УДК 581.4:581.143:577.175.1.05

РЕГУЛЯЦИЯ РОСТА И ВТОРИЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ *SAUSSUREA ORGAADAYI* 28-ГОМОБРАССИНОЛИДОМ И СЕЛЕНОМ

©2013 И.Ф. Головацкая, Н.А. Володина

Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск

Поступила 02.06.2013

Определена степень изменчивости цитоморфологических характеристик и содержания терпеноидных сапонинов каллусной культуры клеток *Saussurea orgaadayi*. Показано, что низкие концентрации 28-гомобрассинолида и селената натрия поддерживают рост культуры, тогда как высокие – активируют вторичный метаболизм.

***Ключевые слова**: Saussurea orgaadayi, культура клеток, 28-гомобрассинолид, селенат натрия, терпеноидные сапонины.*

Растения синтезируют широкий спектр вторичных метаболитов, которые могут выполнять важные функции в процессе адаптации растений к специфическим экологическим условиям или в ответ на действие биотических и абиотических стрессоров, различных элиситоров или сигнальных молекул [1–4]. Некоторые из этих растительных метаболитов оказывают благоприятное действие на жизнедеятельность человека и используются в фармакологической, пищевой, косметической и сельскохозяйственной промышленности. Из-за их уникальных и часто сложных химических структур, синтез этих природных веществ часто невыполним или экономически не выгоден. Поэтому много вторичных метаболитов все еще извлекают из растений, изъятых из их естественных местообитаний. В связи с решением проблемы сохранения биоразнообразия, появляется необходимость в сокращении использования ресурсов лекарственных растений из естественных популяций, поскольку масштабные заготовки с полным извлечением растений сокращают ареалы распространения видов, а также антропогенные воздействия приводят к деструкции естественной среды существования видов, увеличивая список «краснокнижных» видов.

Поиск путей компенсации дефицита лекарственных растений привел к разработке принципиально новых биотехнологических методов получения отдельных биологически активных соединений растительного происхождения на основе использования культуры изолированных тканей и клеток, которые позволяют круглогодично выращивать клеточную культуру на искусственных питательных средах в асептических контролируемых условиях.

Известно, что рост и развитие растений находится под контролем эндогенных систем регуляции, среди которых можно выделить гормональную и трофическую системы. Важными компонентами этих систем, участвующих в регуляции роста, служат брассиностероиды и селен [5–11]. Брассиностероиды (БР) характеризуются плейотропным действием. Они играют роль в растяжении клеток, прорастании семян, эпинастии листьев, ризогенезе, цветении, созревании плодов, старении, дифференцировании ксилемы, фотоморфогенезе, изменении гормонального баланса, индукции биосинтеза этилена, активации амилазы, нитрат-редуктазы, протонного насоса, и регулировании экспрессии генов. Обработка БР увеличивает устойчивость растений к различным абиотическим и биотическим стрессам за счет повышения уровня фенольных смол и терпеноидов, увеличения активности ферментов пероксидазы и полифенолоксидазы [5–8].

Большое внимание уделяется проблеме обогащения селеном различных продуктов фармацевтической и пищевой промышленности [9], поскольку стало известно об антиоксидантных функциях селен-содержащих соединений [10]. Селен входит в состав важных селенопротеинов человека (глутатион-пероксидаз, тиоредоксинредуктаз и других), предупреждая развитие более четырех десятков заболеваний у человека и животных [10]. Селен может регулировать вторичный метаболизм растений [11]. Имеются единичные сведения о влиянии уровня селена на физиологическую активность БР [12]. Недостаточно изучена регуляция вторичного метаболизма клеток растений in vitro. В связи с этим целью наших исследований было выявление зависимости ростовых процессов и содержания терпеноидных сапонинов в каллусной культуре клеток *Saussurea orgaadayi* от уровня 28-гомобрассинолида и селената натрия в питательной среде.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служила клеточная культура *Saussurea orgaadayi* (V.Khan. and Krasnob.). Горькуша оргаадай – многолетнее растение сем. Asteraceae (Сложноцветные), узколокальный эндемик небольшой территории, прилегающей к стыку Русского Алтая, Юго-Западной Тывы и территорий Монголии, редкий, лекарственный асоциальный вид, обитающий в субальпийском поясе высокогорий. В родственных видах *S. salicifolia* L.,

Головацкая Ирина Феоктистовна, д.б.н., проф., e-mail: golovatskaya.irina@mail.ru; *Володина Наталья Александровна*, магистр

S. controversa DC. и др. обнаруживают сесквитерпены, алкалоиды, эфирное масло, флавоноиды, фенолкарбоновые кислоты, кумарины, тритерпеновые сапонины, стероидные соединения, инулин и органические кислоты. Широкий спектр вторичных метаболитов обеспечивает важное фармакологическое значение видов рода *Saussurea*. Тотипотентность растительных клеток позволяет прогнозировать синтез каллусной культурой клеток вторичных метаболитов, характерных для интактных растений данного рода.

Исходная клеточная культура получена из семядолей стерильно выращенных проростков *S. orgaadayi* на среде Мурасиге-Скуга (МС), содержащей 0,8 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л 6-БАП, на кафедре физиологии растений и биотехнологии под руководством проф. Р.А. Карначук, ею было начато исследование регуляции вторичного метаболизма [13]. Семена растений любезно предоставила проф. Н.А. Некратова (НИИ ББ ТГУ, Томск).

В процессе эксперимента в асептических условиях в темноте наращивали исходную каллусную массу, затем разделяли ее на фрагменты, которые взвешивали и пересаживали на новую питательную среду. Последующее субкультивирование клеток проводили на агаризованной среде МС, содержащей 28-гомобрассинолид (ГБЛ) или селенат натрия (Se; “Sigma”, США), или их комбинации (опыт) и без них (контроль). ГБЛ – (22R, 23R, 24S)-2α, 3α, 22, 23-тетрагидрокси-24-этило-B-гомо-7-окса-5α-холестан-6-он – был выбран как природный C_{29}-брассиностероид с широким спектром биологической активности, обнаруженный *in vivo* в *Brassica campestris* var. pekinensis L. [14].

Прирост каллусной культуры клеток определяли по изменению массы сырого и сухого вещества, рассчитывали ростовой индекс. Цитоморфологические исследования каллуса включали оценку размеров и формы клеток, частоту их встречаемости. Выделили 3 типа клеток по форме округлые, эллипсоидные и вытянутые, а также по размерам мелкие (до 30 мкм), средние (от 30 до 60 мкм) и крупные (от 60 до 200 мкм). Определили средний объем клеток каждого размера. Содержание терпеноидных сапонинов определяли спектрофотометрически по методикам [15] в расчете на сухую массу культуры клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Всестороннее изучение биохимического состава культуры растительных клеток, выявление особенностей вторичного метаболизма, поиск методов повышения продуктивности является актуальной задачей физиологии и биотехнологии растений и может служить основой для создания промышленной технологии получения вторичных метаболитов в клеточной культуре *in vitro*.

Вторичные метаболиты упоминаются часто как вещества, не имеющие основополагающей роли в жизненно важных процессах растений, но определяющие взаимодействие растений с окружающей средой, их адаптацию и защиту. Однако, по нашему мнению, они могут регулировать рост и развитие растений, поскольку синтезируются из первичных метаболитов (углеводов, липидов и аминокислот), отвлекая последние от основных клеточных процессов. Кроме того, они имеют свойства, изменяющие состояние клетки.

Исходя из известных функций БР и селена в процессах растяжения и деления клеток, вторичном метаболизме [12, 13] и терапевтической значимости для человека, их использовали в качестве регуляторов при культивировании растительных клеток. В ходе эксперимента изучали динамику ростовых процессов каллусной культуры клеток в течение 30 сут, а также оценивали дозы-эффекты индивидуальных факторов (ГБЛ и Se) и их комбинаций на рост клеток в течение 20-дневного культивирования.

Кривая роста по сырой массе у контрольной каллусной культуры имела типичный S-образный вид кривой: лаг-период длительностью 10 сут, экспоненциальную фазу – 15 сут, затем рост замедлялся и с 25-х сут начиналась стационарная фаза (рис. 1). На 30-е сут субкультивирования ростовой индекс по массе сырого вещества культуры составил 4,28±0,23. Добавление 10^{-9} М селената натрия в питательную среду активировало ростовой индекс на 10 сут с последующим сохранением темпов роста на уровне контроля до 20 сут. Дальнейший рост культуры клеток замедлялся. Это могло быть обусловлено активным накоплением селена в клетках и замещением серы в белках, снижающем активность последних. 10^{-11} М ГБЛ замедлял рост культуры клеток по сравнению с контролем, при этом торможение роста в большей степени происходило за счет снижения оводненности (рис. 1а), чем накопления сухой массы (рис. 1б). Совместное действие ГБЛ и селена частично снимало ингибирующее действие гормона на рост клеточной массы.

Цитологические исследования показали, что каллусная ткань на 20-е сут культивирования состояла из меристемных и паренхимных клеток. Меристемные клетки имели небольшие размеры (<60 мкм), округлую форму, хорошо заметное ядро (рис. 2, мелкие, средние). Характерным признаком клеток паренхимного типа была их существенная удлиненность и большие размеры (>60 мкм) (рис. 2, крупные). При действии низкой концентрации селенат-иона (10^{-13} М), высокой концентрации ГБЛ (10^{-7} М) и их сочетании увеличивалась доля мелких и средних клеток, что могло свидетельствовать или об ускорении клеточного деления в каллусной культуре, или торможении растяжения клеток. Причем совместное действие факторов выражалось в суммировании эффектов. В то же время высокая концентрация селена (10^{-7} М) и более низкая ГБЛ (10^{-9} М) увеличивали долю крупных клеток за счет уменьшения доли мелких и средних клеток.

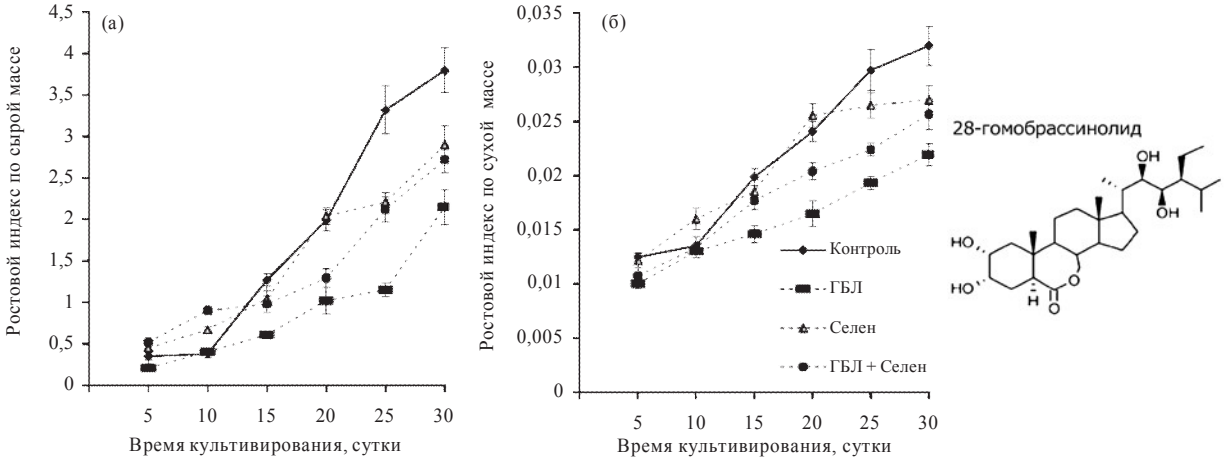

Рис. 1. Динамика ростовых индексов каллусной культуры клеток по сырой (а) и сухой (б) массе в зависимости 10^{-9} М селената натрия, 10^{-11} М ГБЛ и их смеси в питательной среде

Культура клеток в контроле характеризовалась максимальной долей (60%) круглых клеток, минимальной долей вытянутых клеток (2%). Дополнительно введенные в питательную среду соединения изменяли форму и размеры клеток культуры. Увеличение концентрации селенат-иона в среде повышало долю вытянутых клеток по сравнению с контролем. При увеличении содержания ГБЛ увеличивалась доля круглых клеток, но уменьшалась доля эллипсоидных. Введение селена в присутствии ГБЛ увеличивало долю круглых клеток.

Анализ действия широкого спектра концентраций ГБЛ и селенат-иона показал, что с увеличением их уровня увеличивался негативный эффект на прирост сырой биомассы клеточной культуры. Максимальный ингибирующий эффект наблюдали при концентрациях 10-7–10-5 М (рис. 3). При совместном действии на рост ГБЛ частично снимал ингибирующее действие селенат-иона.

Изучение биохимического состава каллусной культуры *S. orgaadayi* показало, что на 20-е сут культивирования в ней накапливались терпеноидные сапонины, содержание которых составило 0,4% от сухой массы. Добавление экзогенных соединений фитогормона ГБЛ и микроэлемента селената натрия в питательную среду одновременно с торможением роста каллуса увеличивало содержание исследуемой группы веществ относительно контроля (рис. 3). Повышение уровня сапонинов происходило 2-2,2-кратно при введении 10-7 и 10-5 М растворов ГБЛ и селенат-иона.

Пересчет содержания сапонинов на общую биомассу культуры клеток с учетом ее уменьшения на 20-25% свидетельствовал об увеличении выхода вторичного метаболита на 53-76% соответственно при действии 10^{-7} М селенат-иона и ГБЛ. Более высокая концентрация 10^{-5} М селенат-иона и ГБЛ снижала общий выход сапонинов, поскольку происходило существенное снижение биомассы культуры клеток.

Эффект селенат-ионов низкой концентрации оказывал негативное действие, как на рост, так и на накопление сапонинов. При совместном действии гормона и микроэлемента низкой концентрации снижался ингибирующий эффект ГБЛ на рост с сохранением темпов синтеза сапонинов на уровне контроля.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что селен влияет на активность ГБЛ в регуляции ростовых процессов, вероятно, изменяя оксидантный статус клетки. В то же время ГБЛ мог изменять поток селенат-ионов, поскольку известно, что одним из механизмов действия БР на рост клеток *Arabidopsis thaliana* в суспензионной культуре служит гиперполяризация плазматической мембраны, поддерживаемая деятельностью протонных насосов, анионных транспортеров и калиевых каналов. Показано, что ГБЛ и его прямой предшественник 28-гомокастастерон (ГКС) имели общие и специфические функции. Так, они однозначно замедляли потоки анионов, в то же время ГБЛ увеличивал выходящие из клетки потоки K^+, а ГКС замедлял их [16]. А поскольку селен транспортируется в виде селенат-анионов, то влияние ГБЛ на его поступление в клетку очень вероятно.

В проявление эффекта ГБЛ могло иметь значение и его взаимодействие с другими гормонами питательной среды (ауксинами и цитокининами). Для оптимального действия БР требуется определенное соотношение гормонов, поэтому с повышением уровня одного из гормонов необходимо повышение другого. Это предположение подтверждается данными, полученными другими авторами [17]. Стимулирующий эффект более активного БР брассинолида (БЛ) на рост клеток *Onosma paniculatum* в присутствии ИУК происходил при более низкой концентрации (10 пг/л), тогда как повышение уровня вторичного метаболита – шиконина – при более высокой концентрации (10^5-10^7 пг/л), поскольку активировались ферменты его синтеза. Кроме того, рост клеток уменьшался с увеличивающейся концентрацией БЛ при любой концентрации БАП в среде.

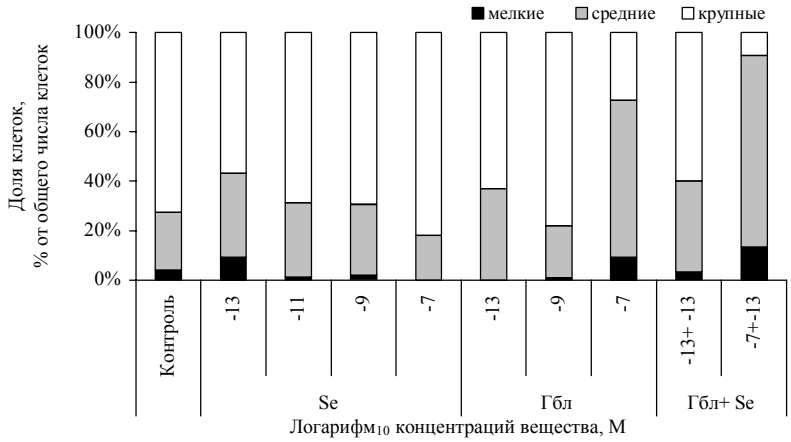

Рис. 2. Соотношение размеров клеток в каллусной культуре *S. orgaadayi* в зависимости от содержания селената натрия, ГБЛ и их смеси в питательной среде (n=150) на 20-е сут

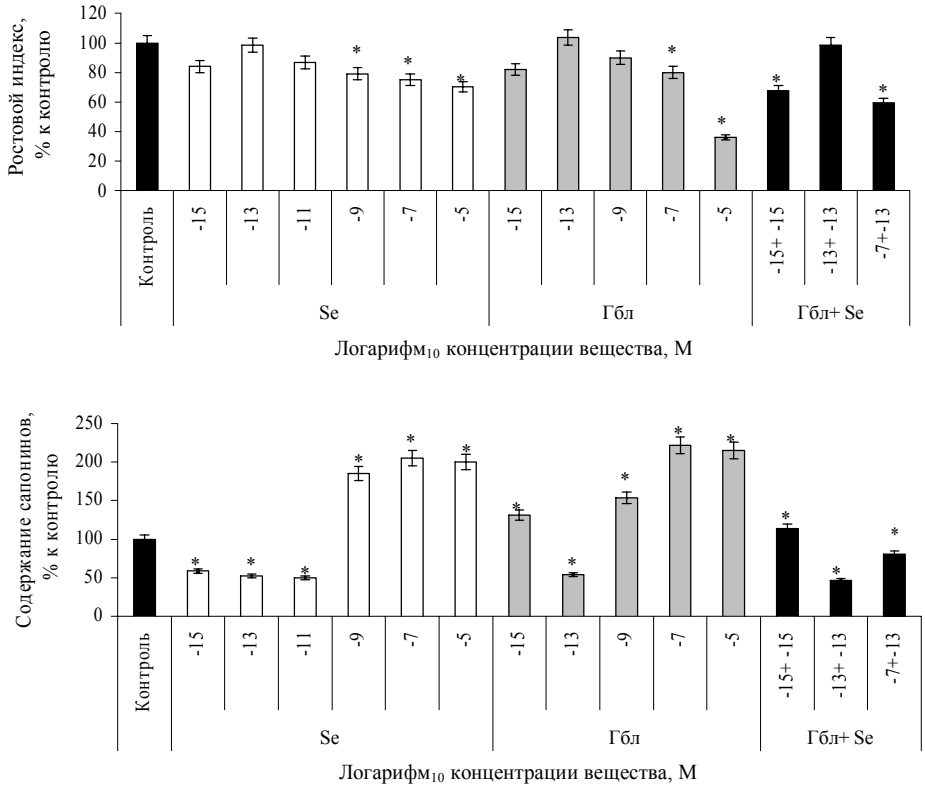

Рис. 3. Зависимость ростового индекса по сырой массе и содержания сапонинов в каллусе на 20-е сут от уровня селенат-иона (Se), ГБЛ и их смеси в питательной среде

Регуляция ростовых процессов культуры клеток *S. orgaadayi* осуществлялся как со стороны ауксинов, цитокининов и ГБЛ, так и со стороны селенат-иона. Кроме того, не исключено, что сами сапонины оказывали регуляторную роль в клетке, изменяя проницаемость растительных клеток, что могло быть связано с их поверхностной активностью, или проявлялась дозовая зависимость ростовых процессов, когда низкие концентрации сапонинов стимулировали, а большие, наоборот, ингибировали их.

Сопоставление ростовых характеристик и биохимических параметров каллусной культуры клеток показало, что более раннее завершение клеточного роста в присутствии ГБЛ приводило к активации вторичного метаболизма. Учитывая экономический эффект (мг биомассы/на 1 г сахарозы) можно рекомендовать введение 10^{-13} М ГБЛ в питательную среду для увеличения биомассы культуры, тогда как 10^{-7} М растворы ГБЛ или селената натрия – для повышения уровня вторичного метаболизма без существенной потери биомассы.

Таким образом, в результате наших исследований показана фенотипическая изменчивость клеток каллусной культуры в зависимости от уровня ГБЛ и селена. Полученные результаты свидетельствуют о взаимодействии селенат-ионов и ГБЛ в регуляции ростовых и метаболических процессов. В проявление эффекта ГБЛ могло иметь значение и его соот-

ношение с другими гормонами питательной среды. Исследованные регуляторы можно использовать для увеличения выхода биологически активных веществ клеточной культуры, а также для обогащения фармакологически значимыми веществами. Следует расширить спектр исследуемых брассиностероидов в сочетании с изменением комбинации других гормонов питательной среды.

Исследования поддержаны Госзаданием Минобрнауки России ВУЗам (№01201256295).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Запрометов М.Н.* Вторичный метаболизм в культурах клеток и тканей растений // Культура тканей растений. М.: Наука, 1981. С. 37-51.
2. *Бутенко Р.Г.* Клеточные технологии для получения экономически важных веществ растительного происхождения // Культура клеток растений и биотехнология. М.: Наука, 1986. С. 3-20.
3. *Носов А.М.* Регуляция синтеза вторичных соединений в культуре клеток растений // Биология культивируемых клеток и биотехнология растений. М: Наука, 1991. С. 5-18.
4. *Ramakrishna A., Ravishankar G.A.* Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants // Plant Signal Behav. 2011. V. 6 (11). P. 1720-1731.
5. *Khripach V., Zhabinskii V., De Groot A.* Twenty years of brassinosteroids: steroidal plant hormones warrant better crops for the XXI century // Ann. Bot. 2000. V. 86. P. 441-447.
6. *Карначук Р.А., Головацкая И.Ф., Ефимова М.В., Хрипач В.А.* Действие эпибрассинолида на морфогенез и гормональный баланс проростков арабидопсиса на зеленом свету // Физиология растений. 2002. Т. 49. № 4. С. 591-595
7. *Gomes M.M.A.* Physiological effects related to brassinosteroids application in plants // Brassinosteroids: a class of plant hormone / Eds S. Hayat and A. Ahmad. Springer. 2011. P. 193-242. DOI 10.1007/978-94-007-0189-2_5.
8. *Golovatskaya I.F.* Brassinosteroids and light–regulatory factors of growth and development of plants // Brassinosteroids: a class of plant hormone / Eds S. Hayat and A. Ahmad. Springer. 2011. P. 119-143. DOI 10.1007/978-94-007-0189-2_5.
9. *Головацкая И.Ф., Карначук Р.А., Кулагина Ю.М., Павлова Д.Г., Лаптев Н.И.* Способ обогащения селеном овощей и злаков // Патент России №2451442. М., 2012. Бюл. №15.
10. *Блинохватов А.Ф., Денисова Г.В., Ильин Д.Ю. и др.* Селен в биосфере. Пенза: РИО ПГСХА, 2001. 324 с.
11. *Golovatskaya I.F., Pavlova D.G., Kulagina Ju.M., Karnachuk R.A., Khripach V.A.* The physiological action of brassinosteroids depends on concentration of selenium in the medium // 20th Intern. Conf. on Plant Growth Substances IPGSA (28 June – 2 July 2010, Tarragona, Spain). PS05-38. P. 88–89.
12. *Golovatskaya I.F., Krachaleva A.V.* The role of different forms of selenium in regulating morphogenesis and content of biologically active substances of plants *Lactuca sativa* L. // Vestnik TGPU. 2011. V. 8(110). P. 85-88.
13. *Карначук Р.А., Дорофеев В.Ю., Гвоздева Е.С., Головацкая И.Ф., Чурин А.А., Суслов Н.И., Медведева Ю.В.* Влияние физиологически активных соединений на рост и уровень тритерпеновых сапонинов и флавоноидов клеточной культуры *Atragene speciosa* Weinm. // Вестник Томского гос. ун-та. Биология. 2008. № 3 (4). С. 48-54.
14. *Bajguz A.A., Tretyn A.* The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants // Phytochemistry. 2003. V. 62. P. 1027-1046.
15. *Ладыгина Е.Я., Сафронич Л.Н., Отряшенкова В.Э. и др.* Химический анализ лекарственных растений / Под ред. Н.И. Гринкевич, Л.Н. Сафронич. М.: Высшая школа, 1983. 176 с.
16. *Zhang Z.S., Ramirez J., Reboutier D., Brault M., Trouverie J., Pennarun A.M., Amiar Z., Biligui B., Galagovsky L., Rona J.P.* Brassinosteroids regulate plasma membrane anion channels in addition to proton pumps during expansion of *Arabidopsis thaliana* cells // Plant Cell Physiol. 2005. V. 46. P. 1494-1504.
17. *Yang Y.H., Huang J., Ding J.* Interaction between exogenous brassinolide, IAA and BAP in secondary metabolism of cultured *Onosma paniculatum* cells // Plant Growth Regul. 2003. V. 39 (3). P. 253-261.

REGULATION OF GROWTH AND SECONDARY METABOLISM OF *SAUSSUREA ORGAADAYI* CELL CULTURE BY 28-HOMOBRASSINOLIDE AND SELENIUM

©2013 I.F. Golovatskaya, N.A. Volodina

National Research Tomsk State University, Tomsk

The degree of variability of the cytomorphological characteristics and terpenoid saponin substances contents of *Saussurea orgaadayi* callus culture is determined. It is shown, that low concentration 28-homobrassinolide and sodium selenate support growth of culture whereas high – activate a secondary metabolism.

***Key words**: Saussurea orgaadayi, cell culture, 28-homobrassinolide, sodium selenate, terpenoid saponin.*

Irina Golovatskaya, Doctor of Biology, professor, e-mail: golovatskaya.irina@mail.ru; *Natalia Volodina*, magister