

**Р.А. Карначук, В.Ю. Дорофеев, Е.С. Гвоздева, И.Ф. Головацкая,
А.А. Чурин, Н.И. Суслов, Ю.В. Медведева**

**ВЛИЯНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ
НА РОСТ И УРОВЕНЬ ТРИТЕРПЕНОВЫХ САПОНИНОВ
И ФЛАВОНОИДОВ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ
ATRAGENE SPECIOSA WEINM.**

Работа поддержана грантом ФЦНТП (Государственный контракт
№ 02.512.11.2220 от 4 июля 2008 г.)^{*}

Аннотация. Получены клеточные культуры *Atragene speciosa* Weinm. (княжик сибирский) *in vitro*, обладающие стабильной скоростью роста для дальнейшего исследования фармакологической активности экстракта на их основе. Оптимизирован состав питательной среды для активного роста клеточных культур княжика сибирского *in vitro*, полученных на основе эксплантов боковых почек и стебля годичных побегов дикорастущих интактных растений *Atragene speciosa* Weinm. С целью оптимизации продукционного процесса исследовано влияние жасмоновой кислоты, 24-эпибрассинолида. Показана эффективность 24-эпибрассинолида гуминовых кислот, препарата «Силк» на накопление тритерпеновых сапонинов и флавоноидов. Содержание тритерпеновых сапонинов в культуре клеток сопоставимо с уровнем этих веществ в интактном дикорастущем растении.

Ключевые слова: *Atragene speciosa*, клеточная культура, *in vitro*, тритерпеновые гликозиды.

Княжик сибирский (*Atragene speciosa* Weinm.) – многолетняя лиана флоры Сибири. Необходимость введения этого вида в асептическую культуру *in vitro* обусловлена возможностью получения физиологически активных веществ (тритерпеновых гликозидов – сапонинов, фенолоспиртов и их гликозидов, флавоноидов) для создания в дальнейшем ноотропного и адаптогенного фитопрепарата. *Atragene speciosa* Weinm. – вид с азиатским ареалом, природные заросли которого разрежены и занимают небольшие площади, а интродукция, в связи с морфологическими особенностями стебля, затруднена.

Важным моментом при культивировании клеточных культур является оптимизация продукционного процесса добавлением в питательную среду физиологически активных соединений, в том числе гормонов. При этом особое внимание уделяется регуляторам роста (жасмоновая кислота, 24-эпибрассинолид, гуминовые кислоты и др.).

^{*} Статья В.Ю. Дорофеева, Р.А. Карначук, И.В. Шиловой «Элементный состав клеток калусной культуры княжика сибирского (*Atragene speciosa* Weinm.) *in vitro*», опубликованная в Вестнике Томского государственного университета. Биология. 2008. № 2 (3) (С. 12–17), написана по материалам исследований, поддержанных грантом ФЦНТП (Государственный контракт № 02.512.11.2220 от 4 июля 2008 г.).

Авторы данной работы исследовали регуляторное действие жасмоновой кислоты (ЖК), 24-эпибрассинолида (ЭБ), гуминовых кислот (ГК) и препарата «Силк» (в настоящее время препарат зарегистрирован под торговым названием «Новосил»), полученного на основе отходов производства пихтовой древесины (опил, кора и хвоя). Эффект жасмонатов проявляется специфически в каждой конкретной культуре клеток в зависимости от вида растения, линии или штамма клеток, питательной среды и других условий культивирования [1, 2].

Объект и методики исследования

Объектами исследования служила изолированная культура каллусных клеток княжика сибирского *in vitro*, полученная на кафедре физиологии растений и биотехнологии Томского госуниверситета из эксплантов молодых листьев дикорастущего растения (Республика Хакасия, Ширинский район). Вторая линия получена на основе эксплантов боковых почек и стебля годичных побегов дикорастущих интактных растений *A. speciosa* (г. Томск, окрестности поселка Степановка). Линии каллусной культуры использовали для получения суспензионных культур клеток *A. speciosa* с целью дальнейшего масштабирования технологии в биореакторе.

Индукция каллусогенеза проводилась на среде Мурасиге–Скуга (МС) с добавлением гормонов 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) и 6-бензиламинопурина (БАП) в темноте. Каллусную культуру выращивали на агаризованной среде МС с добавлением витаминов (тиамин-НСI, пиридоксин-НСI 0,5, никотиновая кислота-НСI 0,5); мезоинозита; пантотената Са; гидролизата казеина; глицина; глюкозы; рН среды 5,8. Для оптимизации роста добавляли фитогормоны в разных концентрациях (2,4-Д, НУК и БАП).

Культуру клеток, выращенную на среде с 2,4-Д, имеющую рыхлую структуру и достаточно высокую интенсивность роста по сухой биомассе, использовали для получения суспензии клеток путём переноса рыхлого каллуса в жидкую среду того же состава. Колбы с культурами размещали на орбитальном шейкере UNIMAX 2010 (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Германия; период колебаний 100 об/мин). При переносе каллуса на жидкую питательную среду без CaCl_2 в колбы первоначально образовывались крупноагрегированные комплексы в суспензии, а диаметр некоторых глобул достигал 2–3 мм и более. При последующем субкультивировании в колбах суспензия отбиралась по типу мелкой агрегированности.

С целью дальнейшей оптимизации условий выращивания и получения наибольшего выхода биологически активных веществ клеточной культуры *A. speciosa* в питательную среду добавляли ЖК в концентрациях 10^{-6} – 10^{-9} М; ЭБ в концентрациях 10^{-6} – 10^{-12} М; ГК в концентрациях 10^3 – $10^5\%$; препарат «Силк» в концентрациях 0,04 и 0,08 мл/л.

Прирост сырой биомассы оценивали в % по общепринятому показателю – ростовому индексу. Определяли среднюю конечную и среднюю начальную массу клеток культуры *in vitro*, а после высушивания клеток при температуре 50–55°C до воздушно-сухого состояния – сухую массу.

Жизнеспособность культуры устанавливали по стандартной методике путём окрашивания клеток метиленовым синим [3]. Количество клеток считали в камере Фукса–Розенталя [4].

Микроскопический анализ крупноагрегированной суспензии проводили после мацерации в смеси 0,2% целлюлазы и 0,2% пектиназы (1:1) в течение 1 ч при 26°C. Для получения изотонического раствора добавляли маннит (90 г/л) и CaCl_2 (1,480 г/л). Измеряли размеры клеток для определения их объёма [5].

Результаты и их обсуждение

Переход к суспензионным культурам вызван тем, что при таком режиме культивирования, как правило, происходит интенсификация ростовых процессов, а в ряде случаев увеличивается биосинтетический потенциал культур. Суспензионные культуры сохраняют ряд свойств, характерных для исходного организма. Одним из таких свойств является способность к синтезу вторичных метаболитов [6, 7].

Поскольку суспензионная культура клеток этого вида получена впервые, начальным этапом работы была оптимизация условий выращивания, изучение её цитологических и физиологических характеристик, в частности размера клеток, агрегированности, скорости роста суспензии, оптимального времени субкультивирования. По мере увеличения количества пассажей улучшались ростовые характеристики суспензионной культуры, сокращалось время максимального накопления массы клеток, увеличивалась концентрация и повышалась жизнеспособность культуры (табл. 1).

Таблица 1

Ростовые характеристики суспензионной культуры *Atragene speciosa* Weinm.
(среднее значение $\pm m$)

Характеристики	Среда МС (2,4-Д; БАП)		Среда МС (НУК; БАП)	
	3-й пассаж	5-й пассаж	3-й пассаж	5-й пассаж
Жизнеспособность клеток, %	63 $\pm$ 3	76 $\pm$ 2*	58 $\pm$ 2	61 $\pm$ 4*
Плотность клеток, кол-во клеток/мл	3,5 $\cdot$ 10 ⁴	4,8 $\cdot$ 10 ⁶ *	2,3 $\cdot$ 10 ⁴	2,7 $\cdot$ 10 ⁵ *
Содержание сухой массы в клетках, %	4,5 $\pm$ 0,3	5,2 $\pm$ 0,2*	3,8 $\pm$ 0,2	4,5 $\pm$ 0,2
Время максимального накопления массы, сут	20 $\pm$ 3	16 $\pm$ 3*	30 $\pm$ 2	27 $\pm$ 3*

Примечание. МС – среда Мурасиге–Скуга; 2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота; НУК – α -нафтилуксусная кислота; БАП – 6-бензиламинопурин; * $p < 0,05$.

Клеточная культура княжика сибирского способна как в каллусе, так и суспензии синтезировать тритерпеновые гликозиды и флавоноиды в условиях *in vitro*. В каллусной культуре клеток обнаружено содержание тритерпеновых сапонинов (1,19 $\pm$ 0,02 г на 100 г сухой массы; для сравнения: в надземной части дикорастущего интактного растения – 1,00 $\pm$ 0,01 г).

Количество флавоноидов дикорастущего княжика сибирского: в листьях – 6,09; в стеблях – 1,64%; в корнях – 0,83%; в надземной части растения в период цветения и плодоношения – 0,26% [8]. Максимальное содержание флавоноидов (5,15%) в каллусной культуре со 2-го по 6-е субкультивирование сопоставимо с их количеством в листьях интактного растения (6,09%), что позволяет говорить о сохранении способности к накоплению данных соединений в культуре *in vitro*.

Проведены исследования по влиянию ЖК на рост клеток в условиях твердой и жидкой питательных сред. Установлено, что ее концентрация 10^{-9} М приводит к снижению ростовых показателей каллусной культуры (табл. 2). Начиная с 17-х суток проявлялся ингибирующий эффект во всех диапазонах концентраций, что приводило к снижению прироста биомассы каллуса в конце субкультивирования (рис. 1). Жасмоновая кислота (при концентрации 10^{-6} и 10^{-9} М) оказывала ингибирующий эффект на клеточную суспензию 5-го и 6-го субкультивирований княжика сибирского (табл. 3).

Таблица 2

Ростовые характеристики каллусной культуры *Atragene speciosa* Weinm. на среде с жасмоновой кислотой 5-го субкультивирования (среднее значение $\pm$ m)

Параметры роста	Варианты выращивания			
	в колбах		в пробирках	
	Контроль	ЖК, 10^{-9} М	Контроль	ЖК, 10^{-9} М
Индекс роста	2,44 $\pm$ 0,02	1,50 $\pm$ 0,02*	2,65 $\pm$ 0,37	1,73 $\pm$ 0,12*
Сухая масса, мг	3,67 $\pm$ 0,21	2,57 $\pm$ 0,11*	3,76 $\pm$ 0,21	2,54 $\pm$ 0,08*

* Различия достоверны с контролем при $p < 0,05$.

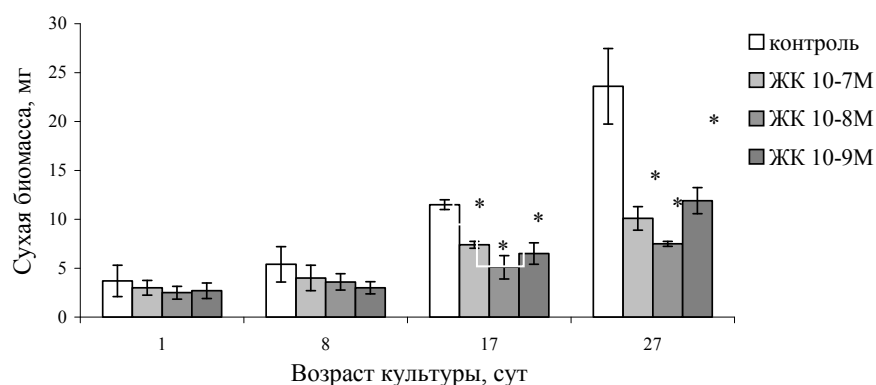


Рис. 1. Динамика роста клеточной культуры *Atragene speciosa* Weinm. 70-го субкультивирования с жасмоновой кислотой.

* Различия достоверны с контролем при $p < 0,05$

Таблица 3

Ростовые характеристики суспензионной культуры *Atragene speciosa* Weinm. на среде с жасмоновой кислотой (среднее значение $\pm m$)

Параметры роста	№ пассажа	Концентрация		
		Контроль	ЖК, М	
			10^{-6}	10^{-9}
Индекс роста	5	1,58 $\pm$ 0,07	0,86 $\pm$ 0,03*	1,34 $\pm$ 0,04*
	6	2,04 $\pm$ 0,03	0,95 $\pm$ 0,07*	1,27 $\pm$ 0,07*
Сухая масса, мг	5	5,22 $\pm$ 0,05	1,53 $\pm$ 0,12*	2,63 $\pm$ 0,13*
	6	5,71 $\pm$ 0,02	1,58 $\pm$ 0,07*	2,74 $\pm$ 0,07*

* Различия достоверны с контролем при $p < 0,05$.

В последние годы внимание исследователей привлекает такой регулятор роста, как эфирбрасинолид (ЭБ) – класс фитогормонов с широким спектром биологической активности [9]. Существует сравнительно немного данных по исследованию действия ЭБ на культуры тканей растений, причем эффекты, как правило, противоречивы [10–12]. В экспериментах на культуре *A. speciosa* было исследовано действие ЭБ в широком диапазоне концентраций. Только в концентрации 10^{-9} М ЭБ существенно влиял на рост каллуса и суспензионной культуры (табл. 4, 5). Добавление в среду ЖК и ЭБ в концентрации 10^{-8} М также стимулировало образование высокополярных тритерпеновых сапонинов. В суспензионной культуре княжика сибирского десятого субкультивирования обнаружено восемь высокополярных сапонинов.

Таблица 4

Ростовые характеристики каллусной культуры *Atragene speciosa* Weinm. 5-го субкультивирования на среде с 24-эфирбрасинолидом (среднее значение $\pm m$)

Параметры роста	Варианты выращивания			
	в колбах		в пробирках	
	Контроль	ЭБ, 10^{-9} М	Контроль	ЭБ, 10^{-9} М
Индекс роста	2,44 $\pm$ 0,02	3,65 $\pm$ 0,03*	2,65 $\pm$ 0,37	4,76 $\pm$ 0,07*
Сухая масса, мг	3,67 $\pm$ 0,21	5,31 $\pm$ 0,23*	3,76 $\pm$ 0,21	7,53 $\pm$ 0,24*

* Различия достоверны с контролем при $p < 0,05$.

Таблица 5

Ростовые характеристики суспензионной культуры *Atragene speciosa* Weinm. на среде с 24-эфирбрасинолидом (среднее значение $\pm m$)

Параметры роста	№ пассажа	Концентрация		
		Контроль	ЭБ, М	
			10^{-6}	10^{-9}
Индекс роста	5	1,58 $\pm$ 0,07	1,57 $\pm$ 0,05	2,56 $\pm$ 0,12*
	6	2,04 $\pm$ 0,03	1,63 $\pm$ 0,02*	2,44 $\pm$ 0,09*
Сухая масса, мг	5	5,22 $\pm$ 0,05	3,87 $\pm$ 0,11*	5,84 $\pm$ 0,13*
	6	5,71 $\pm$ 0,02	4,35 $\pm$ 0,09*	6,17 $\pm$ 0,11*

* Различия достоверны с контролем при $p < 0,05$.

Использование новых стимуляторов роста растений находит применение при выращивании клеточных культур *in vitro*. ГК применяют для стимуляции каллусообразования рапса (*Brassica napus* L.) и регенерации побегов и корней люцерны (*Medicago varia* Mart.) [13]. Показано, что «Силк» повышает иммунитет растений, снижая заболеваемость в 2–5 раз. Системное действие «Силка» приводит к существенному увеличению урожайности растений [14]. В наших опытах наибольший прирост сырой биомассы каллуса княжика сибирского отмечен на среде с ГК в концентрациях 10^{-3} и $10^{-4}\%$. Клеточная культура 15-го субкультивирования на среде с добавлением препарата «Силк» также имела существенный прирост по сравнению с контролем (табл. 6). Под влиянием препарата «Силк» происходило накопление малополярных сапонинов.

Т а б л и ц а 6

Ростовой индекс *Atragene speciosa* Weinm. 15-го субкультивирования на среде с гуминовыми кислотами и препаратом «Силк», % (среднее значение $\pm$ m)

Компонент питательной среды					
Контроль	ГК ($10^{-3}\%$)	ГК ($10^{-4}\%$)	ГК ($10^{-5}\%$)	«Силк» (0,04 мл/л)	«Силк» (0,08 мл/л)
145 $\pm$ 0,4	333 $\pm$ 0,2*	332 $\pm$ 0,5*	161 $\pm$ 0,3	278 $\pm$ 0,4*	247 $\pm$ 0,2*

Примечание. Контроль – отсутствие гуминовых кислот (ГК) и препарата «Силк» в питательной среде; БАП – 6-бензиламинопури. * Различия достоверны с контролем при $p < 0,05$.

Таким образом, впервые получена каллусная и суспензионная культуры *A. speciosa*, обладающие стабильной скоростью роста, для которых была подобрана среда и оптимизирован режим культивирования. Время максимального накопления биомассы суспензионной культуры составляло 16–20 сут, а плотность суспензии – $4,8 \cdot 10^6$ клеток/мл.

Полученные результаты позволяют говорить о необходимости дальнейшего изучения перспективного продуцента – клеточной культуры княжика сибирского *in vitro* – физиологически активных веществ для создания фитопрепарата ноотропного и адаптогенного действия.

Литература

1. Debeljak N., Regvar M., Dixon K.W., Sivasithamparam K. Induction of tuberisation in *in vitro* with jasmonic acid and sucrose in an Australian terrestrial orchid, *Pterostylis sanguinea* // Plant Growth Regulation 36. 2002. P. 253–260.
2. Parthier B. Jasmonates, new regulators of plant growth and development: many facts and few hypotheses on their actions // Bot. Acta. 1991. Vol. 104. P. 446–454.
3. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. М.: Агропромиздат, 1988. 271 с.
4. Головацкая И.Ф. Карначук Р.А. Регуляторная роль света в процессах фотосинтеза и роста лекарственных растений // Теоретические и практические аспекты изучения лекарственных растений. Томск: Сибирский госмедуниверситет, 1996. С. 49–51.
5. Мокроносов А.Т. Березенкова Р.А. Методика количественной оценки структуры и функциональной активности фотосинтезирующих тканей и органов // Практикум по прикладной ботанике, генетике и селекции. 1978. Т. 61, вып. 3. С. 119–133.
6. Simmonds D., Setterfield G., Brown D.L. Organization of microtubules in dividing and elongating cells of *Vicia hajastana* Grossh. in suspension culture // Eur. J. Cell Biol. 1983. Vol. 32, № 1. P. 54–66.

7. Svatos A., Macek T. The rate production in suspension cultured cells of the fern *Pteridium aquilinum* // Phytochem. 1994. Vol. 35, № 3. P. 651–564.
8. Шилова И.В., Краснов Е.А., Суслов Н.И. Химико-фармакологическое изучение активной фракции *Atragene speciosa* Weinm. // Бюллетень СО РАМН. Новосибирск. 2001. № 3 (101). С. 44–49.
9. Khripach V.A., Zhabiunskii V.N. Groot Ae de Brassinosteroids: a new class of Plant Hormones. San Diego: Academic Press, 1999. 456 p.
10. Ikekawa N., Zhao Y.I. Application of 24-Epibrassinolide in Agriculture // J. Am. Chem. Soc. Meeting Abstracts. 1991. Vol. 474. P. 292.
11. Verpoorte R., Cosmo F. Di, Misava M. Plant Cell Culture Secondary Metabolism / Eds. Boca Raton. New York; London; Tokio: The CRS Press, 1996. Chapter 9. 660 p.
12. Roddick I.G., Rintrberg A.L., Ikekawa N. Developmental Effects of 24-Epibrassinolide in Excised Roots of Tomato Grown *in vitro* // Physiol. Plant. 1993. Vol. 87. P. 453–458.
13. Комисарова И.Д., Грехова И.В. Применение гуминового препарата «Росток» // Материалы конференции «Высокие технологии добычи, глубокой переработки и использования озерно-болотных отложений» (12–15 марта 2003 г.). 2003. С. 131–135.
14. Ларионов Г.И. Влияние препарата «Силк» на урожайность пшеницы и ячменя // Сельскохозяйственные вести. 2002. № 1. С. 55–59.