

УДК 581.1

ПРИМЕНЕНИЕ *in silico* АНАЛИЗА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОРФОГЕНЕЗА В КУЛЬТУРЕ РАСТИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ© 2023 г. К. В. Малахова^а, Д. Н. Зонтиков^а, А. И. Щербакова^б, Р. В. Сергеев^{б, *}^аКостромской государственной университет, Кострома, Россия^бПоволжский государственный технологический университет, Йошкар-Ола, Россия

*e-mail: sergeevphd@yandex.ru

Поступила в редакцию 23.12.2021 г.

После доработки 12.10.2023 г.

Принята к публикации 19.10.2023 г.

В работе предложен и апробирован новый подход оптимизации биотехнологических процессов, в том числе процесса микроклонального размножения. Предлагаемый метод основан на построении карты подобия структур молекул вторичных метаболитов растительных экстрактов и молекул – регуляторов процессов морфогенеза растений (прежде всего фитогормонов) с последующим прогнозированием действия экстракта. В качестве примера был использован экстракт лишайника *Cetraria islandica* (L.) Ach. (Parmeliaceae), для которого хорошо известен спектр содержащихся вторичных метаболитов. Выявлено структурное сходство алифатических вторичных соединений лишайника (протолихестериновая и лихестериновая кислоты) со стриголактонами (в большей степени), а также с гиббереллинами и brassinosterоидами. На основе анализа полученных результатов был сделан прогноз о дозозависимом воздействии экстракта лишайника *C. islandica* на ростовые процессы и ризогенез микропобегов *in vitro*. Эта гипотеза была экспериментально проверена в экспериментах при микроклональном размножении высших растений *Lonicera caerulea* L. и *Populus tremula* L. В результате проведенных работ установлено, что добавление экстракта из *C. islandica* в концентрации 10–50 мг/л в состав питательной среды увеличивало коэффициент размножения *L. caerulea* (на 31%) и *P. tremula* (на 8%). Экспериментально доказана ризогенная активность экстракта лишайника в тех же концентрациях (10–50 мг/л среды), схожая с активностью стриголактонов и гиббереллинов. Также показано положительное влияние экстракта *C. islandica* (50 мг/л) на элонгацию микропобегов обеих культур и геммогенез *P. tremula*. Предложенный подход позволяет оптимизировать исследования, направленные на выявление эффекта различных экстрактов на морфогенез растений *in vitro* путем предварительного построения карты подобия содержащихся в экстрактах вторичных метаболитов (в том числе по данным литературы) и известных регуляторов роста (в том числе фитогормонов) с последующим прогнозированием действия экстракта.

Ключевые слова: *Cetraria islandica*, *Lonicera caerulea*, *Populus tremula*, brassinosterоиды, вторичные метаболиты, гиббереллины, клональное микроразмножение, лихестериновая кислота, протолихестериновая кислота, ризогенез, стриголактоны, эпигейные лишайники, *in silico*

DOI: 10.31857/S0015330321100766, EDN: CVQBLU

ВВЕДЕНИЕ

Рост и развитие растений регулируют различные вещества: гормоны и соединения негормональной природы. Основные группы таких веществ и физиология их действия уже давно описаны в литературе. На заре развития биотехнологии и культуры растительных клеток, в частности, исследователи зачастую сначала добавляли в среду культивирования тот или иной компонент, а лишь потом определяли его действие на морфогенез. Однако в ряде случаев существует необходимость в знаниях о том, как те или иные вещества биологического синтеза могут влиять на рост и развитие отдельных растительных объектов. Методы,

которые помогают предсказать механизм действия вещества, исходя из химической структуры, это быстрый, удобный и недорогой инструмент в исследованиях физиологии растений. Почти все модели *in silico* сегодня используют уже накопленную информацию о веществах и их токсичности из существующих баз данных [1].

Лишайники (лихенезированные грибы) являются мультикомпонентным организмом, состоящим из микобионта (гриб) и фотобионта (водоросль и/или цианобактерия). Благодаря данному взаимодействию, лишайники выживали на протяжении миллионов лет в экстремальных условиях [2]. Занимая 8% суши [3], они сосуществуют с другими организмами, включая высшие расте-

ния, и данные взаимодействия исследованы недостаточно. *Cetraria islandica* (L.) Ach. широко распространен по всему миру, в том числе почти на всей территории РФ за исключением степей и пустынь [4].

В качестве вторичных метаболитов ацетонового экстракта из *C. islandica* ранее были описаны протоцетраровая, сукцинпротоцетраровая, фумарпротоцетраровая, виренсиновая, нефростериновая, протолихестериновая, лихестериновая и рокцеляровая кислоты [5].

Известно, что наиболее изученный вторичный метаболит лишайников – усниновая кислота, обладает антимикробными свойствами в отношении грамположительных бактерий, микобактерий, грибов, простейших, вирусов и водорослей [6–8]. Также проводятся исследования цитотоксических свойств усниновой кислоты и других метаболитов (более 20) различных лишайников на раковых клетках человека [8]. Но влияние экстрактов лишайников на высшие растения изучено недостаточно, несмотря на то, что исследования в данном направлении имеют фундаментальное значение, способное пролить свет на особенности межорганизменного взаимодействия лишайнизированных грибов, как сложной многокомпонентной системы с окружающей их природной средой [9].

Основная масса исследований посвящена влиянию лишь усниновой кислоты на высшие растения, в частности на особенности транспираторной и фотосинтетической функций растений, в то время как остальные метаболиты остались не исследованы. В работе Лузиной с соавт., описано влияние усниновой кислоты на витальность и активность ростовых процессов высших растений различных семейств: сосновые, злаковые, крестоцветные, луковые, пасленовые и др. [9]. При этом спектр исследований по данному соединению охватывал изучение влияния усниновой кислоты на рост и развитие высших растений, преимущественно сельскохозяйственных и хозяйственно-ценных культур, на различных стадиях онтогенеза: от проращивания семян до роста генеративных побегов. Во многих работах отмечается ингибирующее действие усниновой кислоты: на прорастание семян табака (*Nicotiana tabacum* L.) [10], на ростовые процессы иматурных особей томата (*Lycopersi conesculentum* Mill.) [11, 12] и шпината огородного (*Spinacia oleracea* L.) [13], на ризогенез проростков кукурузы (*Zea mays* L.) и подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) [14]. Также сообщается об угнетающем действии усниновой кислоты на древесные растения: дуб круглолистный (*Quercus rotundifolia* Lam.) [15] и иву прелестную (*Salix blanda* And.) [16]. Не исследованным остается вопрос об аллелопатическом воздействии других вторичных метаболитов и многокомпонентных экстрак-

тов лишайников на ростовые процессы и ризогенез высших растений. Экстракты лишайников, как и экстракты высших растений вероятно могут обладать синергетическим эффектом взаимодействия входящих в их состав соединений и влиять на физиологические процессы покрытосеменных растений.

Исследования, направленные на моделирование и экспериментальное подтверждение биологической активности вторичных метаболитов биологических объектов и в частности лишайников, открывают новые возможности для многостороннего их применения в различных сферах хозяйственной деятельности человека.

Таким образом, целью исследования было проведение *in silico* анализа вторичных метаболитов ацетонового экстракта из лишайника *C. islandica* и изучение его влияния на морфогенные процессы высших растений в культуре *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

***In silico* анализ регуляторной способности вторичных метаболитов из *C. islandica* с использованием карты подобия.** Для определения возможного кандидата, среди известных вторичных метаболитов лишайника *C. islandica*, влияющего на морфогенез высших растений, был проведен их сравнительный анализ со структурами известных фитогормонов (базы данных ChEMBL Database (ebi.ac.uk) и National Center for Biotechnology Information (nih.gov)) с использованием метода Стохастического вложения соседей с *t*-распределением (t-distributed Stochastic Neighbor Embedding, t-SNE), что является алгоритмом машинного обучения [17]. Структурные формулы были разбиты на, так называемые, кор-фрагменты (Core-Fragment) и радикалы. На основе полученных кор-фрагментов и алгоритма, включающего в себя дескриптор отпечатков (FragFp), была построена карта распределения молекул согласно их схожести. Максимально схожие молекулы (более 80%, FragFp > 0.8) были объединены в кластеры.

Получение экстракта. Таллом лишайника *C. islandica* (рис. 1) был собран в различных участках сосняка-беломошника Красносельского района Костромской области. Очищенные и высушенные в сушильном шкафу (50°C, 4 ч) талломы лишайника массой воздушно-сухого сырья 20.0053 г подвергали экстрагированию в кипящем ацетоне 99.5% объемом 500 мл в течение 40 мин [18]. Экстрагирование в ацетоне позволяет извлечь широкий спектр вторичных метаболитов. Экстракт фильтровали и упаривали до объема 20 мл. Осаждение вторичных метаболитов осуществляли этиловым спиртом (добавляемый объем 15 мл). После чего экстракт помещали в холодильный шкаф (“Атлант” 4009–000, Беларусь) (5°C, 72 ч).



Рис. 1. *Cetraria islandica* (L.) Ach.

Затем осадок концентрировали на центрифуге MINISPIN (“EPPENDORF”, Германия) в микропробирках Эппендорф на 1.5 мл при 13000 об./мин. в течение 40 с, надосадочную жидкость сливали, осадок высушивали в сушильном лабораторном шкафу ШС-80-01 (СКТБ СПУ, Россия) (80°C, 4 ч).

Растительный материал. В качестве модельных объектов исследования использовали растительный материал в культуре *in vitro* осины триплоидной (*Populus tremula* L.) и жимолости синей (*Lonicera caerulea* L.) сорта “Бакчарская”. Данные виды являются наиболее удобными модельными объектами для исследования воздействия экстракта *C. islandica* ввиду интенсивности роста микропобегов на этапе клонального микроразмножения на апробированных нами питательных средах и скорости корнеобразования на этапе укоренения. Кроме того, данные виды принадлежат к категории хозяйственно ценных и ягодных культур, что определяет ценность оптимизации условий их размножения и культивирования для дальнейшего плантационного выращивания.

Исследование влияния экстракта на морфогенетические процессы растений. Исследование влияния экстракта лишайников на морфогенез высших растений осуществляли с использованием культуры *in vitro*. В качестве контроля использовали апробированный состав агаризованной питательной среды по прописи МС-среда [19]. При культивировании в условиях *in vitro* стерильных микрочеренков *P. tremula* в среду добавляли

0.05 мг/л 1-нафтилуксусной кислоты (“Sigma-Aldrich”, США), а при культивировании *L. caerulea* 0.5 мг/л 6-бензиламинопурина (6-БАП) (“БиолоТ”, РФ). В исследуемые варианты питательных сред был добавлен экстракт лишайника *C. islandica* в концентрациях 10, 50 и 500 мг на литр питательной среды (мг/л). Растения-регенеранты культивировали в конических стеклянных сосудах объемом 250 мл. В каждом сосуде было 30 мл питательной среды и по 30 растений. Морфогенную активность микропобегов (длина микропобега, количество узлов, коэффициент размножения, начало ризогенеза, количество укорененных микропобегов и длину корней) оценивали на 35 сут культивирования.

Все эксперименты проводили в 3 повторностях. Статистическая обработка данных была проведена в Microsoft Excel с использованием пакета “Анализ данных”. Данные представлены в виде среднего арифметического \pm ошибка среднего (SEM). Значимость различий была определена с использованием *t*-критерия Стьюдента, при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Активность некоторых вторичных метаболитов *C. islandica*. Сравнительный анализ известных вторичных метаболитов ацетонового экстракта из *C. islandica* [5] показал, что только вторичные алифатические соединения (протолихестериновая и

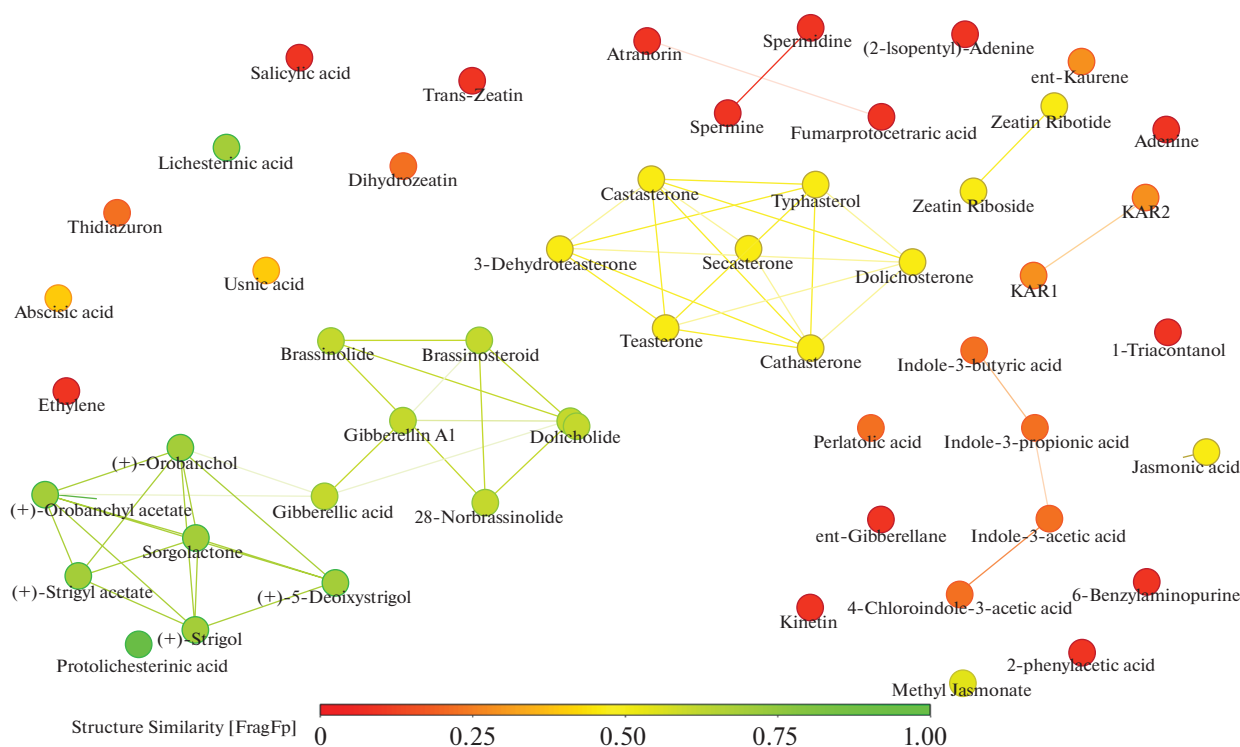


Рис. 2. Карта подобия структур молекул вторичных метаболитов лишайника *C. islandica* и молекул фитогормонов. Цвет от красного к зеленому обозначает процент схожести: от 0 до 100%. Вещества со структурным подобием более 80% (FragFp > 0.8) объединены в кластеры.

лихестериновой кислоты) по своей структуре схожи с фитогормонами (окрашены в зеленый) (рис. 2).

Карта подобия отображает положение молекул в зависимости от их схожести: вещества, отличающиеся по структуре, были распределены на максимально дальнее расстояние, в то время как похожие вещества были сконцентрированы. Алгоритм программы выявляет родственные между собой вещества и определяет их в кластеры (объединены линиями). Окрашивание точек на карте определяет процент схожести структурных формул веществ: от красного — схожести не наблюдалось (FragFp = 0); до зеленого — 100% схожести (FragFp = 1). Данный анализ позволяет выдвинуть гипотезу о возможном влиянии каждого метаболита *C. islandica* в зависимости от их структурного подобия тем или иным фитогормонам.

Среди вторичных метаболитов лишайника *C. islandica*, описанных в литературе, лихестериновая и протолихестериновая кислоты показали наибольшую схожесть с стриголактонами, меньшую — с гиббереллинами и еще меньшую с брассиностероидами (рис. 3). Из рис. 3 видно, что фумарпротоцетраровая кислота, перлатоловая кислота и атранорин по структуре схожи между собой, но отличаются от представленных фитогормонов с процентом схожести ниже 50.

Как известно, содержание протолихестериновой кислоты в *C. islandica* составляет от 0.1 до 1.5%

сухой массы лишайника (в зависимости от места сбора) [20].

Ранее Ingolfsdottir K. с соавт., было показано, что экстракт петролейного эфира из *C. islandica* полученный через 30 мин экстрагирования содержит примерно 0.03% протолихестериновой кислоты (111 мкг протолихестериновой кислоты в 397 мг полного экстракта) [20]. Активная концентрация ацетонового экстракта из *C. islandica* равная 50 мг/л может быть эквивалентна концентрации протолихестериновой кислоты равной 0.015 мкг/л.

Стриголактоны представляют собой небольшую группу соединений, производных каротиноидов, выделяемых из корней 80% наземных растений и обеспечивающих симбиотическую связь с почвенной арбускулярной микоризой [21]. Стриголактоны широко участвуют в регулировании роста корней, архитектуры побегов, старения листьев, клубеньков и взаимодействия бобовых и симбионтов, а также в ответе на различные внешние раздражители, такие как абиотические и биотические стрессы [22, 23]. Эти функциональные свойства стриголактонов нашли широкое применение в генной инженерии сельскохозяйственных культур с целью улучшения продуктивности растений и увеличения урожая [23].

Гиббереллины участвуют в регуляции ростовых процессов клеток, что проявляется в удлинении

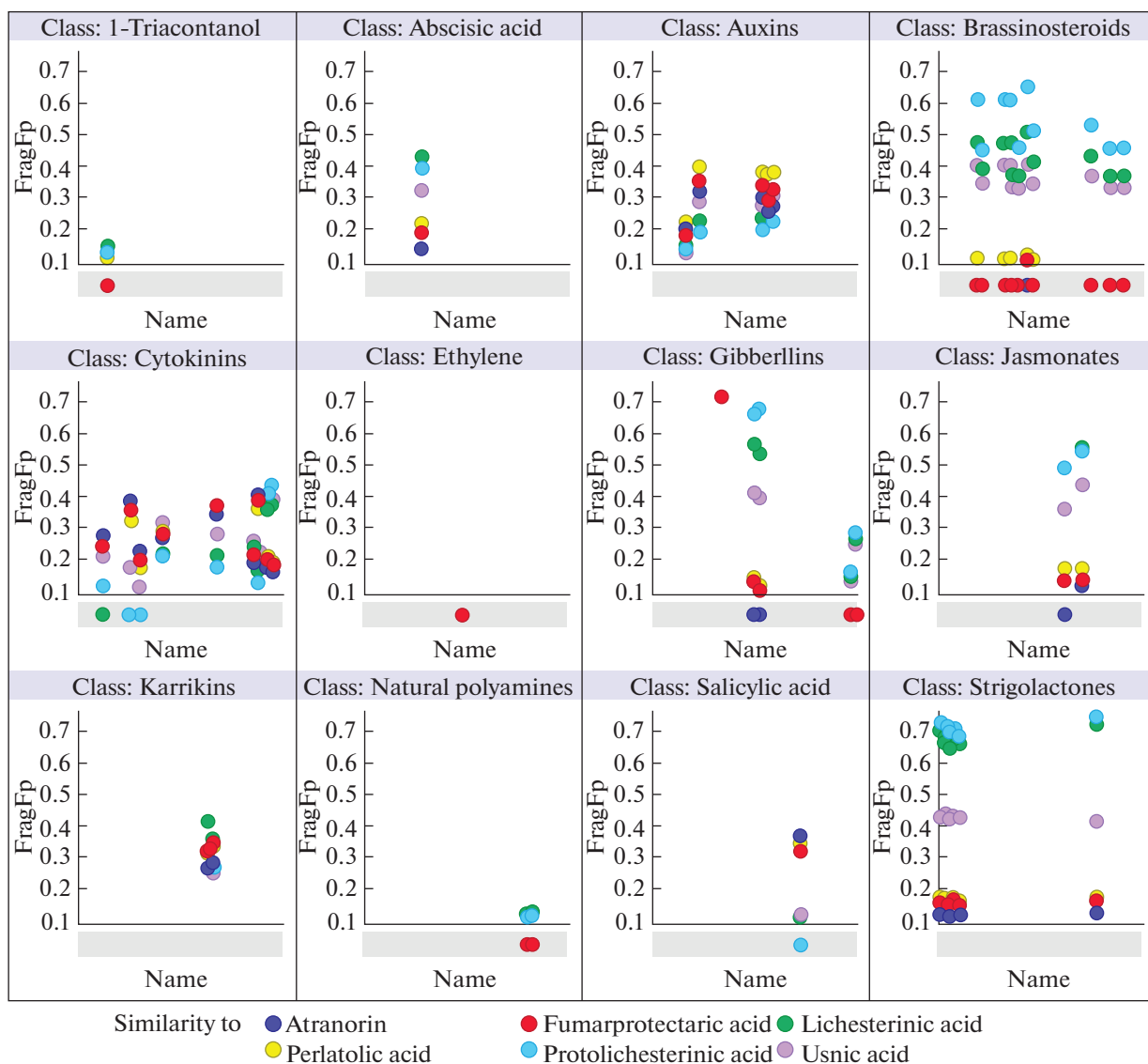


Рис. 3. Графики распределения значений схожести вторичных метаболитов из лишайника *C. islandica* с фитогормонами в зависимости от их класса (представители разных классов отражены на отдельном графике). По оси абсцисс каждого графика расположены фитогормоны, по оси ординат – значения FragFp.

нии стебля, корней и развивающихся органов цветков [24]. Высокая схожесть лихестериновой и протолихестериновой кислот, являющихся вторичными метаболитами лишайников *C. islandica*, со стриголактонами и гиббереллинами может объяснить стимулирование ризогенеза у объектов исследования. Как известно, концентрация многих фитогормонов при низких концентрациях является стимулирующей, но при повышении концентраций они подавляют рост растений. В нашем случае мы наблюдали данный эффект при повышении концентрации до 500 мг/л.

Анализируя опубликованные данные [25, 26] было обнаружено, что стриголактон GR24 оказал положительное влияние на прорастание семян

Pinguicula ramosa в концентрации 3 нМ ($= 0.895 \times 10^3$ мг/л), при концентрации 3–30 мкМ ($= 0.895$ мг/л – 8.949 мг/л) данный фитогормон ингибировал рост первичного корня [26]. Другие стриголактоны – стригол и оробанчол, индуцировали прорастание семян *Oroban cheminor* при концентрации 0.001 мкМ ($= 0.35 \times 10^3$ мг/л) (CHEMBL3045114). Концентрация гиббереллинов, необходимая для прорастания семян, значительно выше необходимой концентрации стриголактонов. Например, было опубликовано, что концентрация гиббереллинов необходимая для прорастания семян *Cyclamen* составила 50 мг/л [27]. В отношении *Lactuca sativa* гиббереллин (+)-гиббереллиновая кислота продемонстриро-

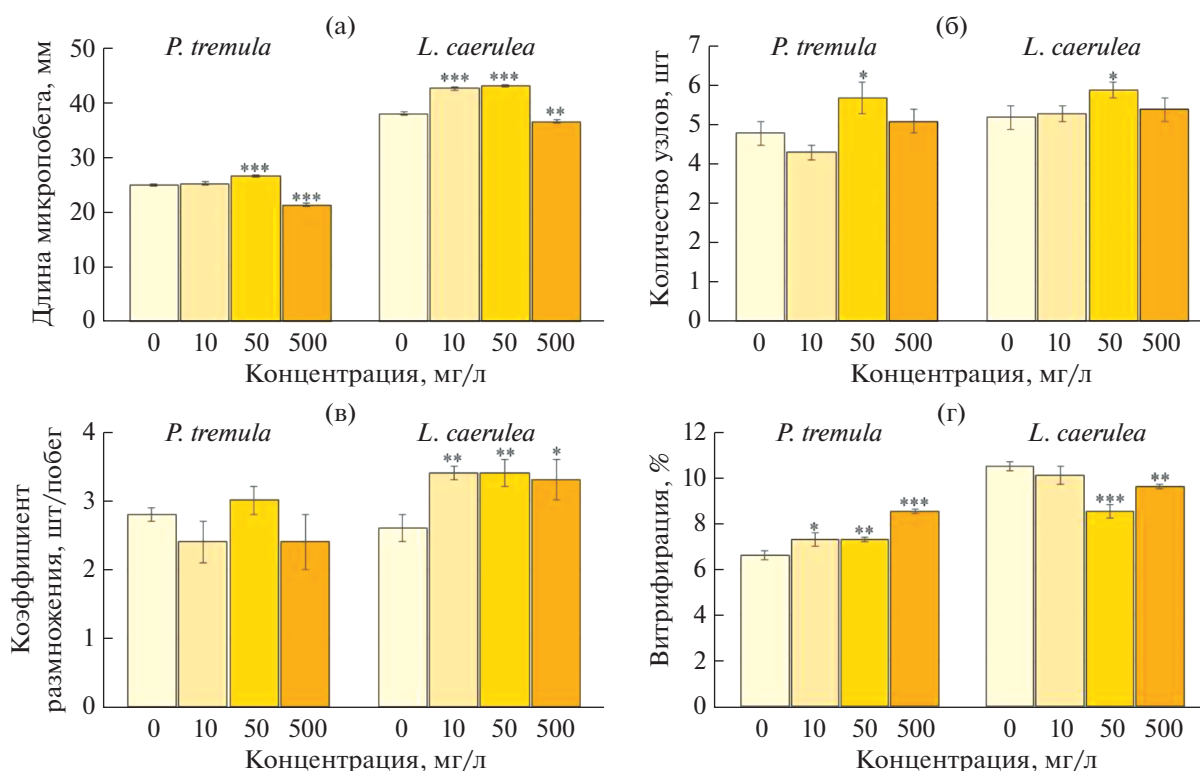


Рис. 4. Влияние экстракта из лишайника *Cetraria islandica* (L.) Ach на витальность и морфогенную активность микропобегов 1 – *P. tremula* и 2 – *L. caerulea* в культуре *in vitro*: а) на длину микропобега; б) на количество узлов; в) на коэффициент размножения; г) на вирификацию. * – при $P < 0.05$; ** – при $P < 0.01$; *** – при $P < 0.001$.

вала ингибирующее действие на прорастание семян при концентрации 1 мМ (= 350 мг/л) (CHEMBL3046139).

Концентрация протолихестериновой кислоты, выше рассчитанная по опубликованным данным [21] лежит в диапазоне активных концентраций для стриголактонов. Таким образом, можно выдвинуть гипотезу, что протолихестериновая кислота (одна или в комбинации с другими компонентами экстракта) является компонентом ингибирующим ризогенез.

Брассиностероиды представляют собой группу стероидных гормонов, играющих важную роль в физиологии развития и роста растений. Передача сигналов брассиностероидов способствует делению клеток, а также играет роль в этиологии. Недавние исследования показали, что брассиностероиды участвуют в процессе образования цветков, формирования архитектуры соцветий и других аспектах репродуктивных процессов растений [28].

Экстрагирование. Количественное содержание ацетонового экстракта из *C. islandica* составляло 2.1–5.2 мг/г воздушно-сухого сырья. На основе опубликованных научных данных можно заключить, что ацетоновый экстракт из *C. islandica* содержит протоцеттаровую, сукцинпроцеттаро-

ваую, фумарпроцеттаровую, виренсиновую, нефростериновую, протолихестериновую, лихестериновую и рокцеляровую кислоты [5].

Влияние экстракта из *C. islandica* на морфогенез *P. tremula* и *L. caerulea*. В рамках данного исследования было изучено воздействие экстракта из *C. islandica* на активность ростовых процессов, геммогенез, коэффициент размножения и ризогенез модельных объектов – *P. tremula* и *L. caerulea*. Экспериментальные результаты влияния изучаемого экстракта на морфогенез модельных объектов представлены на рис. 4.

На основе полученных данных можно заключить, что для *P. tremula* экстракт из *C. islandica* в концентрации 10 мг/л не имеет достоверного влияния на удлинение побегов. Увеличение концентрации до 50 мг/л оказывает незначительное, но достоверное положительное действие на данный параметр роста. Однако дальнейшее увеличение концентрации экстракта до 500 мг/л ведет к ингибированию ростовых процессов *P. tremula*. Для культивируемых эксплантов *L. caerulea* внесение в питательную среду экстракта из лишайника *C. islandica* оказывало достоверное влияние на увеличение длины побегов в сравнении с контролем. Однако изменение длины эксплантов при концентрациях 10 мг/л и 50 мг/л экстракта не



Рис. 5. Рост микропобегов на питательной среде с добавлением экстракта эпигейных лишенизированных грибов в концентрации 50 мг/л (справа) и на контрольной среде (слева) на 35 сут. культивирования: а – *P. tremula*, б – *L. caerulea*.

различались. Внесение в среду культивирования 500 мг/л экстракта для *L. caerulea* так же, как и для *P. tremula* приводило к замедлению роста в длину эксплантов. Характерным для обеих культур являлось увеличение длины микропобега на питательной среде с добавлением экстракта *C. islandica* по сравнению с контролем (на 5 и 7% при концентрациях 10 и 50 мг/л у *P. tremula* соответственно; на 12 и 13% при концентрациях 10 и 50 мг/л у *L. caerulea* соответственно). Данный эффект соответствует действию гиббереллинов [24]. При этом наблюдается различие роста структур, приводящих к увеличению длины микропобега: в случае *P. tremula* увеличение длины ассоциировано с образованием большего количества узлов на побеге (на 18 и 6% при концентрациях 50 и 500 мг/л), в случае же *L. caerulea* увеличение длины побега происходит большей частью за счет роста междоузлий, так как увеличения количества узлов на побеге по сравнению с контролем не наблюдается (рис. 5).

Внесение в питательную среду 10 мг/л экстракта лишайника оказывало незначительное негативное влияние на формирование почек эксплантами *P. tremula* в сравнении с контролем (рис. 4б).

Увеличение же концентрации до 50 мг/л приводило к достоверному увеличению геммогенеза. Как и для удлинения побегов концентрация в 500 мг/л экстракта в среде культивирования тормозила процессы формирования эксплантами *P. tremula* новых почек. Для *L. caerulea* концентрации экстракта 10 мг/л и 500 мг/л не имели достоверного различия по оказываемому действию на

геммогенез с контролем. Наиболее эффективное действие при этом оказывала концентрация в 50 мг/л, при которой наблюдали формирование 5.9 ± 0.2 новых почек.

Одним из показателей, характеризующим эффективность клонального микроразмножения, на который мы обращали внимание, являлся коэффициент размножения. Некоторыми авторами принимается за коэффициент размножения при микроразмножении растений количество почек, сформированных побегом в процессе культивирования, однако зачастую “стандартных” эксплантов, пригодных для последующего использования оказывается несколько меньше. Добавление в среду для культивирования модельных растительных объектов экстракта из *C. islandica* не оказывало существенного влияния на коэффициент размножения *P. tremula* (наибольшее значение коэффициента размножения для *P. tremula* наблюдали при концентрации экстракта в среде 50 мг/л – 3.01, по сравнению с контролем – 2.80), значимого различия не наблюдали даже для концентрации экстракта 500 мг/л (рис. 4в). В то же время коэффициент размножения *L. caerulea* при внесении в среду экстракта из лишайника во всех исследуемых концентрациях имел достоверное различие с контролем и оказывал положительное действие.

Добавление экстракта лишайника позволило в разной степени увеличить коэффициент размножения обеих культур: на 8% при концентрации 50 мг/л в случае *P. tremula* и на 29 и 31% в случае *L. caerulea* при концентрациях 30 и 50 мг/л соот-

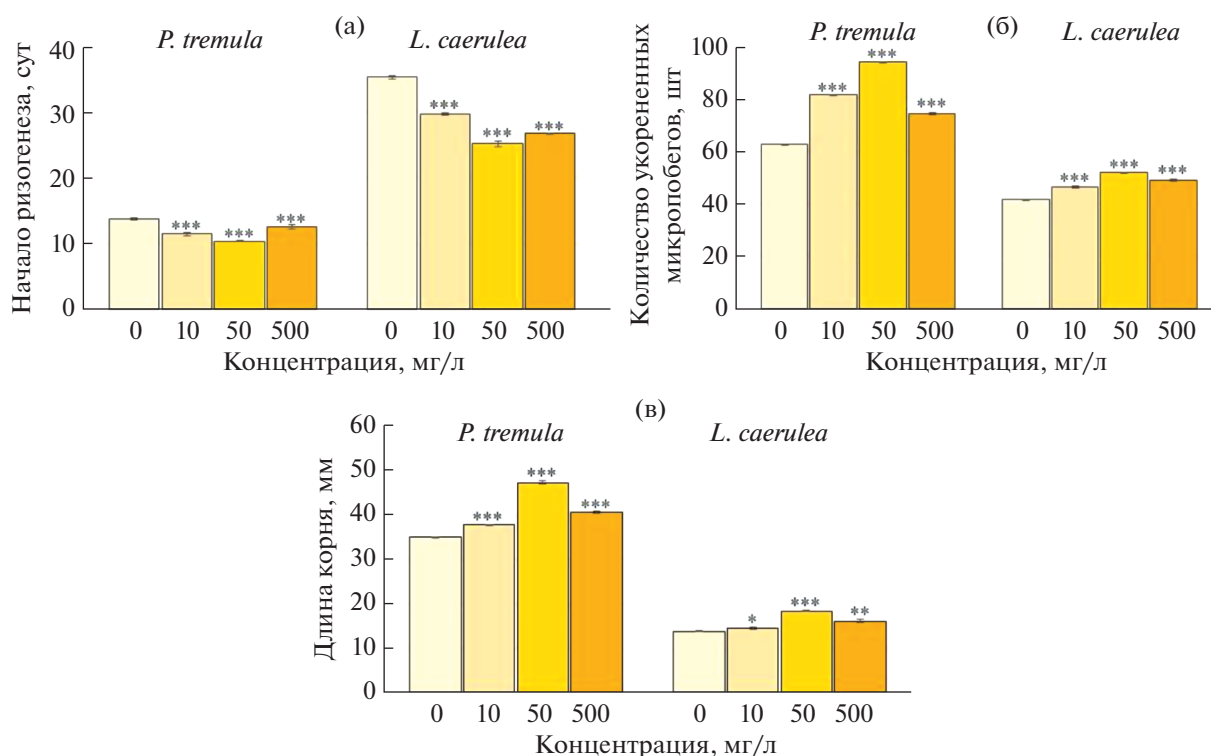


Рис. 6. Влияние экстракта из лишайника *Cetraria islandica* (L.) Ach на ризогенез микропобегов 1 – *P. tremula* и 2 – *L. caerulea* в культуре *in vitro* на: а) начало ризогенеза; б) количество укорененных микропобегов; в) длину корня. * – при $P < 0.05$; ** – при $P < 0.01$; *** – при $P < 0.001$.

ветственно. Полученные результаты позволяют предположить, что данный эффект обусловлен увеличением количества узлов и длины междоузлий, что позволяет разделить микропобег на большее количество метамеров при клональном микроразмножении в случае их близкого расположения.

Таким образом, при добавлении в состав питательной среды экстракта лишайника в концентрации до 50 мг/л мы наблюдали увеличение коэффициента размножения обеих культур, а также увеличение длины микропобега (за счет роста междоузлий у *L. caerulea* и образования большего количества узлов у *P. tremula*).

Витрификация – негативное явление в культуре ткани растений, обусловленное обводненностью тканей экспланта, приводящее чаще всего к их гибели и уменьшению коэффициента размножения. Экстракт из *C. islandica* в отношении эксплантов *P. tremula* увеличивал выход витрифицированных побегов во всех исследуемых концентрациях (рис. 4г).

Положительное действие экстракта на витрификацию побегов было отмечено в отношении эксплантов *L. caerulea*. Так 50 мг/л экстракта из *C. islandica* в среде культивирования демонстрировало снижение количества витрифицированных побегов на 10–15% по сравнению с контро-

лем. Меньшая доза внесения экстракта (10 мг/л) не оказывала существенного влияния на витрификацию эксплантов *L. caerulea*, в то же время увеличение концентрации экстракта до 500 мг/л приводило к увеличению данного показателя для эксплантов. Отсутствие выраженного негативного влияния наблюдается в случае *L. caerulea*: при концентрациях экстракта 10 и 50 мг/л процент витрифицированных и этиолированных микропобегов (желтоватой окраски, с сильно вытянутым стеблем, слабым развитием листьев) не превышал контроль (10, 9 и 11% соответственно).

До настоящего момента не было изучено влияние вторичных метаболитов в составе экстракта лишенизированных грибов на активность ризогенеза высших растений, в соответствии с чем, мы видим необходимость проведения данного исследования (рис. 6).

Было отмечено положительное влияние экстракта из талломов *C. islandica* в концентрациях от 10 до 500 мг/л на ризогенез *P. tremula* и *L. caerulea* (рис. 6а). Так, время образования корней на эксплантах *P. tremula* сокращалось при концентрации 10 мг/л экстракта в среде культивирования с 14 до 11 сут. по сравнению с контролем, увеличение концентрации до 50 мг/л сокращало время ризогенеза до 10 сут. Наступление начала ризогенеза у *L. caerulea* происходит в более поздние сро-

ки, однако в целом тенденция, характерная для *P. tremula*, сохранялась: начало формирования и роста корней происходило в более ранние сроки при концентрации экстракта 10 мг/л (30 сут.) по сравнению с контролем (35 сут.), а при концентрации экстракта 50 мг/л – 25 сут. Таким образом, можно заключить, что вторичные метаболиты лишайника *C. islandica* в концентрации 10–50 мг/л среды оказывают стимулирующее воздействие на ризогенез культур *P. tremula* и *L. caerulea* в условиях *in vitro*.

В ходе исследования было отмечено положительное влияние вторичных метаболитов *C. islandica* на количество укорененных микропобегов как для *L. caerulea*, так и *P. tremula*. Добавление в питательную среду экстракта в концентрации 10 мг/л повышало процент укорененных микропобегов *P. tremula* на 19%, а при 50 мг/л – на 31% по сравнению с контролем. Дальнейшее повышение концентрации экстракта в среде снижало количество укорененных побегов *P. tremula* (рис. 6б).

В случае *L. caerulea* отмечали меньший процент укоренения, но при этом сохраняется тенденция к увеличению числа укорененных побегов на среде с концентрацией экстракта от 10 до 50 мг/л на 5–10% соответственно по сравнению с контролем.

Аналогичную ситуацию наблюдали в отношении средней длины корня: при увеличении концентрации до 50 мг/л происходило увеличение средней длины корня как для *L. caerulea*, так и *P. tremula* в сравнении с контролем. Дальнейшее повышение концентрации снижало данный эффект (рис. 6в).

Резюмируя выше обозначенное, можно заключить, что экстракт из лишайнизированных грибов *C. islandica* в концентрации 10–50 мг/л обладает действием на *P. tremula* и *L. caerulea*, подобным активности стриголактонов и гибберелинов при культивировании их в условиях *in vitro*, стимулируя более раннее начало ризогенеза микропобегов, а также непосредственно рост корней. Кроме того, на средах с добавлением 10–50 мг/л экстракта лишайников наблюдается больший рост междоузлий микропобегов, что свидетельствует об эффекте, индуцирующем растяжение клеток и процесс корнеобразования. В соответствии с полученными данными определена оптимальная концентрация в 50 мг/л ацетонового экстракта из *C. islandica*, приводящая к увеличению коэффициента размножения *P. tremula* и *L. caerulea* и повышению процента укоренения микропобегов при минимальной их витрификации.

Ввиду наличия в талломах *C. islandica* вторичных метаболитов, спектр применения которых достаточно широк, имеется необходимость изучения перспективы получения данных соединений при культивировании как компонентов ли-

хенизированных грибов, так и их ассоциаций, в условиях *in vitro* [28].

Таким образом, экспериментально подтверждена гипотеза, сформулированная на основе *in silico* анализа о гиббереллиноподобном и стриголактонподобном воздействии некоторых веществ из *C. islandica* на примере культуры *in vitro* *P. tremula* и *L. caerulea*.

Работа выполнена с использованием ресурсов ЦКП “Экология, биотехнологии и процессы получения экологически чистых энергоносителей” Поволжского государственного технологического университета, г. Йошкар-Ола.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (№ 075-15-2021-674).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследования. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pawar G., Madden J.C., Ebbrell D., James W.F., Cronin M.T.D. *In silico* toxicology data resources to support read-across and (Q)SAR // Front Pharmacol. 2019. V. 10. P. 561. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00561>
2. Calcott M.J., Ackerley D.F., Knight A., Keyzers R.A., Owen J.G. Secondary metabolism in the lichen symbiosis // Chem. Soc. Rev. 2018. V. 47. P. 1730. <https://doi.org/10.1039/C7CS00431A>
3. Asplund J., Wardle D.A. How lichens impact on terrestrial community and ecosystem properties // Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc. 2017. V. 92. P. 1720. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/brv.12305>
4. Урбанавичюс Г.П. Список лишенофлоры России. СПб.: Наука, 2010. С. 194 с.
5. Xu M., Heidmarsson S., Thorsteinsdottir M., Kreuzer M., Hawkins J., Omarsdottir S., Olafsdottir E.S. Authentication of iceland moss (*Cetraria islandica*) by UPLC-QToF-MS chemical profiling and DNA barcoding // Food Chem. 2018. V. 245. P. 989. Available. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.073>
6. Ogmundsdottir H.M., Zoëga G.M., Gissurarson S.R., Ingólfssdottir K. Anti-proliferative effects of lichen-derived inhibitors of 5-lipoxygenase on malignant cell-lines and mitogen-stimulated lymphocytes // J. Pharm. Pharmacol. 1998. V. 50. P. 107. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1998.tb03312.x>
7. Bucar F., Schneider I., Ögmundsdottir H., Ingólfssdottir K. Anti-proliferative lichen compounds with inhibitory activity on 12(S)-HETE production in human platelets // Phytomed. 2004. V. 11. P. 602. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2004.03.004>
8. Freysdottir J., Omarsdottir S., Ingólfssdottir K., Víkingsson A., Olafsdottir E.S. *In vitro* and *in vivo* immunomodulating effects of traditionally prepared extract and purified compounds from *Cetraria islandica* // Int. Immuno-

- pharm. 2008. V. 8. P. 423.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2007.11.007>
9. *Luzina O.A., Salakhutdinov N.F.* Biological activity of usnic acid and its derivatives: Part2. effects on higher organisms // *Mol. Physicochem. Aspects. Russ. J. Bio-org. Chem.* 2016. V. 42. P. 249.
<https://doi.org/10.1134/S1068162016030109>
 10. *Cardarelli M., Serino G., Campanella L., Ercole P., De Cicco Nardone F., Alesiani O., Rossiello F.* Antimitotic effects of usnic acid on different biological systems // *Cell. Mol. Life Sci.* 1997. V. 53. P. 667.
<https://doi.org/10.1007/s000180050086>
 11. *Latkowska E., Lechowski Z., Bialczyk J., Pilarski J.* Photosynthesis and water relations in tomato plants cultivated long-term in media containing (+)-Usnic Acid // *J. Chem. Ecol.* 2006. V. 32. P. 2053.
<https://doi.org/10.1007/s10886-006-9128-6>
 12. *Lechowski Z., Latkowska E., Bialczyk J.* Accumulation of biomass and some macroelements in tomato plants grown in media with (+)-usnic acid // *Environ. Exp. Bot.* 2006. V. 56. P. 239.
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.03.001>
 13. *Inoue H., Noguchi M., Kubo K.* Site of inhibition of usnic acid at oxidizing side of photosystem 2 of spinach chloroplasts // *Photosynth.* 1987. V. 21. P. 88.
 14. *Lascève G., Gaugain F.* Effects of usnic acid on sunflower and maize plantlets // *J. Plant Physiol.* 1990. V. 136. P. 723.
[https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81352-0](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81352-0)
 15. *Orús M., Estévez M., Vicente C.* Manganese depletion in chloroplasts of *Quercus roundifolia* during chemical simulation of lichen epiphytic states // *Physiol. Plant.* 2006. V. 52. P. 263.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1981.tb08503.x>
 16. *Follmann G.* Flechtenstoffe und stecklingsbewurzelung // *Die Naturwissenschaften.* 1965. V. 52. P. 266.
<https://doi.org/10.1007/BF00602940>
 17. *Sander T., Freyss J., von Korff M., Rufener C.* Data warrior: an open-source program for chemistry aware data visualization and analysis // *J. Chem. Inf. Model.* 2015. V. 55. P. 460.
<https://doi.org/10.1021/ci500588j>
 18. *Goga M., Antreich S., Backor M., Weckwerth W., Lang I.* Lichen secondary metabolites affect growth of *Physcomitrella patens* by allelopathy // *Protoplasma.* 2017. V. 254. P. 1307.
<https://doi.org/10.1007/s00709-016-1022-7>
 19. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* 1962. V. 15. P. 473.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
 20. *Ingoldsdottir K., Breu W., Huneck S., Gudjonsdottir G.A., Müller-Jakic B., Wagner H.* In vitro inhibition of 5-lipoxygenase by protolichesterinic acid from *Cetrariaislandica* // *Phytomed.* 1994. V. 1. P. 187.
[https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(11\)80063-2](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(11)80063-2)
 21. *Mishra S., Upadhyay S., Shukla R.K.* The role of strigolactones and their potential cross-talk under hostile ecological conditions in plants // *Front. Plant Physiol.* 2017. V. 7. P. 691.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00691>
 22. *Mitra D., Rad K.V., Chaudhary P., Ruparelia J., Sagarika M.S., Boutaj H., Mohapatra P.K., Das P.P.* Involvement of strigolactone hormone in root development, influence and interaction with mycorrhizal fungi in plant: Mini-review // *Curr. Res. Microb. Sci.* 2021. V. 2. P. 1.
<https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100026>
 23. *Rehman N.U., Li X., Zeng P., Guo S., Jan S., Liu Y., Huang Y., Xie Q.* Harmony but not uniformity: role of strigolactone in plants // *Biomolec.* 2021. V. 11. P. 1616.
<https://doi.org/10.3390/biom11111616>
 24. *Rizza A., Jones A.M.* The makings of a gradient: spatio-temporal distribution of gibberellins in plant development // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2019. V. 47. P. 9.
<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.08.001>
 25. *Pouvreau J.-B., Gaudin Z., Auger B., Lechat M.-M., Gauthier M., Delavault P., Simier P.* A high-throughput seed germination assay for root parasitic plants // *Plant Meth.* 2013. V. 9. P. 1.
<https://doi.org/10.1186/1746-4811-9-32>
 26. *Rasmussen A., Depuydt S., Goormachtig S., Geelen D.* Strigolactones fine-tune the root system // *Planta.* 2013. V. 238. P. 615.
<https://doi.org/10.1007/s00425-013-1911-3>
 27. *Cornea-Cipcigan M., Pamfil D., Sisea C.R., Mărgăoan R.* Gibberellic acid can improve seed germination and ornamental quality of selected cyclamen species grown under short and long days // *Agron.* 2020. V. 10. P. 516.
<https://doi.org/10.3390/agronomy10040516>
 28. *Behera B., Verma N., Sonone A., Makhija U.* Experimental studies on the growth and usnic acid production in “lichen” *Usnea ghattensis* in vitro // *Microbiol. Res.* 2006. V. 161. P. 232.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2005.08.006>