

ОТБОР В АКСЕНИЧЕСКОЙ КУЛЬТУРЕ, ИЗОЛЯЦИЯ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ УСТОЙЧИВОЙ АЛКАЛОИД-ПРОДУЦИРУЮЩЕЙ ФОРМЫ МИЦЕЛИЯ СПОРЫНЬИ *CLAVICEPS PURPUREA*

Волнин Андрей Александрович, Цыбулько Наталья Степановна

Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (ВИЛАР)

Аннотация. Представлены результаты отбора в аксенической культуре двух новых линий спорыньи пурпурной (эрготоксиновая А-6-С, эрготоксиновая ВКМ- F-2450-D-С), способных продуцировать эргокриптин в условиях *in vitro* культивирования на твердой питательной среде.

Ключевые слова: спорынья, эргоалкалоиды, *Claviceps purpurea*, эргокриптин, мицелий.

Введение. Спорынья является крайне важным источником биологически активных веществ, используемых для производства лекарственных препаратов.

В настоящее время производство алкалоидов спорыньи с различной фармакологической активностью основано преимущественно на жидкостной ферментации с использованием сапрофитных культур (Wong G., 2022; Chen J., 2017). Приблизительно 60 % промышленно получаемых эргоалкалоидов производятся методом глубинного (погружного) культивирования специально разработанных мутантных или рекомбинантных штаммов спорыньи или организмов-гетерологов на жидких питательных средах, а остальные 40% получают при выращивании в поле (Wong G., 2022; Hulvová H., 2013; Yao Y., 2022).

Целью данной работы была селекция по признакам морфологии в аксенической культуре, изоляция и культивирование устойчивой алкалоид-продуцирующей формы мицелия спорыньи *Claviceps purpurea*.

Материалы и методы. Биологический материал в виде зрелых склероциев *Claviceps purpurea* (Fries) Tulasne был получен в рамках поддержания коллекции паразитарных штаммов спорыньи ФГБНУ ВИЛАР, растение носитель – озимая посевная рожь сорта Московская- 12. Использовались следующие штаммы спорыньи: эрготоксиновый А-6, эрготоксиновый ВКМ- F-2450-D. Склероции высаживали на твердую агаризованную питательную среду (модифицированная среда Мурасиге- Скуга) и культивировали в течение 30 дней (15 дней в термостате при температуре 26⁰ С, 15 дней в холодильнике при температуре 4⁰ С). Мицелий с пигментированной пурпурной морфологией изолировали и субкультивировали в тех же условиях, устойчивость морфологии мицелия полученных изолятов оценивали как способность продуцировать эргоалкалоиды в течение 3

последующих циклов пересадок и субкультивирования. Для качественного определения алкалоидов использовали тонкослойную хроматографию (ТСХ) на пластинах Silica gel 60 (Merck, Германия), состав элюента – хлористый метилен: диоксан: этанол: аммиак (36:3:1:0,3). УФ- камера была настроена на длину волны 365 нм.

Результаты и их обсуждение. При проведении культивирования в аксенической культуре на агаризованной питательной среде склероциев, полученных от двух паразитарных штаммов- продуцентов эргоалкалоидов (эрготоксиновый А-6, эрготоксиновый ВКМ- F-2450-D) методом морфологического отбора по признаку пурпурной пигментации были выделены и изолированы 2 линии, способные продуцировать α - эргокриптин и β - эргокриптин в условиях *in vitro* культивирования на твердой питательной среде. Наличие α - эргокриптина и β - эргокриптина в образцах мицелия двух новых линий (эрготоксиновая А-6-С, Б – эрготоксиновая ВКМ- F-2450-D-С) на 30-й день культивирования было качественно подтверждено методом ТСХ (тонкослойная хроматография). Результаты представлены на рисунке 1. Профили алкалоидов в образцах мицелия двух новых линий- продуцентов эргокриптинов (эрготоксиновая А-6-С, эрготоксиновая ВКМ- F-2450-D-С) на 30-й день культивирования соответствовали профилям алкалоидов, содержащихся в склероциях паразитарной культуры спорыньи данных штаммов (рисунок 1).

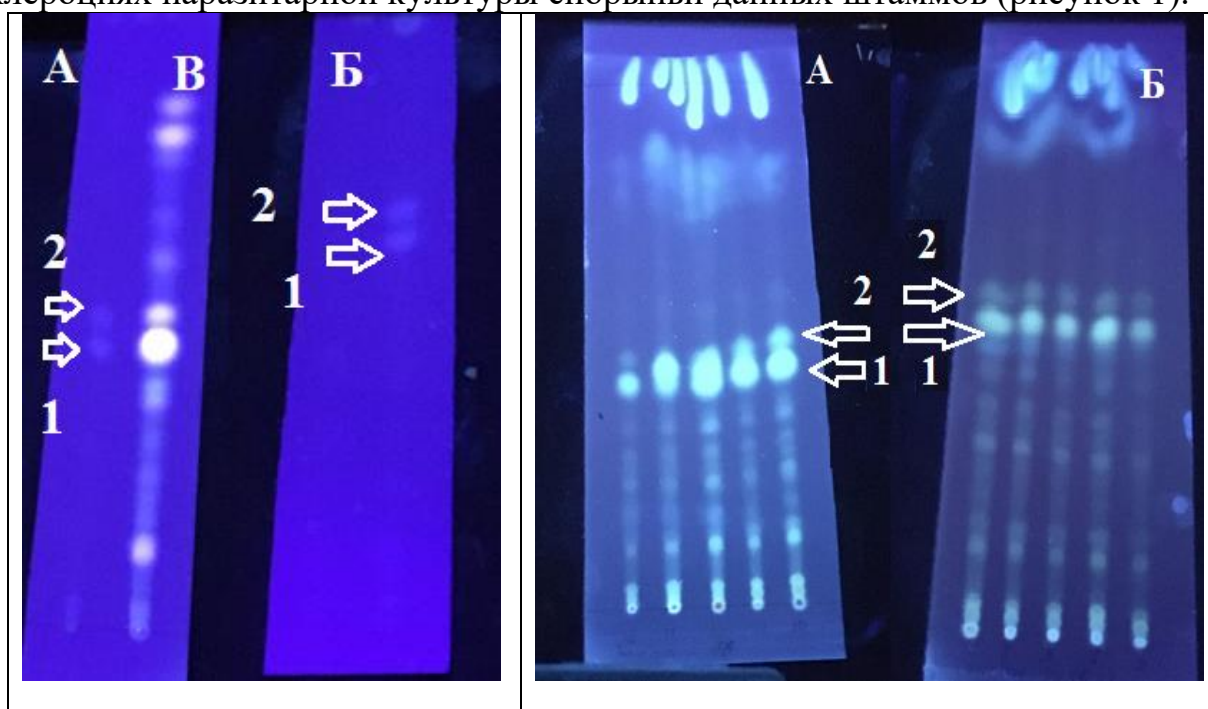


Рисунок 1. Результаты качественного ТСХ- анализа мицелия двух линий- продуцентов эргоалкалоидов на 30-й день культивирования. Примечание: левая часть изображения – *in vitro* культуры; правая часть изображения – паразитарные культуры; А – эрготоксиновый А-6; Б – эрготоксиновый ВКМ- F-2450-D; В – стандартный образец; 1 – сумма эргокорнина и α - эргокриптина; 2 – β - эргокриптин

Помимо α - эргокриптина и β - эргокриптина, паразитарные культуры продуцировали эргокорнин, который не разделялся методом ТСХ от α - эргокриптина (на хроматограммах представлен в виде суммы эргокорнина и α - эргокриптина).

В условиях *in vitro* выполнена оценка устойчивости полученных изолятов алкалоид- синтезирующего мицелия. При культивировании на твердой питательной среде полученные линии сохраняли пигментированную пурпурную морфологию мицелия и способность продуцировать α - эргокриптин и β - эргокриптин при трех и более последовательных пересадках (при 30- дневном культивировании) и могут считаться устойчивыми. На 15 день культивирования на твердой питательной среде с появлением ярко- выраженной пурпурной пигментации мицелия ТСХ- профили культуральных экстрактов не содержали целевых алкалоидов (что выражалось отсутствием флуоресценции на хроматограммах), в отличие от культуральных экстрактов, полученных из 30- дневных культур. Это согласуется с литературными данными, показывающими, что выраженная пурпурная пигментация в аксенической культуре является условным морфологическим признаком, свидетельствующем о биосинтезе ключевых промежуточных продуктов (D- лизергиновая кислота и ее амиды), являющихся предшественниками биосинтеза пептидных алкалоидов (эргокриптинов). Для культивирования спорыньи крайне важное значение имеет чередование паразитарной стадии жизненного цикла и аксенической культуры (пересев склероция на питательную среду *in vitro* с возможностью получения сапрофитного мицелия со «склероциеподобной» морфологией и пурпурной пигментацией) [Mantle P., 2020]. Морфологический отбор в аксенической культуре позволяет получить плектенхиматическую форму мицелия, напоминающую раннюю склероциальную стадию инфицирования ржи, и продуцирующую лизергиновую кислоту и пептидные алкалоиды в условиях погружного культивирования [Mantle P., 2020].

Выводы. Методом морфологического отбора в аксенической культуре по признаку пурпурной пигментации были выделены и изолированы 2 линии (эрготоксиновая А-6-С, эрготоксиновая ВКМ- F-2450-D-С), способные продуцировать эргокриптин в условиях *in vitro* культивирования на твердой питательной среде.

Финансирование. Работа выполнена в рамках темы НИР ФГБНУ ВИЛАР «Формирование, сохранение и изучение биокolleкций генофонда различного направления с целью сохранения биоразнообразия и использования их в технологиях здоровьесбережения» (FGUU-2022-0014).

Библиографический список

1. Mantle P. Comparative Ergot Alkaloid Elaboration by Selected Plectenchymatic Mycelia of *Claviceps purpurea* through Sequential Cycles of Axenic Culture and Plant Parasitism. *Biology (Basel)*, 2020, 9(3): 41 (doi: 10.3390/biology9030041).
2. Wong G., Lim L.R., Tan Y.Q., Go M.K., Bell D.J., Freemont P.S., Yew W.S. Reconstituting the complete biosynthesis of D-lysergic acid in yeast. *Nature Communication*, 2022, 13(1): 712 (<https://doi.org/10.1038/s41467-022-28386-6>).
3. Chen J., Han M., Gong T., Yang J., Zhu P. Recent progress in ergot alkaloid research. *RSC Advances*, 2017, 7(44): 27384-27396 (doi: 10.1039/C7RA03152A).

4. Hulvová H., Galuszka P., Frébortová J., Frébort I. Parasitic fungus *Claviceps* as a source for biotechnological production of ergot alkaloids. *Biotechnology Advances*, 2013, 31(1): 79-89 (doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.01.005).
5. Yao Y., Wang W., Shi W., Yan R., Zhang J., Wei G., Liu L., Che Y., An C., Gao S., Overproduction of medicinal ergot alkaloids based on a fungal platform. *Metabolic Engineering*, 2022, 69: 198-208 (<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2021.12.002>).
6. Растениеводство и луговое хозяйство : сборник статей Всероссийской научной конференции с международным участием, Москва, 18–19 октября 2020 года. – Москва: ЭЙПиСиПублишинг, 2020. – 838 с. – ISBN 978-5-6042131-8-6. – DOI 10.26897/978-5-6042131-8-6. – EDN RSQCUH.
7. Вклад студентов в развитие аграрной науки : Сборник статей студенческой научно-практической конференции, Москва, 31 октября 2018 года. – Москва: Российский государственный аграрный университет - МСХА им. К.А. Тимирязева, 2018. – 134 с. – ISBN 978-5-9675-1702-0. – EDN YTLELB.
8. Вклад студентов в развитие аграрной науки : Сборник статей студенческой научно-практической конференции, Москва, 30 октября 2019 года. – Москва: Редакция журнала "Механизация и электрификация сельского хозяйства", 2019. – 170 с. – EDN WFMJGQ.