабильно растущая линия *hairy roots* бархатцев отклоненных, полученная в Алтайском центре прикладной биотехнологии (Алтайский государственный университет) путем трансформации листовых эксплантов стерильных растений диким штаммом почвенной агробактерии А4. Данная линия сохраняет свой рост и морфологические характеристики в течение многократных пассажей при выращивании в жидкой питательной среде Мурасиге-Скуга (Murashige, Skoog, 1962) в колбах объемом 100 мл в условиях термостатируемого орбитального шейкера. Для оценки параметров роста генетически трансформированной корневой линии *T. patula* 100 мг одновозрастного инокулюма переносили в колбы объемом 100, 250 и 500 мл с исходным 20 % количеством среды Мурасиге-Скуга и культивировали на шейкере со скоростью 90 об/мин при температуре 24 ± 1 °С без освещения в течение 9 недель. В ходе эксперимента еженедельно определяли сырую массу корней (г/колбу), затем делали перерасчет биомассы на 1 л среды. Статистический анализ данных проводили с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel 2007. Рассчитывали среднюю, ошибку средней. Достоверность различий полученных результатов оценивали с помощью критерия НСР_{0,05}.

Результаты и обсуждение. Динамика роста корней в разных объемах питательной среды имела свои особенности (рис.). Лаг-фаза у всех культур была примерно одинаковой – продолжительностью неделя, переходя в фазу ускоренного роста. Культуры в 100 и 250 мл колбах, начиная со второй недели, характеризовались экспоненциальным ростом. В колбах большего объема, содержащих 100 мл питательной среды, продолжался рост ускорением, и только с третьей недели наступала экспоненциальная фаза, обеспечивая быстрый набор биомассы. В 100 мл колбах с 4-й по 6-ю неделю рост корней практически останавливался, а затем происходило снижение сырой массы. В колбах на 250 мл экспоненциальная стадия продолжалась до восьми недель, переходя в стационарную фазу на 9-й неделе. Большой объем среды в сосудах на 500 мл обеспечивал более длинную фазу экспоненциального роста, которая к 9-й неделе несколько снижалась, но, тем не менее, набор биомассы продолжался.

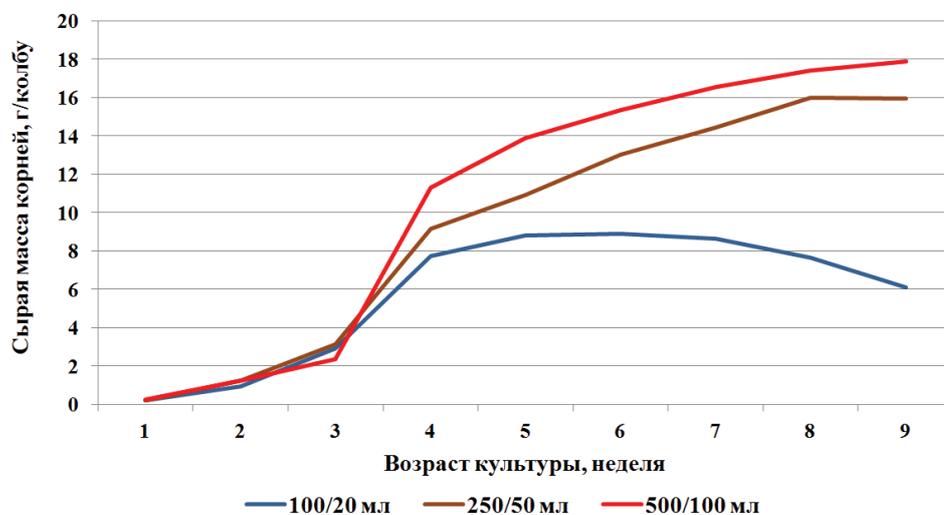


Рис. Кривая роста культуры трансформированных корней *Tagetes patula* L. в условиях одного цикла пролонгированного выращивания в колбах разного объема.

Особенности роста корней в разных объемах питательной среды обусловили различную продуктивность изучаемой линии *hairy roots* (табл. 1). Так, к концу 4-й недели культивирования масса корней в 500 мл колбе составила 11,32 г, что на 46,4 % превысило массу, полученную в 100 мл сосуде. При продолжительном культивировании корней (до 9-ти недель) в небольшом объеме среды (20 мл) произошло снижение сырой биомассы относительно максимального значения, сформированного в течение 6-й недели (8,90 г) почти на 30 %. В литературе описаны подобные данные, полученные на других видах растений. Так, например, 8-недельное культивирование без пересадки корневых линий табака в малом объеме питательной среды приводило к потере массы, несмотря на обновление среды (Zayed, Wink, 2009). Пересчет результатов на 1 л среды показал, что набор биомассы в малом объеме идет быстрее, однако вследствие истощения среды блокируется по истечении 4-х недель (табл. 2). Большой объем, в свою очередь, обеспечивал более длительный рост культур.

Таблица 1

Сырая масса корней линии *hairy roots Tagetes patula* L. в условиях одного цикла выращивания в колбах различного объема, г/колбу

Возраст культуры, неделя	Объем колбы/среды		
	100/20 мл	250/50 мл	500/100 мл
1	0,21 ± 0,02	0,19 ± 0,02	0,24 ± 0,03
2	0,92 ± 0,08	1,26 ± 0,07	1,23 ± 0,11
3	2,91 ± 0,23	3,15 ± 0,22	2,34 ± 0,24
4	7,73 ± 0,44	9,14 ± 0,32	11,32 ± 1,02
5	8,82 ± 0,92	10,93 ± 1,02	13,87 ± 1,13
6	8,90 ± 0,72	13,01 ± 1,23	15,34 ± 2,44
7	8,65 ± 0,67	14,44 ± 2,02	16,54 ± 2,51
8	7,65 ± 0,78	15,98 ± 1,94	17,43 ± 1,99
9	6,12 ± 0,42	15,96 ± 2,06	17,87 ± 2,43
НСР	0,71	1,05	0,87

Таблица 2

Сырая масса корней линии *hairy roots Tagetes patula* L. в условиях одного цикла выращивания в колбах различного объема, г/л среды

Возраст культуры, неделя	Объем колбы/среды		
	100/20 мл	250/50 мл	500/100 мл
1	10,50 ± 1,10	3,87 ± 0,80	2,49 ± 0,63
2	46,51 ± 5,32	25,28 ± 2,23	12,35 ± 1,01
3	145,88 ± 12,97	63,23 ± 8,11	23,46 ± 2,44
4	386,78 ± 21,15	182,84 ± 10,36	113,27 ± 9,31
5	441,75 ± 18,87	218,65 ± 15,41	138,78 ± 12,23
6	445,80 ± 24,08	260,27 ± 13,25	153,45 ± 13,44
7	432,57 ± 26,09	288,83 ± 15,32	165,47 ± 12,41
8	382,54 ± 22,15	319,65 ± 17,28	174,34 ± 10,01
9	306,21 ± 20,48	319,23 ± 16,31	178,76 ± 13,43
НСР	20,75	12,46	6,32

Визуальные наблюдения за развитием корневой массы показали, что независимо от объема сосуда, после переноса инокулюма в свежую среду на начальных этапах происходил рост корней в длину. Затем по мере заполнения внутреннего пространства колбы в объеме среды они начинали интенсивно ветвиться, формируя вторичную и третичную сеть. В 100 мл колбе ветвление наблюдали, начиная с третьей недели. При увеличении объема колбы заполнение шло медленнее, и ветвление начиналось с 4–5-й недель культивирования. К этому времени в колбе объемом 100 мл (20 мл среды) ветвление прак-

тически прекращалось, вследствие заполнения всего жидкого пространства, что приводило к остановке набора биомассы (табл. 1, 2). С увеличением объема среды и сосуда ветвление продолжалось. В 250 мл колбе замедлялось к 8–9-й неделям, а в максимально испытанном объеме (500 мл) не останавливалось до конца эксперимента (конец 9-й недели), обеспечивая рост биомассы, о чем свидетельствует кривая роста (рис.). При этом корни свободно плавали, постоянно омываясь питательной средой, что позволял ее объем.

В малом объеме среды (20 мл), начиная с 7–8-й недели цикла, с корнями происходили некоторые метаморфозы, заключающиеся в неравномерном утолщении их первичных стволов, характерных для корневой системы интактных растений *in vivo*. Подобные изменения наблюдали Х. Г. Мусин и др. (2017) при выращивании *hairy roots* табака и витании. Кроме того, авторы сообщили о формировании каллусных наростов на корнях после прекращения ветвления главных стволов. При этом в колбах большого объема (до 2 л) каллусные образования отсутствовали или были очень мелкими. В нашем эксперименте изученная линия бархатцев отклоненных каллус не инициировала. Вероятно, подобные морфологические новообразования в сильной степени зависят от генотипа исходного растения и корневой линии.

Таким образом, процесс масштабирования биомассы корней изученной нами линии показал, что характер роста культуры и ее морфология при прочих равных условиях в сильной степени зависят от объема питательной среды и инкубационного сосуда. Установлена закономерность повышения интенсивности роста в колбах большего объема. При этом происходит смещение экспоненциальной фазы кривой роста в сторону увеличения временного интервала, что обеспечивает более длительный рост культуры. Это определяет вектор поиска путей наращивания больших объемов биомассы корней в направлении увеличения объема сосуда. Возможно, различные манипуляции по модификации условий выращивания (например, обновление среды путем долива свежей порции) позволят добиваться более высоких результатов и двигаться к более масштабному производству биомассы сырья *T. patula* альтернативными биотехнологическими методами.

ЛИТЕРАТУРА

Кузовкина И. Н., Вдовиченко М. Ю. Генетически трансформированные корни как модель изучения физиологических и биохимических процессов корневой системы целого растения // Физиология растений, 2011. – Т. 58, № 5. – С. 787–796.

Кузовкова А. А., Фоменко Т. И., Копач О. В., Чижик О. В., Спиридович Е. В., Решетников В. Н. Культура «бородатых корней» шлемника байкальского – эффективная альтернативная система для получения ценных флавоноидов // Проблемы сохранения биологического разнообразия и использования биологических ресурсов: Матер. III Междунар. науч.-практ. конф., посвященной 110-летию со дня рождения акад. Н. В. Смольского (7–9 октября 2015, Минск, Беларусь). – Минск, 2015. – Ч. 1. – С. 407–411.

Кулуев Б. Р., Вершинина З. Р., Князев А. В., Чемерис Д. А., Баймиев Ан. Х., Чумаков М. И., Баймиев Ал. Х., Чемерис А. В. Косматые корни растений – важный инструментарий для исследователей и мощная фитохимбиофабрика для производителей // Биомика, 2015. – № 2. – С. 70–120.

Луцакивская Ю. С., Олевинская З. М., Кищенко Е. М., Спивак Н. Я., Кучук М. П. Получение культуры «бородатых» корней, каллусных и суспензионных клеточных культур моркови (*Daucus carota* L.), способных экспрессировать человеческий интерферон альфа-2b // Цитология и генетика, 2012. – № 1. – С. 18–26.

Михайлова Е. В., Кулуев Б. Р., Ясыбаева Г. Р., Чемерис 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.

Мусин Х. Г., Якупова А. Б., Михайлова Е. В., Кулуев Б. Р. Особенности роста культур генетически трансформированных (бородатых) корней табака и витании при изменении объема питательной среды // Вестник биотехнологии, 2017. – Т. 13. – № 2. – С. 46–50.

Олина А. В., Соловьева А. И., Соловченко А. Е., Орлова А. В., Степанова А. Ю. Исследование содержания физиологически активных флавонов в культурах *in vitro* шлемника байкальского (*Scutellaria baicalensis* Georgi) // Биотехнология, 2016. – № 3. – С. 29–37.

Эрт А. А., Зибарева Л. Н., Железниченко Т. В., Ковзунова О. В. Культура генетически трансформированных корней (*hairy roots*) *Silene roemerii* Friv. – источник получения фитоэкдистероидов // Вестник Томского государственного университета. Биология, 2017. – № 37. – С. 17–30.

- Эрст А. А., Зибарева Л. Н., Филоненко Е. С., Железниченко Т. В.** Влияние метилжасмоната на биосинтез экдистероидов в культуре *hairy roots Silene linicola* // Химия растительного сырья, 2018. – № 4. – С. 159–167.
- Bychkova O. V., Khlebova L. P., Plyushcheva E. S., Borsukova A. I.** Efficient induction of hairy roots in *Tagetes patula* L. // Ukrainian Journal of Ecology, 2018. – Vol. 8. – No. 4. – P. 450–453.
- Gupta V., Shanker K., Rahman L.** In vitro production of thiophenes using hairy root cultures of *Tagetes erecta* (L.) // African Journal of Biotechnology, 2016. – Vol. 15(17). – P. 706–713.
- Khlebova L. P., Brovko E. S., Bychkova O. V., Pavlova N. V.** Optimization of conditions for the induction of *Tagetes patula* L. hairy roots // Ukrainian Journal of Ecology, 2019. – Vol. 9, No. 3. – P. 415–420.
- Krzyzaniak L. M., Antonelli-Ushirobira T. M., Panizzon G., Sereia A. L., de-Souza J. R. P., Zequi J. A. C., Novello C. R., Lopes G. C., de Medeiros D. C., Silva D. B., Leite-Mello E. V. D., De-Mello J. C. P.** Larvicidal activity against *Aedes aegypti* and chemical characterization of the inflorescences of *Tagetes patula* // Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2017. – Vol. 2017. – P. 1–8.
- Mir R. A., Ahanger M. A., Agarwal R. M.** Marigold: From mandap to medicine and from ornamentation to remediation // American Journal of Plant Sciences, 2019. – Vol. 10. – P. 309–338.
- Murashige T., Skoog F.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiologia Plantarum, 1962. – No. 15. – P. 473–497.
- Politi F. A. S., Queiroz-Fernandes G. M., Rodrigues E. R., Freitas J. A., Pietro R. C. L. R.** Antifungal, antiradical and cytotoxic activities of extractives obtained from *Tagetes patula* L. (Asteraceae), a potential acaricide plant species // Microbial Pathogenesis, 2016. – Vol. 95. – P. 15–20.
- Sevon N., Oksman-Caldentey K. M.** *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation: root cultures as a source of alkaloids // Planta Med, 2012. – Vol. 68. – P. 859–868.
- Taha H. S., Osman H. A., Youssef M. M. A., El-Gind A. M. Y., Ameen H. H., Lashein A. M. S.** Chromatographic analysis of thiophenes in calli and suspension cultures of *Tagetes* spp. // Journal of Life Sciences, 2013. – Vol. 7(5). – P. 483–490.
- Zayed R., Wink M.** Induction of pyridine alkaloid formation in transformed root cultures of *Nicotiana tabacum* // Zeitschrift für Naturforschung, 2009. – Vol. 64(11–12). – P. 869–943.
- Zhou X., Wu Y., Wang X., Liu B., Xu H.** Salidroside production by *hairy roots* of *Rhodiola sachalinensis* obtained after transformation with *Agrobacterium rhizogenes* // Biol. Pharm. Bull., 2007. – Vol. 30. – P. 439–444.