

# Растительная биотехнология – способ рационального использования биосинтетического потенциала

УДК 581.08:573.6

**Резюме.** В статье приведена характеристика растительных биотехнологий, касающихся в основном лекарственных растений. Большое внимание уделено биотехнологиям, которые направлены на формирование коллекций для сохранения и рационального использования биоразнообразия растений, совершенствование селекционного процесса и создания новых форм, а также обеспечение потребностей медицины в возобновляемом фитосырье и биологически активных веществах растительного происхождения.

**Ключевые слова:** растительная биотехнология, коллекции *in vitro*, культура клеток и тканей лекарственных растений, соматоклональная изменчивость, производство биологически активных веществ.

О тличительной чертой современной растительной биотехнологии является то, что большинство ее разделов основаны на использовании объектов *in vitro*. Это могут быть стерильные пробирочные особи, культуры органов, тканей или клеток, а также изолированные протопласты (рис. 1). Растительные биотехнологии можно классифицировать на применяемые для глобальных (экологических) целей, растениеводческие (прежде всего сельскохозяйственные) и промышленные.

Для экологических целей создаются биотехнологические коллекции, благодаря которым

хранятся и реинтродуцируются редкие и исчезающие виды растений, в первую очередь – те, которые плохо размножаются семенами, и лекарственные. Глобальная мировая задача – сохранение биологического разнообразия – решается на стыке биотехнологии и охраны дикой природы. На основе их слияния сформировалась современная наука – биотехнология охраны растений, которая не заменяет классических приемов *ex situ* и *in situ* консервации, а представляет дополнительные приемы, способствующие управлению генетическими ресурсами редких видов, включающие методы культуры тканей, моле-



**Владимир Решетников,**  
завотделом биохимии и биотехнологии растений Центрального ботанического сада НАН Беларуси, академик



**Елена Спиридович,**  
завлабораторией прикладной биохимии ЦБС НАН Беларуси, кандидат биологических наук



**Татьяна Фоменко,**  
завлабораторией клеточной биотехнологии ЦБС НАН Беларуси, кандидат биологических наук



**Александр Носов,**  
завотделом биологии клеток и биотехнологии Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, доктор биологических наук, профессор

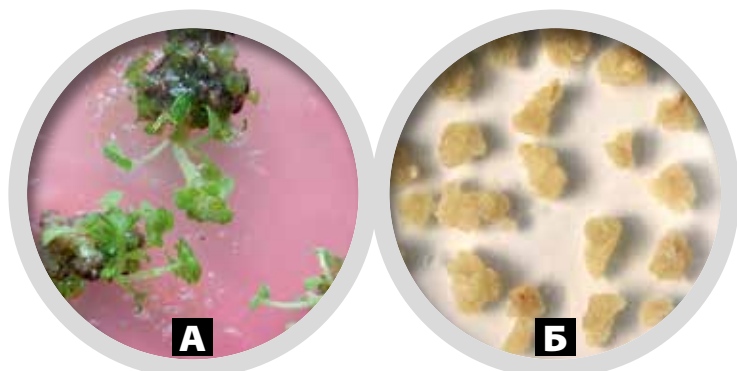


Рис. 1. Культура тканей многоколосника морщинистого *Agastache rugosa* (Fish. Et Mey) Kuntze (А) и расторопши пятнистой (*Silybum marianum* L.) (Б)

кулярно-генетический анализ, создание банков семян, ДНК, криоконсервацию и др.

Растениеводческие биотехнологии отличаются наиболее широким набором объектов – от пробирочных особей до протопластов и направлены на получение новых форм растений и облегчение селекционного процесса, на эффективное размножение и оздоровление ценных генотипов. К первой, более многочисленной, группе относятся биотехнологии выделения гаплоидов и дигаплоидов (андрогенез, гиногенез), получение и культивирование гибридных зародышей (преодоление постгамной и предгамной несовместимости), различные методы клеточной селекции, в том числе с использованием соматической варибельности, соматическая гибридизация и, наконец, генетическая инженерия. Вторая группа представлена разными способами микрочлониального размножения и оздоровления растений.

Промышленные биотехнологии направлены на производство продуктов растительного происхождения с использованием в качестве объектов культур клеток и реже – органов растений (прежде всего корней, в том числе трансформированных).

#### Биотехнологические коллекции растительных объектов

Многие лекарственные растения относятся к редким или исчезающим видам, поэтому биотехнологические коллекции



Рис. 2. Асептические растения расторопши пятнистой (*Silybum marianum* L.) из стерилизованных семян

не только важны для экологических целей (сохранения видов), но и имеют большое экономическое значение. Существуют два принципиально различных подхода к таким коллекциям. Если важно сохранить уникальные генотипы, то нельзя допускать образования популяций клеток *in vitro*, то есть возникновения каллусных культур (иначе за счет соматической варибельности могут потеряться ценные свойства сорта). В этом случае в качестве объектов хранения можно использовать пробирочные особи, органы или ткани растений.

При необходимости сохранения не конкретного генотипа, а генофонда вида возможно консервировать морфогенные или эмбрионные культуры клеток. В качестве примера можно привести криосохранение в коллекции Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН эмбрионных культур клеток эндемичных видов *Dioscorea caucasica* Lipsky и *D. balcanica* Kosanin (диоскореи кавказская и балканская). После криоконсервации культуры полностью сохранили способность к соматическому эмбриогенезу, и из них были получены растения-регенеранты.

В ряде зарубежных стран сформированы и эффективно функционируют коллекции клеток, органов и растений, культивируемых *in vitro*. Кроме того, организованы криобанки, где в жидком азоте поддерживают образцы фитоматериала, принадлежащего к разным систематическим группам. Многие из них относятся к разряду редких и исчезающих растений и сохраняются как национальное достояние.

В США (Корваллис, штат Орегон) функционирует репозиторий, где насчитывается 500 тыс. образцов хозяйственно ценных, а также редких и исчезаю-

щих растений, представляющих 10 тыс. видов. Тут хранится *in vitro* ряд лекарственных растений, например шлемник трех видов: *Scutellaria baicalensis* Georgi, *Scutellaria lateriflora* L., *Scutellaria racemosa* Pers. Из европейских коллекций можно отметить германскую, в которой поддерживают более 700 образцов различных линий клеточных культур, принадлежащих к 80 семействам растений, причем большинство синтезирует фармакологически важные вторичные метаболиты. Подобные репозитории существуют во Франции, Италии, Испании, Бельгии, Польше, Румынии, Японии, Индии и других странах. Российская коллекция клеточных культур, учрежденная в 1978 г., в настоящее время включает два специализированных хранилища – клеток высших растений и генетически трансформированных корней растений, которые насчитывают около 100 различных штаммов и линий культур клеток и находятся в Институте физиологии растений РАН.

В 2005 г. Центральный ботанический сад НАН Беларуси получил Свидетельство Министерства природных ресурсов и охраны окружающей среды Республики Беларусь на коллекцию асептических культур хозяйственно полезных растений. В течение 2011–2012 гг. в ее состав включены лекарственные виды: многоколосник морщинистый (*Agastache rugosa*), кадило сарматское (*Melitis sarmatica*), наперстянка (*Digitalis purpurea*, *D. lanata*, *D. grandiflora*), рута душистая (*Ruta graveolens* L.), шлемник байкальский (*Scutellaria baicalensis* Georgi), синюха голубая (*Polemonium coeruleum* L.), шалфей лекарственный (*Salvia officinalis* L.), воробейник лекарственный (*Lithospermum officinale* L.), стевия (*Stevia rebaudiana* Bertoni),

зверобой кустарниковый (*Hipericum patulum* Hidcote), полынь беловойлочная (*Artemisia hololeuca*), расторопша пятнистая (*Silybum marianum* L.); отдельные виды и сорта сирени (*Syringa* L.), рододендрона (*Rhododendron* L.), голубики (*Vaccinium corymbosum* L.), пальчатокоренника (*Dactylorhiza* Neck.) (рис. 2).

Часто депонирование образцов в репозиториях осуществляется следующим образом: растительный материал помещается в условия, тормозящие рост, деление и метаболизм его клеток, что позволяет реже менять питательные среды и потому существенно сократить затраты на содержание коллекций вегетативно размножаемых растений. Этот прием широко используется во всем мире, поскольку позволяет эффективно сохранять практически все клоны и сорта ценных лекарственных, плодовых, ягодных и декоративных культур.

Чтобы снизить затраты на долговременное содержание коллекций ценного растительного материала и уменьшить вероятность потерь образцов, в странах – членах ФАО, в том числе в России, широко используют криосохранение. Разработаны методы консервации для более чем 200 видов, а именно: для неортодоксальных семян и тканей, культивируемых *in vitro* [1].

### Использование биотехнологических методов для создания новых форм

Уникальный и эффективный способ повышения генетического разнообразия – использовать соматическую вариабельность наряду с андрогенезом, гиногенезом, эмбриокультурой. Известно, что культивирование клеток растений *in vitro* способно вызывать не меньшие перестройки генома,

чем химические мутагены или различные виды излучений. Возникшие мутации сохраняются у регенерированных из этих клеток растений. Для увеличения степени генетического разнообразия можно дополнительно использовать индуцированный мутагенез. Как и этот процесс, соматическая изменчивость не является направленной, и большая часть появляющихся в процессе культивирования вариаций не имеет практического значения. Однако среди соматических (измененных растений-регенерантов) можно выбрать индивиды с полезными признаками. Таким образом были выделены особи сахарного тростника, устойчивые к вирусу Фиджи, желтой пятнистости и ложной мучнистой росе. В Венгрии отобраны соматические клоны пшеницы, обладающие повышенной холодостойкостью. Лекарственные растения-регенеранты с повышенным биосинтезом биологически активных веществ (БАВ) получены на Украине. В отделе биохимии и биотехнологии растений ЦБС НАН Беларуси разработана биотехнологическая схема клеточной селекции многоколосника морщинистого (*Agastache rugosa* (Fisch. et Mey.) Kuntze), получения соматических клонов с повышенным содержанием БАВ (рис. 3). Биохимический анализ выявил высокую активность синтеза фенольных соединений и флавонолов в отобранных регенерантах, с максимальными значениями для соматического клона 11. Разработанная маркерная RAPD+ISSR система дифференцирования генотипов *A. rugosa* позволила оценить дискретность генотипов измененных особей, а также исходной формы и идентифицировать соматический клон 11 как наиболее генетически удаленный от нее [2].

### Быстрое и эффективное размножение ценных генотипов (клональное микроразмножение, КМР)

После отбора удачных генотипов встает проблема их сохранения и активного разведения. На основании изучения экспериментального морфогенеза *in vitro* создана технология КМР растений, которое во многих странах стало уже успешной коммерческой областью сельского хозяйства. КМР можно производить разными способами. Наиболее распространены среди них:

- микрочеренкование пробирочных растений;
- индукция образования микроклубней и микролуковец;
- изоляция почек или меристем с последующим их культивированием на средах с фитогормонами и индукцией побегообразования.

Преимущества новой технологии перед с традиционными методами заключаются в значительно более высоком коэффициенте размножения (до 100 тыс. растений в год в сравнении с 5–100 особями за тот же срок); в миниатюризации процесса, приводящей к экономии площадей, занятых маточными и размножаемыми экземплярами; в разведении и укоренении тех видов, которые совсем не воспроизводятся или плохо воспроизводятся обычным способом.

Принципиально важно, что КМР часто сопровождается оздоровлением особей.



Рис. 3. Многоколосник морщинистый *Agastache rugosa* (Fisch. Et Mey) Kuntze в культуре *in vitro*

Рис. 4. Некоторые этапы микроклонального размножения в культуре *in vitro* и растения *ex situ* сирени сорта Павлинка



Небольшой размер экспланта (части растения, используемой как исходный материал), его поверхностная стерилизация, асептическое культивирование на стерильных питательных средах в условиях, исключающих инфицирование, избавляет полученные особи от нематод и бактериальных патогенов. В сочетании с термо- и химиотерапией этот метод позволяет в значительной степени уничтожить и вирусы, виоиды и микоплазмы. Он широко используется для получения большого количества посадочного материала у лекарственных, декоративных и овощных культур. КМР представляет собой превосходный способ вегетативного размножения ценных гибридов, позволяющий сохранить эффект гетерозиса. В ЦБС разработаны промышленные

технологические линии по разведению методами культуры *in vitro* видов и сортов сирени (*Syringa* L.) (рис. 4), рододендрона (*Rhododendron* L.), голубики (*Vaccinium corymbosum* L.) и др. [3].

### Паспортизация и молекулярная диагностика лекарственных фиторесурсов

При разработке технологий получения медпрепаратов и фармсубстанций растительного происхождения с различным содержанием БАВ стоят задачи строгой стандартизации, контроля качества получаемых продуктов с использованием научно-аналитических подходов и методов. Наряду с важной задачей идентификации принадлежности растения к определенному виду перед учеными стоит вопрос предварительной оценки активных фитохимических веществ в сырье. Идентификация ДНК-маркеров, которые могут выявлять корреляцию между данными ДНК-генотипирования и количеством селективных фитохимических маркеров у определенного вида/сорта/линии растений, становится все более актуальной [4].

В ЦБС для оценки генетического разнообразия популяций, образцов коллекций и сортов проводят генотипи-

рование или генетическую паспортизацию. Это означает, что у каждой особи или формы проверяют наличие или характер проявления множества молекулярно-генетических маркеров. В конечном счете количество анализируемых локусов должно быть настолько велико, чтобы по ним можно было отличить любые образцы в коллекции.

Отделом биохимии и биотехнологии предложен комплексный подход, основанный на ПЦП с использованием произвольных (RAPD) и микросателлитных (ISSR) праймеров для оценки генетического разнообразия, паспортизации сортов хозяйственно ценных и лекарственных ботанических коллекций ЦБС. Разработаны специфические маркеры для формирования уникальных генотипических профилей, на основе которых созданы паспорта ценных сортов следующих коллекций: голубика высокая (*Vaccinium corymbosum* L.) (табл. 1, рис. 5), амарант (*Amaranthus* L.), курильский чай кустарниковый (*Potentilla fruticosa* L.), виды рода сирень (*Syringa* L.) и виды рода пажитник (*Trigonella*), расторопши пятнистой (*Silybum marianum*), многоколосника морщинистого (*Agastache rugosa*) и др. Уникальные наборы ампликонов позволяют дифференцировать генотипы культур (сорта, формы, виды), а эталонные спектры – проводить верификацию образцов коллекций *in vitro* на соответствие генотипу сорта. Сортоспецифические маркеры совместно с детальной характеристикой ряда биохимических параметров предоставляют перспективу поиска доноров ценных аллелей хозяйственно значимых генов, в том числе генов биосинтеза вторичных метаболитов (алкалоидов, фенолов, терпенов и др.).

Таблица 1. Мультилокусные генетические паспорта сортов голубики высокорослой

Красным обозначены сортоспецифические (уникальные) локусы; зеленым – локусы, встречаемые у всех вовлеченных в исследование сортов

Bluecrop	
Праймер	Ампликоны
ОРА-08	ОРА08 <sub>310*</sub> ОРА08 <sub>325*</sub> <b>ОРА08<sub>505*</sub></b> ОРА08 <sub>590*</sub> <b>ОРА08<sub>1075</sub></b>
ОРА-09	ОРА09 <sub>325*</sub> ОРА09 <sub>435*</sub> ОРА09 <sub>475*</sub> <b>ОРА09<sub>650*</sub></b> <b>ОРА09<sub>685*</sub></b> ОРА09 <sub>825*</sub> ОРА09 <sub>1060</sub>
ОРА-20	ОРА20 <sub>310*</sub> ОРА20 <sub>340*</sub> <b>ОРА20<sub>355*</sub></b> ОРА20 <sub>675*</sub> ОРА20 <sub>760*</sub> ОРА20 <sub>985*</sub> <b>ОРА20<sub>1120*</sub></b> ОРА20 <sub>1415</sub>
УВС-818	<b>УВС818<sub>235*</sub></b> <b>УВС818<sub>390*</sub></b> УВС818 <sub>395*</sub> <b>УВС818<sub>465*</sub></b> УВС818 <sub>530*</sub> УВС818 <sub>615*</sub> УВС818 <sub>660*</sub> УВС818 <sub>1210*</sub> УВС818 <sub>1775</sub>
УВС-824	<b>УВС824<sub>525*</sub></b> УВС824 <sub>545*</sub> УВС824 <sub>630*</sub> УВС824 <sub>645*</sub> УВС824 <sub>670*</sub> УВС824 <sub>990*</sub> УВС824 <sub>1655</sub>
Bluetta	
Праймер	Ампликоны
ОРА-08	ОРА08 <sub>310*</sub> ОРА08 <sub>325*</sub> <b>ОРА08<sub>510*</sub></b> ОРА08 <sub>590*</sub> ОРА08 <sub>875*</sub> <b>ОРА08<sub>1075*</sub></b> ОРА08 <sub>1515*</sub> ОРА08 <sub>2205*</sub> ОРА08 <sub>2480</sub>
ОРА-09	<b>ОРА09<sub>310*</sub></b> ОРА09 <sub>325*</sub> ОРА09 <sub>500*</sub> ОРА09 <sub>530*</sub> ОРА09 <sub>565*</sub> ОРА09 <sub>590*</sub> <b>ОРА09<sub>615*</sub></b> <b>ОРА09<sub>650*</sub></b> <b>ОРА09<sub>685*</sub></b> ОРА09 <sub>745*</sub> ОРА09 <sub>860</sub>
ОРА-20	<b>ОРА20<sub>390*</sub></b> ОРА20 <sub>510*</sub> <b>ОРА20<sub>555*</sub></b> ОРА20 <sub>675*</sub> ОРА20 <sub>760*</sub> ОРА20 <sub>820*</sub> ОРА20 <sub>985*</sub> <b>ОРА20<sub>1120*</sub></b> <b>ОРА20<sub>1250</sub></b>
УВС-818	<b>УВС818<sub>310*</sub></b> УВС818 <sub>375*</sub> <b>УВС818<sub>465*</sub></b> УВС818 <sub>550*</sub> УВС818 <sub>570*</sub> УВС818 <sub>130*</sub> УВС818 <sub>880*</sub> УВС818 <sub>960*</sub> УВС818 <sub>1210*</sub> УВС818 <sub>1410</sub>
УВС-824	УВС824 <sub>440*</sub> <b>УВС824<sub>525*</sub></b> УВС824 <sub>670*</sub> УВС824 <sub>815*</sub> УВС824 <sub>990*</sub> УВС824 <sub>1350*</sub> <b>УВС824<sub>1775</sub></b>

## Биотехнологии получения БАВ растительного происхождения

Использование растений и синтезируемых ими БАВ в современной медицине значительно возрастает. При этом наибольший интерес представляют препараты, характеризующиеся противоопухолевой активностью, повышающие продолжительность и качество жизни (адаптогены, биостимуляторы, среди них – иммуностимуляторы), а также кардиологические и противомикробные лекарственные средства. В связи с этим важной задачей становится поиск возобновляемых источников БАВ растительного происхождения. Сбор растений в дикой природе представляет существенную опасность для сохранения видов. Плантационное выращивание часто нерентабельно, большой проблемой при этом является получение исходного посадочного материала, особенно для видов, плохо размножающихся семенами.

Культура клеток высших растений может служить альтернативным способом изготовления фитосырья для медицины, ветеринарии, парфюмерии и пищевой промышленности. Суть его состоит в получении биомассы в стерильных условиях в биореакторах большого объема [5]. Преимущества этого метода достаточно ощутимы. Это практически абсолютная экологическая чистота процесса выращивания культуры клеток; гарантированное получение растительной биомассы с заданными характеристиками независимо от сезона, климатических и погодных условий; высокие скорости ее производства – до 2 г с литра среды за сутки (для сравнения: прирост корня женьшеня на плантации – 1-2 г в год); отсутствие в ней пестицидов, гербицидов, радиоактивных соединений и других поллютантов; возможность использования



стандартного оборудования микробиологических производств (биореакторов, постферментационных систем и др.).

В ряде случаев биомасса клеток *in vitro* превосходит по свойствам полученную от природного или плантационного растения. Культура клеток оказывается незаменимой в случае, когда необходимо произвести сырье редких, исчезающих или тропических видов лекарственных растений. В числе инноваций в биотехнологию следует отметить генетическую трансформацию особей с помощью диких штаммов почвенной бактерии *Agrobacterium rhizogenes* и последующего получения корней, способных к длительному развитию на относительно простых питательных средах, не содержащих ростовых веществ.

Таким образом, в практике создания, поддержания и использования биотехнологических коллекций существуют следующие направления, связанные с получением БАВ: сохранение лекарственных генетических ресурсов путем формирования криобанков и банков депонирования растительного материала *in vitro*; клональное микроразмножение растений (включая соматический эмбриогенез) для развития

селекционных достижений и производства высококачественного посадочного материала; использование культуры растительных клеток и тканей как суперпродуцентов биологически активных веществ; биотехнологии промышленного получения природных фитопрепаратов различного назначения. ■

Статья поступила в редакцию 26.03.2014 г.

Рис. 5. Биотехнологическая схема создания и изучения коллекции

## Summary

The article gives the characteristics of plant biotechnology, mainly concerning medicinal plants. Hallmark of modern plant biotechnology is the use of plant facilities *in vitro*, which are sterile test-tube plants, culture of organs, tissues or plant cells, as well as isolated protoplasts. Based on the final products, the biotechnologies are divided into two groups – technology, the end product of which are intact medicinal plants, and technology, in which the end products are the of biomass cell cultures and/or phytochemicals. The attention is paid to biotechnologies which are directed on creation of *in vitro* collections for preservation and rational use of plant biodiversity, improvement of selection process and creation of new forms, as well as ensuring medicine requirements in renewable plant raw materials and biological active agents.

See: [innosfera.org/2014/05/plant\\_biotech](http://innosfera.org/2014/05/plant_biotech)

## Литература

1. Решетников В.Н., Спиридович Е.В., Носов А.М. Биотехнология растений и перспективы ее развития // Физиология растений и генетика. 2014. Т. 46, №1. С. 3–18.
2. Биохимический и молекулярно-генетический анализ многоколосника морщинистого (*Agastache rugosa* (Fisch. Et. Mey.) Kuntze) в культуре *in vitro* / Е.В. Спиридович, Т.И. Фоменко, А.Б. Власова, Т.В. Мазур, А.Н. Юхимук // Вестник фармации. 2012, №4. С. 75–87.
3. Голубика высокорослая (*Vaccinium corymbosum* L.) / В.Н. Решетников, А.В. Кильчевский, Ж.А. Рупасова, В.Л. Филипеня, О.В. Чижик, В.И. Горбачевич, А.А. Иванович // Генетические основы селекции растений / науч. ред. А.В. Кильчевский, Л.В. Хотылева. – Мн., 2012. Т. 3: Биотехнология в селекции растений. Клеточная инженерия. С. 347–355.
4. Кунах В.А. Биотехнология лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. – Київ, 2005.
5. Носов А.М. Использование клеточных технологий для промышленного получения биологически активных веществ растительного происхождения // Биотехнология. 2010, №5. С. 8–28.