

УДК 581.1

ОСОБЕННОСТИ РОСТА И СОДЕРЖАНИЯ ИНУЛИНА  
В КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУРАХ *Cichorium intybus* L. *in vitro*© 2023 г. Е. А. Калашникова<sup>а</sup>, \*, Р. Н. Киракосян<sup>а</sup>, В. И. Трухачев<sup>а</sup>, М. Г. Панкова<sup>а</sup>, А. В. Сумин<sup>а</sup><sup>а</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования  
“Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева”, Москва, Россия

\*e-mail: kalash0407@mail.ru

Поступила в редакцию 23.12.2022 г.

После доработки 24.01.2023 г.

Принята к публикации 24.01.2023 г.

Получены каллусные культуры *in vitro* цикория обыкновенного (*Cichorium intybus* L.) и исследованы их ростовые и биохимические особенности в зависимости от гормонального состава МС-среды и спектрального состава света. Изучение влияния светокультуры на формирование каллусной ткани и накопление в ней инулина проводили в светонепроницаемых гроутентах с излучением выровненным по плотности потока фотосинтетических фотонов и различным соотношением его уровней в области 660 нм (R – красный) и 730 нм (FR – дальний красный). Контрольный вариант размещали под белыми линейно-люминесцентными лампами. Полученные культуры характеризовались высокой пролиферативной активностью и способностью к морфогенезу. Установлено, что взаимодействие двух факторов – присутствие в составе питательной среды ауксинов (ИУК или НУК в концентрации 7.5 мг/л в сочетании с БАП 0.5 мг/л) и культивирование в условиях светокультуры (FR > R, FR = R, FR < R) – оказало существенное влияние на биосинтетический потенциал культур клеток. В полученных культурах проведено исследование количественного содержания инулина. Показано, что высокое содержание инулина (7.55–7.95%) в каллусных культурах было характерно при выращивании на МС-среде в сочетании с ИУК при режиме освещения FR > R. Вероятно, это обусловлено тем, что именно в этих условиях формировалась хорошо пролиферирующая и высокоморфогенная каллусная ткань. Полученные результаты подтверждают выдвинутую гипотезу о специфичности культивируемых клеток *in vitro* синтезировать и накапливать вторичные метаболиты в дедифференцированных клетках и зависимости этого процесса от факторов химической и физической природы.

**Ключевые слова:** *Cichorium intybus*, гормоны роста, инулин, каллусогенез, спектральный состав света**DOI:** 10.31857/S0015330322600802, **EDN:** PZCOVA

## ВВЕДЕНИЕ

В последнее время уделяется большое внимание развитию фарминдустрии, одним из приоритетных направлений которой является производство качественных лекарственных препаратов. Основное требование, предъявляемое к препаратам – их безопасность и высокая эффективность действия. Источником производства таких препаратов могут служить растительные объекты, в частности, лекарственные растения, позволяющие расширить ассортимент лечебных средств [1–3]. Кроме того, такое производство позволит получать конкурентоспособные импортозамещающие лекарственные препараты, что будет способствовать успешной реализации Государственной программы Российской Федерации “Развитие здравоохранения”. В соответствии с прогнозом ВОЗ, через 15–20 лет доля фитопрепаратов в общем ассортименте лекарственных средств может возрасти до 60% [4].

Данный прогноз объясняется стратегией ВОЗ в области народной медицины 2014–2023 г.

Интерес исследователей к лекарственным растениям постоянно растет, так как они являются источником биологически активных веществ, которые могут широко применяться не только в фарминдустрии, но и в пищевой промышленности. В настоящее время особое внимание уделяется производству продуктов питания диетического и функционального назначения, в состав которых входят, например, пищевые волокна, антиоксиданты, пребиотики и др. [5]. Одним из эффективных пребиотиков является инулин, который содержится в таких растениях как цикорий (*Cichorium intybus* L.), топинамбур (*Helianthus tuberosus* L.), девясил (*Inula helenium* L.) и др. Однако для промышленного производства инулина используют *C. intybus* [6], а основные производители – Германия, Бельгия и Китай. Поэтому необходимо пересмотреть системы управления производством и

получать отечественную конкурентоспособную продукцию высокого качества.

Инулин представляет собой гетерогенный набор полимеров фруктозы. Он состоит из глюкозильных фрагментов и повторяющегося фруктозильного фрагмента, которые связаны между собой  $\beta$ -2,1-связями [7]. Степень полимеризации (DP) стандартного инулина колеблется от 2 до 60 [8, 9]. Из-за наличия  $\beta$ -2,1-связей инулин не расщепляется ферментами пищеварительной системы человека, что способствует его функциональным свойствам: пониженной калорийности и пребиотическим эффектом [10].

Цикорий обыкновенный (*C. intybus* L.) – многолетнее травянистое растение семейства Астровые (Asteraceae), широко распространенное в Азии и Европе [11, 12], используемое в промышленности в качестве сырья для производства инулина и биологически активных соединений. Различные части растения являются источником таких соединений, как алкалоиды, сесквитерпеновые лактоны, кумарины, витамины, ненасыщенные стерины, флавоноиды, сапонины и дубильные вещества [13–16]. Согласно данным Meehуе и Shin (1996) [17], в свежих корнях цикория обычно содержится 68% инулина, 14% сахарозы, 5% целлюлозы, 6% белка, 4% золы и 3% других соединений, в то время как в сушеных корнях цикория содержание инулина возрастает до 98% и только 2% приходится на все остальные соединения. Цикорий традиционно используют для лечения гипертермии различной этиологии, диареи, желтухи и выведения камней из желчного пузыря [18, 19], а также сообщается, что растение обладает мощным гепатопротекторным, антиоксидантным, гипогликемическим, мочегонным, антистекикулярным и иммуномодулирующим действием [20–24]. Кроме того, его корни после обжаривания и измельчения часто используют в качестве заменителя кофе или добавки к кофе, особенно в Средиземноморском регионе Индии и Южной Африке [25].

Применение методов биотехнологии, в частности культуры клеток, органов и тканей высших растений, позволяет не только размножать и получать высококачественный посадочный материал, но и создавать культуры клеток *in vitro* редких, исчезающих и лекарственных растений, с повышенным содержанием целевого вещества [26]. Что касается цикория, то такие исследования *in vitro* малочисленны. Основное внимание уделяется технологии клонального микроразмножения с целью получения растений-регенерантов из различных частей цикория. Так, например, в литературе приводятся данные о зависимости регенерации растений из каллусной ткани, полученной из листовых [27–33] и черешковых [34, 35] эксплантов, от гормонального состава питательной среды. Как правило, в качестве индукторов каллусо-

морфогенеза применяют БАП, ИУК или НУК в различных концентрациях и соотношениях [29–31, 33]. Другим абиотическим фактором, который оказывает влияние на процесс фотосинтеза, развитее и морфогенез растений [36], регулирует первичный и вторичный метаболизм – является свет. Экспериментальные данные ряда авторов показывают зависимость синтеза вторичных метаболитов от спектрального состава света, особенно длинноволновой (красной) области. Что касается цикория, то аналогичные исследования ранее не были проведены.

Цель настоящей работы – получение каллусной культуры *C. intybus* с разной степенью дифференциации (морфогенной и каллусной) и исследование особенностей их роста и накопления инулина в зависимости от гормонального состава питательной среды и условий освещения *in vitro*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

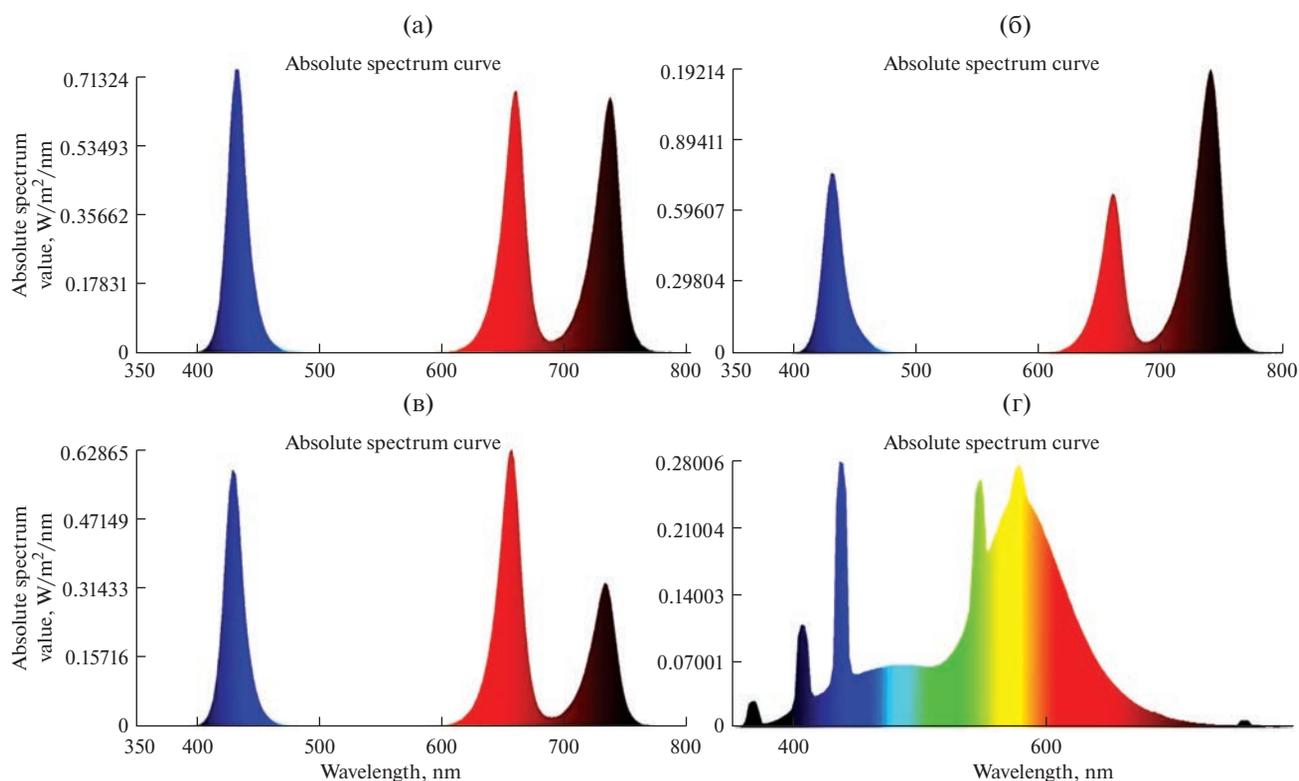
Для получения культуры *in vitro* цикория (*C. intybus* L.) использовали семена элитной репродукции сорта Петровский (урожай 2019 г.), селекции Ростовской опытной станции.

Семена стерилизовали 0.1% раствором  $HgCl_2$  в течение 9 мин, трижды промывали стерильной дистиллированной водой [33] и высевали в чашки Петри диаметром 90 мм на агаризованную МС-среду [37] без добавления регуляторов роста. pH МС-среды доводили до 5.6–5.8 перед автоклавированием. Чашки Петри помещали на стеллажи под белые линейно-люминесцентные лампы (OSRAM AG, Германия) (интенсивность освещения 150 мкмоль/м<sup>2</sup> с) и проращивали при температуре  $23 \pm 1^\circ C$  и 16-часовом световом дне.

В дальнейшем 16-дневные проростки пересаживали в культуральные сосуды объемом 200 мл на МС-среду, дополненную 1.0 мг/л БАП (Merck, Германия) и 0.1 мг/л ИУК (Merck, Германия) для формирования асептических растений с правильной морфологией.

Все работы по стерилизации семян, введению в культуру *in vitro*, по изучению каллусогенеза и морфогенеза проводили в асептических условиях ламинарного бокса (BIOBASE BBS-H1800(X), КНР).

Каллусную ткань получали из листовых эксплантов, изолированных с 30-дневных асептических растений, на МС-среде, дополненной регуляторами роста – БАП (2.0 мг/л) в сочетании с различными ауксинами НУК, ИУК и 2,4-Д (Merck, Германия) в концентрации 5.5–9.5 мг/л. Выращивание каллусной культуры осуществляли в чашках Петри с диаметром 90 мм, при освещении белыми линейнолюминесцентными лампами (OSRAM AG, Германия), (интенсивность освещения 150 мкмоль/м<sup>2</sup> с) и 16-часовом световом дне.



**Рис. 1.** Варианты соотношения R/FR: (а) –  $R = FR$ , (б) –  $R < FR$ , (в) –  $R > FR$ , (г) – контроль (люминесцентные лампы). Спектры излучения получены с помощью прибора PLA-20 (Everfine, КНР).

Каждые 4 недели калусную ткань пересаживали на свежую питательную среду. При этом учитывали структуру и цвет калусной ткани. Интенсивность роста калусной ткани определяли по ее массе (мг). Для этого осуществляли взвешивание ткани в условиях ламинар-бокса в начале и в конце цикла выращивания. Биомассу калусной ткани определяли на аналитических весах (AND GR-202, Япония). На основании полученных результатов вычисляли прирост калусной культуры на 28 суток культивирования ( $G_r$ ) (IV и V циклы выращивания). Для расчетов использовали следующую формулу:  $G_r = X_{\max}/X_0$ , где  $X_{\max}$  и  $X_0$  – максимальное и начальное значения сырой массы калусной ткани.

Изучение влияния светокультуры на формирование калусной ткани и накопление в ней инулина проводили в светонепроницаемых грунтенгах (Urban Grower, Россия) с излучением выровненным по плотности потока фотосинтетических фотонов и различным соотношением его уровней в области 660 нм (R – красный) и 730 нм (FR – дальний красный) ( $FR > R$ ,  $FR = R$ ,  $FR < R$ ). Контрольный вариант размещали под белыми линейно-люминесцентными лампами (OSRAM AG, Германия) (интенсивность освещения  $150 \text{ мкмоль/м}^2 \text{ с}$ ) (рис. 1). Калусную ткань получали из сегментов листьев 30-дневных асептических растений ци-

кория, на агаризованной МС-среде с добавлением 2.0 мг/л БАП в сочетании с 7.5 мг/л НУК или 7.5 мг/л ИУК. Выращивание калусной культуры осуществляли в чашках Петри с диаметром 90 мм, при температуре  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  и 16-часовом световом дне.

Варианты соотношения R/FR:

- (1)  $R/FR = 1$ , плотность потока фотосинтетических фотонов (PPFD) =  $142 \pm 10 \text{ мкмоль/м}^2 \text{ с}$ ;
- (2)  $R/FR = 1/2$ , PPFD =  $142 \pm 10 \text{ мкмоль/м}^2 \text{ с}$ ;
- (3)  $R/FR = 2$ , PPFD =  $142 \pm 10 \text{ мкмоль/м}^2 \text{ с}$ ;
- (4) Контроль: белая линейно-люминесцентная лампа (OSRAM AG, Германия), PPFD  $40 \pm 10 \text{ мкмоль/м}^2 \text{ с}$ .

Спектры излучения измеряли с помощью прибора PLA-20 (Everfine, КНР).

Количественный анализ инулина в калусных культурах определяли методом спектрофотометрии [38]. Анализ проводили на высушенном материале. Биомассу всех полученных культур высушивали в сушильном шкафу при температуре  $50^\circ\text{C}$  в течение 24 ч. Для одного анализа брали сухой образец каллуса в количестве 600 мг, помещали в мерную колбу, заливали 9.5 мл 90% этанола и выдерживали в течение 30 мин на водяной бане (BioSan, Латвия) при температуре  $80^\circ\text{C}$ , периоди-

чески перемешивая его содержимое. В качестве контроля к образцу каллуса добавляли такой же объем воды. После охлаждения в обе колбы (пробную и контрольную) добавляли 0.05 мл 25% раствора NaOH и объем доводили до 10.0 мл этанолом. Содержимое колб оставляли на 10–20 мин, после чего проводили центрифугирование при 4000–6000 об/мин в течение 3–5 мин. После этого брали пустые мерные колбы объемом 10 мл и переносили в них 0.05 мл центрифугата обоих экстрактов (образца и контроля), а также раствора 3.0 мг/мл фруктозы (стандарт) и воды (контроль). На следующем этапе к полученному объему добавляли 1.0 мл реагента (2.0 мг/мл резорцина + 96% этанол и концентрированную соляную кислоту в равных объемах). Колбы выдерживали на водяной бане в течение 35 мин, а затем охлаждали. Объем доводили до 10 мл водой и перемешивали. Оптическую плотность анализируемых образцов и стандартного раствора измеряли на спектрофотометре СФ-104 (Россия) при длине волны 480 нм. Содержание фруктозосодержащих сахаров в образцах рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{A_{pr} C_{st} \times 10}{A_{st} m_{pr}},$$

где  $A_{pr}$  и  $A_{st}$  – оптическая плотность опытного образца и стандартного раствора соответственно;  $C_{st}$  – концентрация стандартного раствора фруктозы (3 мг/мл);  $m_{pr}$  – масса навески анализируемого образца каллуса, г. Результат, полученный для водного экстракта, отражает общее содержание водорастворимых углеводов. Результат для экстракта этанола отражает содержание низкомолекулярных фруктозидов. Разница между этими двумя показателями дает содержание инулина [38].

Определение сырой биомассы каллусных культур проводили в 5 биологических и 2 аналитических повторностях. Количественное определение инулина в каллусной ткани проводили в 2–3 биологических и 2 аналитических повторностях. Средние значения всех данных были рассчитаны с использованием Microsoft Excel 2013 (Microsoft, США). Дисперсионный анализ (ANOVA) проводили в программном обеспечении AGROS (версия 2.11, Россия) и сравнивали средние значения с использованием критерия наименьшей значимой разницы Фишера (LSD) при уровне значимости  $P \leq 0.05$ . На диаграммах и в таблицах представлены средние арифметические значения и их стандартные ошибки.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Первым этапом работ было получение хорошо растущей стерильной культуры *C. intybus*. Применение в качестве стерилизующего агента  $HgCl_2$  в концентрации 0.1% привело к получению 94.7%

стерильных проростков. Семена *C. intybus* проращивали на безгормональной МС-среде в чашках Петри в условиях световой комнаты. Экспериментально установлено, что прорастание семян начиналось на 5 сут, а на 16 сут формировались полноценные проростки. Последующее культивирование на МС-среде, содержащей 1.0 мг/л БАП и 0.1 мг/л ИУК, в культуральных сосудах объемом 200 мл, приводило к появлению первых настоящих листьев, а в базальной части – адвентивных почек, которые в дальнейшем развивались в растения.

Из полученных растений изолировали настоящие листья, которые делили на сегменты  $5 \times 5$  мм и культивировали на МС-среде с БАП (2 мг/л) в сочетании с различными ауксинами (ИУК, НУК, 2,4-Д в концентрации 5.5–9.5 мг/л). В результате проведенных исследований были установлены некоторые закономерности в образовании каллусной культуры цикория. Стоит отметить, что во всех вариантах исследуемых питательных сред пролиферация дедифференцированных клеток происходила на 3–7 сут с начала культивирования в местах среза и поранения листовой пластинки. Установлено, что существенное влияние на интенсивность образования каллусной ткани, ее структуру и цвет оказывали применяемые ауксины.

Культивирование листовых эксплантов на питательной среде, содержащей ИУК в различных концентрациях приводило к формированию каллусной ткани ярко-желтого цвета, средней плотности и с образованием меристематических очагов (рис. 2а). Причем начало каллусогенеза было отмечено уже на 3 сут с начала культивирования. При использовании НУК каллусная ткань имела плотную консистенцию и была белого или светло-желтого цвета (рис. 2б). Начало каллусогенеза отмечено на 5–7 сут. Иная картина наблюдалась при культивировании листовых эксплантов на среде, содержащей 2,4-Д. В этих условиях каллусная ткань формировалась бурого цвета и имела рыхлую консистенцию (рис. 1в). Следует отметить, что в этом варианте интенсивность каллусогенеза была минимальной и в процессе культивирования сформировавшаяся каллусная ткань погибала. Поэтому в дальнейших экспериментах питательные среды с содержанием 2,4-Д не использовали.

Изучение каллусной ткани на временных препаратах позволило установить, что ткань, полученная на питательной среде, содержащей ИУК, состояла из меристемоподобных и паренхимоподобных клеток округлой формы с крупной вакуолью (рис. 2д). В варианте с НУК каллусная ткань состояла из гетерогенных по форме и размеру паренхимоподобных клеток, как правило, вытянутой формы с крупной вакуолью (рис. 2г).

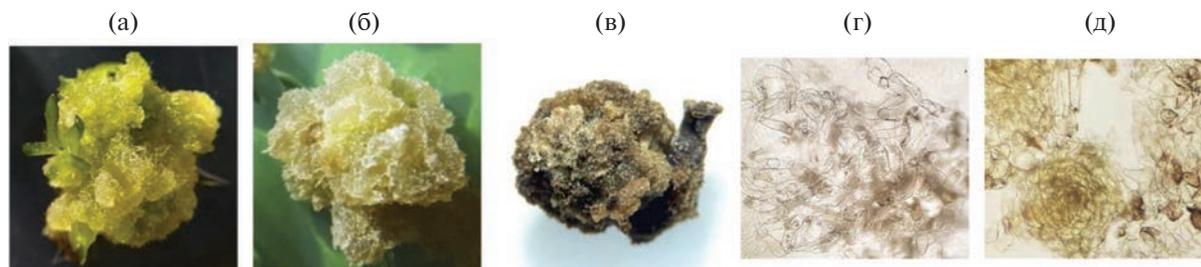


Рис. 2. Каллусная ткань *C. intybus* на МС-средах с ИУК (а, д), НУК (б, г), 2,4-Д (в).

Для характеристики каллусной ткани использовали такой показатель, как прирост, который оценивали на IV и V циклах выращивания. Определяли прирост каллусной ткани в зависимости от исследуемого ауксина и его концентрации (табл. 1).

Наибольший и стабильный прирост каллусной ткани отмечен при добавлении в состав питательной среды НУК в концентрации 8.5 мг/л. В этом варианте в IV и V циклах выращивания прирост каллусной ткани составил 6.28 и 5.96 соответственно, что превышает данный показатель в варианте с ИУК (8.5 мг/л) примерно в 2.0–2.4 раза. Однако следует отметить, что на МС-среде, содержащей НУК, пролиферативная активность дедифференцированных клеток уменьшалась с увеличением числа субкультивирований. Что касается варианта с ИУК, то независимо от числа пересадок и применяемых концентраций наблюдали стабильный прирост каллусных клеток. Кроме того, в этих вариантах в каллусной ткани в конце цикла культивирования было отмечено образование множественных меристематических очагов (рис. 3а), из которых в дальнейшем на безгормональной МС-среде формировались растения-регенеранты (рис. 3б). Следует отметить, что длительное выращивание растений-регенерантов на безгормональной МС-среде приводило к прохождению растениями всех фаз онтогенеза. Об этом свидетельствует образование на растениях цветочных почек с последующим их цветением (рис. 3в).

На основании проведенных исследований установлено, что оптимальной для формирования хорошо пролиферирующей каллусной культуры клеток оказалась МС-среда с 7.5 мг/л НУК или 7.5 мг/л ИУК в сочетании с 2.0 мг/л БАП. Данные варианты питательных сред были использованы в последующих экспериментах по изучению влияния спектрального состава света на морфо- и каллусогенез культуры клеток *C. intybus*.

Проведенные исследования позволили заключить, что для получения хорошо пролиферирующей, не морфогенной каллусной ткани необходимо присутствие в питательной среде НУК, а для получения растений-регенерантов из каллусной ткани – ИУК. Такие растения могут быть включены в селекционный процесс, направленный на отбор новых форм *C. intybus*.

Одним из регуляторных факторов морфо- и каллусогенеза является интенсивность и качество света. В работе было изучено влияние светодиодных ламп красного (R = 660 нм) и дальнего красного спектра (FR = 730 нм) и их соотношений на процесс формирования каллусной ткани, полученной из листовых сегментов микрорастений *C. intybus*. Во всех вариантах питательных сред применяли в качестве ауксина ИУК или НУК в концентрации 7.5 мг/л в сочетании с 2.0 мг/л БАП. Установлено, что световой режим выращивания оказывал влияние на интенсивность роста, структуру и цвет каллусной культуры. Так, при

Таблица 1. Влияние различных концентраций ауксинов на прирост каллусной ткани цикория на IV и V циклах выращивания

№ цикла выращивания	Ауксин	Концентрация ауксина, мг/л				
		5.5	6.5	7.5	8.5	9.5
IV	ИУК	4.08 ± 0.21 <sup>d</sup>	2.92 ± 0.10 <sup>b</sup>	1.88 ± 0.91 <sup>a</sup>	3.16 ± 0.10 <sup>bc</sup>	4.08 ± 0.24 <sup>d</sup>
	НУК	4.12 ± 0.24 <sup>d</sup>	7.24 ± 0.31 <sup>ef</sup>	5.32 ± 0.31 <sup>c</sup>	6.28 ± 0.31 <sup>def</sup>	3.64 ± 0.12 <sup>c</sup>
V	ИУК	4.68 ± 0.28 <sup>cde</sup>	4.36 ± 0.23 <sup>cd</sup>	3.52 ± 0.11 <sup>a</sup>	2.96 ± 0.20 <sup>ab</sup>	4.64 ± 0.22 <sup>cde</sup>
	НУК	3.40 ± 0.11 <sup>a</sup>	4.20 ± 0.22 <sup>c</sup>	5.96 ± 0.28 <sup>def</sup>	5.96 ± 0.27 <sup>def</sup>	4.60 ± 0.24 <sup>cde</sup>

Примечание: Представлены средние арифметические значения (масса свежего каллуса, г) и их стандартные ошибки. В каждом цикле выращивания средние значения, за которыми следует другая латинская буква, значительно отличаются при альфа-уровне 0.05 в соответствии с тестом Фишера на наименьшую значимую разницу (LSD).

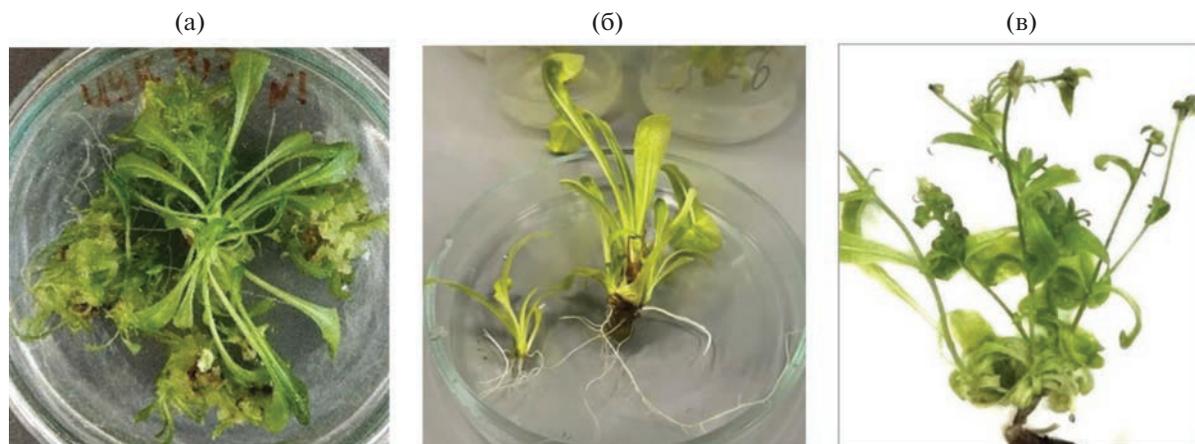


Рис. 3. Морфогенная каллусная ткань *C. intybus* на МС-среде с ИУК (а), растения-регенеранты (б) и их цветение *in vitro* на безгормональной МС-среде (в).

выращивании каллусной ткани в условиях светового режима  $FR > R$  на питательной среде, содержащей НУК, формировалась ткань рыхлого типа, состоящая из сильно вакуолизированных клеток, легко распадающаяся на отдельные клеточные агрегаты. Цвет каллусной ткани был желтым, а к центру появлялась антоциановая окраска (рис. 4а). В случае использования питательной среды с ИУК формировалась каллусная ткань зеленого цвета, плотного типа, с образованием множества меристематических очагов по всей поверхности ткани (рис. 4б).

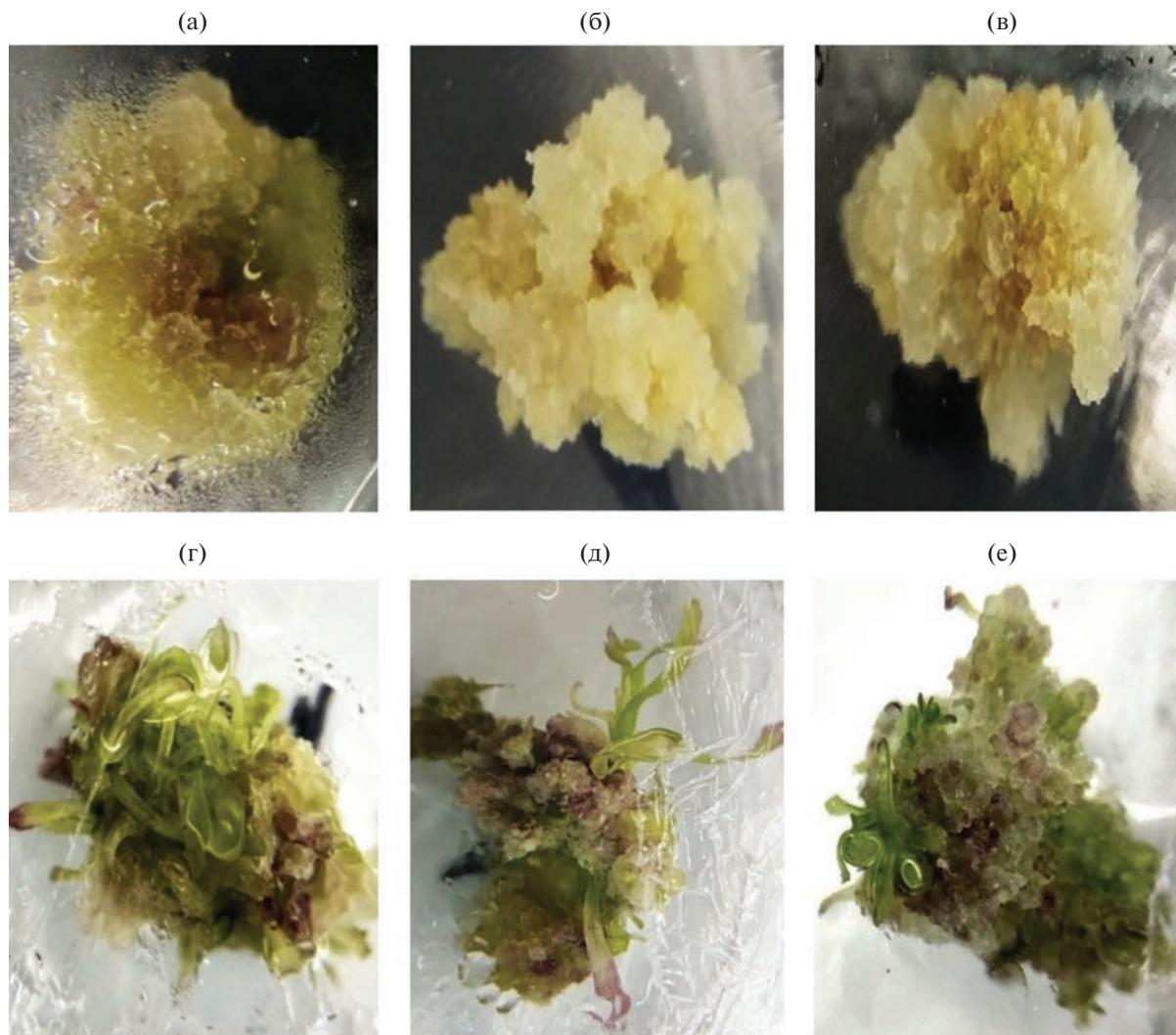
При выращивании каллусной ткани в условиях светового режима  $FR = R$  на питательной среде, содержащей НУК, формировалась ткань рыхлого типа, слабо оводненная, легко распадающаяся на отдельные клеточные агрегаты. Цвет каллусной ткани был светло-желтым или белым без антоциановых участков (рис. 4в). В случае использования питательной среды с ИУК формировалась каллусная ткань светло-зеленого цвета с антоциановой окраской, плотного типа, с образованием множества меристематических очагов по всей поверхности ткани (рис. 4г). Однако сформировавшиеся адвентивные побеги имели ланцетовидную листовую пластинку, что не характерно для растений с нормальной морфологией.

При выращивании каллусной ткани в условиях светового режима  $FR < R$  на питательной среде, содержащей НУК, формировалась ткань рыхлого типа, слабо оводненная, легко распадающаяся на отдельные клеточные агрегаты. Цвет каллусной ткани был светло-желтым или белым без антоциановых участков (рис. 4д). В случае использования питательной среды с ИУК формировалась каллусная ткань ярко-зеленого цвета с антоциановой окраской, средней плотности, с образованием множества меристематических очагов по всей поверхности ткани (рис. 4е). Однако сфор-

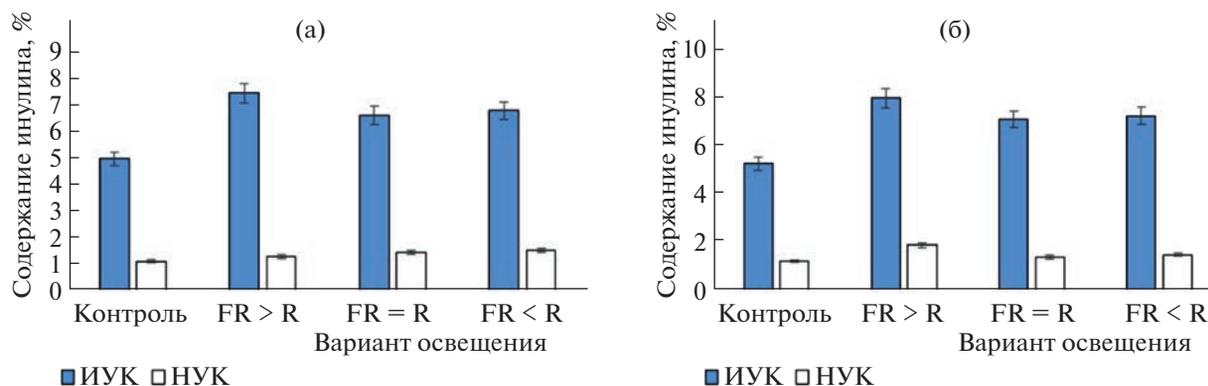
мировавшиеся адвентивные побеги были витрифицированные, что не позволило в дальнейшем получить из них растения-регенеранты.

На втором этапе работы необходимо было изучить влияние гормонального состава питательной среды и светокультуры на накопление инулина в каллусной культуре клеток *C. intybus*. Установлено, что выращивание каллусной ткани в условиях освещения белыми линейно-люминесцентными лампами на МС-среде, содержащей ИУК в концентрации 7.5 мг/л в сочетании с БАП 2.0 мг/л приводило к накоплению инулина в каллусной ткани в 5 раз больше, по сравнению с вариантом питательной среды, в которой присутствовал НУК 7.5 мг/л (рис. 5). Такое соотношение было характерно для IV и V циклов культивирования. Повышенное содержание инулина в каллусе, полученном на агаризованной МС-среде с добавлением ИУК, можно объяснить появлением меристематических очагов. В варианте с НУК формировалась неморфогенная каллусная ткань.

Изучение влияния спектрального состава света на накопление инулина в каллусных клетках цикория выявило четкую зависимость накопления инулина от качества света. Установлено, что увеличение PPFD в среднем на 100 мкмоль/м<sup>2</sup> с во всех вариантах светокультуры ( $PPFD = 142 \pm 10$  мкмоль/м<sup>2</sup> с) приводило к увеличению накопления инулина в среднем на 28% по сравнению с контрольным вариантом (белые линейно-люминесцентные лампы,  $PPFD = 40$  мкмоль/м<sup>2</sup> с). Наибольшую чувствительность к изменению спектрального состава света проявляла каллусная ткань, культивируемая на МС-среде в сочетании с ИУК. Наибольшее количество инулина 7.5–8.0% в сухой биомассе клеток в каллусной ткани было получено при выращивании в условиях  $FR > R$ , что превышает контрольный вариант в среднем



**Рис. 4.** Калусная ткань *C. intybus*, полученная при культивировании на МС-среде с добавлением 2.0 мг/л БАП в сочетании с: (а) – режим  $FR > R$ , 7.5 мг/л НУК; (б) – режим  $FR = R$ , 7.5 мг/л НУК; (в) – режим  $FR < R$ , 7.5 мг/л НУК; (г) – режим  $FR > R$ , 7.5 мг/л ИУК; (д) – режим  $FR = R$ , 7.5 мг/л ИУК; (е) – режим  $FR < R$ , 7.5 мг/л ИУК.



**Рис. 5.** Влияние светокультуры ( $FR > R$ ,  $FR = R$ ,  $FR < R$ ) и регуляторов роста растений (2.0 мг/л БАП в сочетании с 7.5 мг/л НУК) на содержание инулина в каллусе цикория при: (а) – IV цикле выращивания; (б) – V цикле выращивания. Средние значения (процент содержания инулина), за которыми следует другая латинская буква, значительно отличаются при альфа-уровне 0.05 в соответствии с тестом Фишера на наименьшую значимую разницу (LSD). Для каждой процедуры  $n = 150$ .

на 33–50%. Количество инулина в каллусной ткани в вариантах  $FR = R$  и  $FR < R$  не отличалось и составило 6.7–6.9%. Такая закономерность была отмечена на IV и V циклах выращивания (рис. 5).

Выращивание каллусной культуры клеток на МС-среде дополненной 7.5 мг/л НУК в сочетании с 2.0 мг/л БАП и в условиях светокультуры, оказало несущественное влияние на содержание инулина в клетках. Содержание инулина увеличилось в среднем на 16–38% по сравнению с контрольным вариантом. На IV цикле выращивания наибольшее количество инулина было отмечено в варианте  $FR < R$  и превышало контроль в среднем на 38%. В остальных вариантах освещения учитываемый показатель был на уровне контроля (рис. 5а). Значительная разница в содержании инулина в каллусных культурах была отмечена на V цикле выращивания в варианте  $FR > R$  (рис. 5б). В этом варианте содержание инулина превышало контрольный вариант в среднем на 40%. В остальных вариантах ( $FR = R$ ,  $FR < R$ ) существенных различий не обнаружено.

Таким образом, высокая способность каллусных клеток синтезировать и накапливать инулин обусловлена гормональным составом питательной среды и условиями их выращивания. Установлено, что взаимодействие двух факторов – присутствие в составе питательной среды ИУК и спектральный состав света ( $FR > R$ ,  $FR = R$ ,  $FR < R$ ) оказало существенное влияние на биосинтетический потенциал клеточных культур. Вероятно, высокое содержание инулина в каллусных культурах обусловлено тем, что именно в этих условиях формировалась хорошо пролиферирующая и высокоморфогенная каллусная ткань.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Наиболее перспективным направлением для развития пищевой промышленности является производство функциональных и диетических продуктов питания. К таким продуктам относятся продукты, содержащие пищевые волокна, антиоксиданты, пребиотики и т.д. Одним из эффективных пребиотиков является инулин, который содержится в цикории, что определяет важность этой культуры для пищевой и фармацевтической промышленности.

Использование методов биотехнологии не только позволяет размножить и получить высококачественный посадочный материал, но и создавать *in vitro* культуры клеток лекарственных растений с повышенным содержанием биологически активных веществ [26]. Биосинтетический потенциал культивируемых клеток зависит от минерального состава питательной среды, а также факторов физической (интенсивность света, спектральный состав света) и химической (экзогенное содержа-

ние гормонов в питательной среде) природы. Изменение каждого из этих факторов может привести к регуляции биосинтетического потенциала культивируемых клеток *in vitro* [36].

Большинство данных указывает на то, что оптимальным эксплантом для получения каллусной культуры клеток и растений-регенерантов цикория являются листовые эксплантаты, а наилучшие гормоны – это сочетание БАП с ИУК или НУК в разных концентрациях [29–31, 33]. Результаты наших исследований подтверждают данные других авторов. Следует отметить, что оптимальными условиями для индукции морфо- и каллусогенеза было присутствие в МС-среде ИУК или НУК концентрации 7.5 мг/л в сочетании с БАП 2.0 мг/л. Применение 2,4-Д ни в одном из исследуемых вариантов не приводило к образованию хорошо пролиферирующей каллусной ткани. Известно, что морфогенетический потенциал культивируемых клеток *in vitro* зависит от применяемого гормона, его природы и концентрации. Нами показано, что использование ИУК или НУК приводило к формированию морфогенной и неморфогенной каллусной ткани соответственно. Кроме того, нами установлены различия по влиянию изученных ауксинов на содержание инулина в каллусных культурах. Связь биосинтетического потенциала с дифференцировкой дедифференцированных клеток подчеркнута результатами целого ряда исследований, проведенных с различными видами культур *in vitro*. Наши исследования показали, что на среде с ИУК количество инулина в каллусной ткани больше, по сравнению с вариантом среды с НУК. Аналогичные результаты были получены и другими авторами [39]. В нашем случае можно предположить, что высокое содержание инулина в каллусе на МС-среде с ИУК обусловлено образованием меристематических очагов по всей поверхности каллуса. По мнению ряда авторов именно в дифференцированных клетках синтезируется биологически активные вещества больше, чем в дедифференцированных клетках [32, 33, 36, 39].

Хорошо известно, что важным фактором, оказывающим влияние на рост, развитие и продуктивность растений, является интенсивность и спектральный состав света. В условиях недостаточного поступления солнечного света нарушается процесс фотосинтеза, а также снижаются продуктивность и устойчивость растений к неблагоприятным факторам окружающей среды [40]. В литературе имеются многочисленные работы, посвященные изучению влияния спектрального состава света и его интенсивности на морфофизиологические процессы растений *in vitro* и *in vivo* [27, 28, 30, 32, 36]. В своих исследованиях Shulgina с соавт. показали, что выращивание клеточных культур в условиях светокультуры, с использованием красного света, приводит к интенсивному росту побегов и корней

микрорастений *in vitro*, по сравнению с культивированием их в условиях белого и синего света [36]. Кроме того, показано, что красный свет усиливает синтез углеводов в листьях, в то время как синий свет усиливает синтез белков [36]. Наши исследования показали, что использование различных условий освещения ( $FR > R$ ,  $FR = R$ ,  $FR < R$ ) оказывает значительное стимулирующее действие на накопление инулина в каллусе. Более того, максимальное значение инулина (7.5–8.0% к сухой биомассе клеток) было получено в морфогенной каллусной ткани, культивируемой на МС-среде, содержащей 7.5 мг/л ИУК в сочетании с 2.0 мг/л БАП при режиме освещения  $FR > R$ . В случае использования питательной среды с НУК (7.5 мг/л) наилучшие результаты по содержанию инулина в дедифференцированных клетках было так же получено в варианте освещения  $FR > R$ .

Результаты исследования подтверждают выдвинутую разными авторами гипотезу о специфичности культивируемых клеток *in vitro* синтезировать и накапливать вторичные метаболиты в дедифференцируемых клетках, и зависимости этого процесса от факторов химической и физической природы. Однако механизмы, лежащие в основе закономерностей синтеза и накопления инулина в клеточных культурах *C. intybus*, требуют дальнейшего изучения.

Работа выполнена в рамках тематического плана-задания на выполнение научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева» по заказу Минсельхоза России за счет средств федерального бюджета в 2023 году.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая работа не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. McClelland J.W., Allen J.C., Zakir S. Bio-medicinal effect of sweet potato in people with diabetes // J. Am. Diet. Assoc. 2007. V. 8. A104. <https://doi.org/10.1016/j.jada.2007.05.396>
2. Ikanone C.E.O., Oyekan P.O. Effect of boiling and frying on the total carbohydrate, vitamin C and mineral contents of Irish (*Solanum tuberosum*) and Sweet (*Ipomoea batatas*) potato tubers // Niger. Food J. 2014. V. 32. P. 33. [https://doi.org/10.1016/S0189-7241\(15\)30115-6](https://doi.org/10.1016/S0189-7241(15)30115-6)
3. Mohammad K.A. A comprehensive review of sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam): revisiting the associated health benefits // Trends Food Sci. Technol. 2021. V. 115. P. 512. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.07.001>
4. World Health Organization. WHO traditional medicine strategy: 2014–2023. World Health Organization. 2013.
5. Tutelyan V.A., Sukhanov B.P., Kochetkova A.A., Shevelova S.A., Smirnova E.A. Russian regulations on nutraceuticals, functional foods, and foods for special dietary uses // Nutraceutical and functional food regulations in the United States and around the world / Ed. D. Bagchi. Academic Press. 2019. P. 399. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816467-9.00026-5>
6. Roberfroid M. Inulin-type fructans: functional food ingredients // J. Nutr. 2007. V. 137. 2493S–2502S. <https://doi.org/10.1201/9780203504932>
7. Barclay T., Ginic-Markovic M., Cooper P., Petrovsky N. Inulin - a versatile polysaccharide with multiple pharmaceutical and food chemical uses // J. Excip. Food Chem. 2016. V. 1. P. 1132.
8. Kathy R.N. Inulin and oligofructose: what are they? // J. Nutr. 1999. V. 129. 1402S–1406S. <https://doi.org/10.1093/jn/129.7.1402S>
9. Kalyani N.K., Kharb S., Thompkinson D.K. Inulin dietary fiber with functional and health attributes – a review // Food Rev. Int. 2010. V. 26. P. 189. [10.1080/87559121003590664](https://doi.org/10.1080/87559121003590664)
10. Boeckner L.S., Marilyn I.S., Bryan C.T. Inulin: a review of nutritional and health implications // Adv. Food Nutr. Res. 2001. V. 43. P. 1. [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(01\)43002-6](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(01)43002-6)
11. Bais H.P., Ravishankar G.A. *Cichorium intybus* L. cultivation, processing, utility, value addition and biotechnology, with an emphasis on current status and future prospects // J. Sci. Food Agric. 2001. V. 81. P. 467. <https://doi.org/10.1002/jfsa.817>
12. Abbas Z.K., Saggi S., Sakeran M.I., Zidan N., Rehman H., Ansari A.A. Phytochemical, antioxidant and mineral composition of hydroalcoholic extract of chicory (*Cichorium intybus* L.) leaves // Saudi J. Biol. Sci. 2015. V. 22. P. 322. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.11.015>
13. Molan A.L., Duncan A.J., Barry T.N., McNabb W.C. Effect of condensed tannins and sesquiterpene lactones extracted from chicory on the motility of larvae of deer lungworm and gastrointestinal nematodes // Parasitol. Int. 2003. V. 52. P. 209. [https://doi.org/10.1016/S1383-5769\(03\)00011-4](https://doi.org/10.1016/S1383-5769(03)00011-4)
14. Nandagopal S., Ranjitha B.D. Phytochemical and antibacterial studies of chicory (*Cichorium intybus* L.) – a multipurpose medicinal plant // Adv. Biol. Res. 2007. V. 1. P. 17. [https://doi.org/10.1016/S1383-5769\(03\)00011-4](https://doi.org/10.1016/S1383-5769(03)00011-4)
15. Muthusamy V.S., Anand S., Sangeetha K.N., Sujatha S., Arun B., Lakshmi B.S. Tannins present in *Cichorium intybus* enhance glucose uptake and inhibit adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes through PTP1B inhibition // Chem.-Biol. Interact. 2008. 174 (1). P. 69. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.04.016>
16. Atta A.H., Elkoly T.A., Mouneir S.M., Kamel G., Awabel N.A., Zaher S. Hepatoprotective effect of methanolic extracts of *Zingiber officinale* and *Cichorium intybus* // Indian J. Pharm. Sci. 2010. V. 72. P. 564. <https://doi.org/10.4103/0250-474X.78521>
17. Meehye K., Shin H.K. The water-soluble extract of chicory reduces glucose uptake from the perfused jejunum in rats // J. Nutr. 1996. V. 126. P. 2236. <https://doi.org/10.1093/jn/126.9.2236>

18. Afzal S., Afza N., Awan M.R., Khan T.S., Gilani A., Khanum R., Tariq S. Ethno-botanical studies from Northern Pakistan // J. Ayub. Med. Coll. Abbotabad. 2009. V. 21. P. 52.
19. Abbasi A.M., Khan M.A., Ahmad M., Zafar M., Khan H., Muhammad N., Sultana S. Medicinal plants used for the treatment of jaundice and hepatitis based on socio-economic documentation // Afr. J. Biotechnol. 2009. V. 8. P. 1643.
20. Jamshidzadeha A., Khoshnood M.J., Dehghani Z., Niknahad H. Hepatoprotective activity of *Cichorium intybus* L. leaves extract against carbon tetrachloride induced toxicity // Iran. J. Pharm. Res. 2006. V. 1. P. 41. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2010.651>
21. Hassan H.A. The prophylactic role of some edible wild plants against nitrosamine precursor's experimentally-induced testicular toxicity in male albino rats // J. Egypt. Soc. Toxicol. 2008. V. 38. P. 1.
22. Nayeemunnisa A. Alloxan diabetes-induced oxidative stress and impairment of oxidative defense system in rat brain: neuroprotective effects of *Cichorium intybus* L. // Int. J. Diabetes Metabol. 2009. V. 17. P. 105. <https://doi.org/10.1159/000497681>
23. Mulabagal V., Wang H., Ngouajio M., Nair M.G. Characterization and quantification of health beneficial anthocyanins in leaf chicory (*Cichorium intybus*) varieties // Eur. Food Res. Technol. 2009. V. 230. P. 47. <https://doi.org/10.1007/s00217-009-1144-7>
24. Hassan H.A., Yousef M.I. Ameliorating effect of chicory (*Cichorium intybus* L.) -supplemented diet against nitrosamine precursors-induced liver injury and oxidative stress in male rats // Food Chem. Toxicol. 2010. V. 48. P. 2163. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.05.023>
25. Taylor R.L. Weeds of Roadsides and Waste Ground in New Zealand. The Caxton Press: Christchurch, New Zealand. 1981. P. 177.
26. Parsons J.L., Cameron S.I., Harris C.S., Smith M.L. Echinacea biotechnology: advances, commercialization and future considerations // Pharm. Biol. 2018. V. 56. P. 485. <https://doi.org/10.1080/13880209.2018.1501583>
27. Toponi M. Action combining kinetin and acid Indole acetic on the neof ormation of organs by fragments of leaves of endive (*Cichorium intybus* L) grown *in vitro* // C.R. Acad. Sci. Paris. 1963. V. 257. P. 3030.
28. Park E., Lim H. Establishment of an efficient *in vitro* plant regeneration system in Chicory (*Cichorium intybus* L) // Acta Hort. 1999. V. 483. P. 367. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1999.483.42>
29. Velayutham P., Kumari B.D., Baskaran P. An efficient *in vitro* plant regeneration system for *Cichorium intybus* L. – an important medicinal plant // J. Agric. Technol. 2006. V. 2. P. 287.
30. Rehman R.U., Israr M., Srivastava P.S., Bansal K.C., Abdin M.Z. *In vitro* regeneration of witloof chicory (*Cichorium intybus* L.) on leaf explants and accumulation of esculin // In Vitro Cell Dev. Biol. 2003. V. 39. P. 142. <https://doi.org/10.1079/IVP2002381>
31. Yucesan B., Turker A.U., Gurel E. TDZ-induced high frequency plant regeneration through multiple shoot formation in witloof chicory (*Cichorium intybus* L.) // Plant Cell Tissue Organ Cult. 2007. V. 91. P. 243. <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9290-8>
32. Ohadi Rafsanjani S.M., Alvari A., Mohammad A.Z., Abdin M., A Hejazi M. *In vitro* propagation of *Cichorium intybus* L. and quantification of enhanced secondary metabolite (esculin) // Recent Pat. Biotechnol. 2011. V. 5. P. 227. <https://doi.org/10.2174/187220811797579123>
33. Dakshayini K., Rao C.V., Karun A., Bhavyashree U., Ujwal P. High-frequency plant regeneration and histological analysis of callus in *Cichorium intybus*: an important medicinal plant // J. Phytol. 2016. V. 8. P. 7. <https://doi.org/10.19071/jp.2016.v8.2980>
34. Wagner G.M., Eneva T. Positive effect of cefotaxime on plant regeneration from *Cichorium intybus* L. leaf material // Landbauforschung Voelkenrode. 1996. V. 46. P. 166.
35. Cadalen T., Morchen M., Blassiau C. Development of SSR markers and construction of a consensus genetic map for chicory (*Cichorium intybus* L.). // Mol. Breed. 2010. V. 25. P. 699. <https://doi.org/10.1007/s11032-009-9369-5>
36. Shulgina A.A., Kalashnikova E.A., Tarakanov I.G., Kirakosyan R.N., Cherednichenko M.Y., Polivanova O.B., Baranova E.N., Khaliluev M.R. Influence of light conditions and medium composition on morphophysiological characteristics of *Stevia rebaudiana* Bertoni *in vitro* and *in vivo* // Horticulturae. 2021. V. 7. P. 195. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7070195>
37. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. V. 15. P. 473. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
38. Касьян И.Г., Касьян А.К. Оптимизация спектрофотометрического способа определения инулина в клубнях топинамбура (*Helianthus tuberosus* L.) // Седьмая Международная научно-практическая конференция Лекарственное растениеводство: от опыта прошлого к современным технологиям. Кишинев, 2019. С. 121.
39. Rnjitha Kumari B.D., Velautham P., Anitha S. A comparative study on inulin and esculin content of *in vitro* and *in vivo* plants of chicory (*Cichorium intybus* L. Cv. Lucknow local) // Adv. Biol. Res. 2007. V. 1. P. 22.
40. Velayutham P., Ranjitha Kumari B.D. Influence of photoperiod on *in vitro* flowering in *Cichorium intybus* L. // Indian J. Plant Physiol. 2003. V. 218. P. 90.