

УДК 582.675.1.086.83.:547.91

ВЛИЯНИЕ СЕЛЕНА НА РОСТОВЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ *FATSHEDERA LIZEI* И НАКОПЛЕНИЕ В НЕЙ ТРИТЕРПЕНОВЫХ ГЛИКОЗИДОВ

Чмелева С.И., Омельченко А.В., Панов Д.А., Ширина А.О.

Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Украина
E-mail: cmelevasiv@ukr.net

Приведены данные о влиянии различных концентраций селенита натрия на ростовые показатели *Fatshedera lizei* в культуре *in vitro*. Подобраны модификации питательных сред Мурасиге и Скуга с добавлением Na_2SeO_3 для каллусогенеза. Получены экспериментальные доказательства о присутствии в каллусных культурах различных фракций тритерпеновых гликозидов, аналогичных интактному растению.

Ключевые слова: *Fatshedera lizei*, каллусная культура, индекс роста, селен, тритерпеновые гликозиды.

ВВЕДЕНИЕ

Одной из проблем метода культуры тканей и клеток высших растений в аспекте получения ценных вторичных метаболитов является низкий конечный выход продукта.

Актуальным при использовании культуры *in vitro* представляется поиск условий, при которых обеспечивался бы оптимальный рост биомассы и максимальное накопление в ней веществ вторичного метаболизма. Основными факторами, регулирующими эти процессы в культуре *in vitro* являются регуляторы роста растений, а также соотношение макро – и микроэлементов в питательной среде [1–3].

Исследования последних лет показали, что на ростовые характеристики каллусной культуры может оказывать влияние внесение в среду культивирования соединений селена. В научной литературе имеются данные и по аккумуляции селена микроводорослями, а также некоторыми высшими растениями [4–6].

Среди веществ вторичного метаболизма значительный интерес представляют различные гликозиды, проявляющие широкий спектр фармакологического действия. *Fatshedera lizei* – гибрид, полученный при скрещивании видов *Fatsia japonica* «Moseri» и *Hedera helix* var. *hiberica* (семейство *Araliaceae*) – *Fatshedera* (X). Данное растение содержит тритерпеновые гликозиды, для которых был установлен широкий спектр биологической активности, в том числе антигрибковая, ихтиотоксическая, антивирусная, антираковая, антимуtagenная и ряд других [7–10].

В связи с изложенным, целью исследований явилось изучение влияния микроэлемента селена на ростовые характеристики *Fatshedera lizei* – в культуре *in vitro* и накопление в ней тритерпеновых гликозидов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследований служили вегетативные органы *Fatshedera lizei*, культивируемые в условиях закрытого грунта. Растения содержали в вегетационных сосудах объемом 5 л, в субстрате, состоящем из смеси почвы, песка, керамзита и перлита. В качестве инициальных эксплантов использовали листовые черешки и фрагменты ювенильных листьев. Для соблюдения условий асептики работу по введению в изолированную культуру выполняли в условиях ламинарного бокса. Поверхностную стерилизацию материала проводили гипохлоридом натрия (5 мин) с последующей промывкой в автоклавированной дистиллированной воде. Экспланты культивировали на агаризованных модифицированных питательных средах Мурасиге и Скуга (МС) [11], дополненных 2,4-Д (2,4-дихлорфенилуксусная кислота) – 2,0 мг/л, 6-БАП (6-бензиламинопурин) – 0,5 мг/л, кинетином – 0,5 мг/л и селенидом натрия в различных концентрациях. В питательные среды добавляли селенит натрия (Na_2SeO_3) в качестве источника Se(IV) в концентрациях 0,5; 1,0; 2,0; 5,0 мг/л. Цикл выращивания культур составлял 60-90 суток. В качестве культуральных сосудов использовали пробирки 2x20 см, содержащие 15 мл питательной среды. На каждый вариант питательной среды было высажено по 30 эксплантов определенного типа в 3-х кратной повторности. Экспланты культивировали при температуре 23-25°C, освещенности 4-5 клк и 16-часовом фотопериоде. Частоту каллусообразования оценивали в процентах по количеству эксплантов, давших каллус, от общего числа эксплантированных. Индекс роста (соотношение среднего объема каллусной культуры к исходному объему каллуса) определяли морфометрическим методом [12]. Результаты исследований были обработаны статистически с помощью программы Microsoft Office Excel 2007.

Для химического анализа на содержание тритерпеновых гликозидов каллусные культуры, находящиеся в стационарной фазе роста, извлекали из культуральных сосудов и высушивали при комнатной температуре. Воздушно-сухую массу тщательно измельчали и экстрагировали 80 % изопропиловым спиртом. Для определения тритерпеновых гликозидов использовали тонкослойную хроматографию (ТСХ) на пластинках «Silufol», в нейтральной системе растворителей хлороформ-метанол-вода (100:40:7). Детектирование фракций тритерпеновых гликозидов на хроматограммах осуществляли 10 % спиртовым раствором фосфорновольфрамовой кислоты с добавлением 2% параоксибензальдегида с последующим нагреванием хроматограмм при 100-120°C. В качестве контроля использовали водно-спиртовые экстракты из листьев *Fatshedera lizei* [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования по влиянию Na_2SeO_3 на индукцию каллусогенеза в культуре вегетативных органов *Fatshedera lizei* показали, что каллусогенез зависел от концентрации Se^{2+} в питательной среде и не зависел от типа используемого экспланта (табл. 1). Во всех исследуемых вариантах с применением селена наблюдался каллусогенез, при этом максимальная частота (97,1–97,3 %) установлена нами на питательной среде МС3, дополненной 1,0 мг/л Na_2SeO_3 .

Высокая частота каллусообразования как для ювенильных листьев, так и для листовых черешков (93,1–94,9 %) нами была установлена и на питательной среде МС2 и МС4, дополненных 0,5 и 2,0 мг/л селена, соответственно, а также в вариантах без добавления селена (94,0–95,2). При этом, между опытными и контрольными вариантами достоверной разницы нами не отмечено.

Таблица 1
Зависимость частоты каллусообразования от типа экспланта и состава питательной среды

Тип экспланта	Питательная среда	Концентрация фитогормонов в питательной среде, мг/л				Концентрация Na ₂ SeO ₃ , мг/л	Частота каллусообразования, % ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)
		2,4-Д	6-БАП	кинетин	ИУК		
Фрагменты ювенильных листьев	МС1	2,0	0,5	0,5	-	0	95,2±2,1
Фрагменты листовых черешков							94,0±2,1
Фрагменты ювенильных листьев	МС2	2,0	0,5	0,5	-	0,5	94,7±2,0
Фрагменты листовых черешков							94,9±2,0
Фрагменты ювенильных листьев	МС3	2,0	0,5	0,5	-	1,0	97,3±1,3
Фрагменты листовых черешков							97,1±1,3
Фрагменты ювенильных листьев	МС4	2,0	0,5	0,5	-	2,0	94,2±1,7
Фрагменты листовых черешков							93,1±1,7
Фрагменты ювенильных листьев	МС5	2,0	0,5	0,5	-	5,0	73,2±3,2
Фрагменты листовых черешков							71,2±3,2

При добавлении в питательную среду 5,0 Na₂SeO₃ мг/л частота каллусообразования была достоверно снижена и составила для ювенильных листьев 73,2 %, а для листовых черешков – 71,2 %, соответственно (табл. 1).

Первые признаки каллусогенеза при введении различных типов эксплантов в условия *in vitro* отмечались на 10–14 сутки культивирования, независимо от состава питательной среды и от типа экспланта.

Каллус, индуцированный из эксплантов разного типа, имел светлую, слегка желтоватую окраску и характеризовался плотной консистенцией (рис. 1).

После 45 суток культивирования каллус пересаживали на свежую питательную среду. Для пассирования каллуса, индуцированного в культуре фрагментов ювенильных листьев и фрагментов листовых черешков использовали среды, на которых частота каллусообразования была наибольшей (табл. 1).

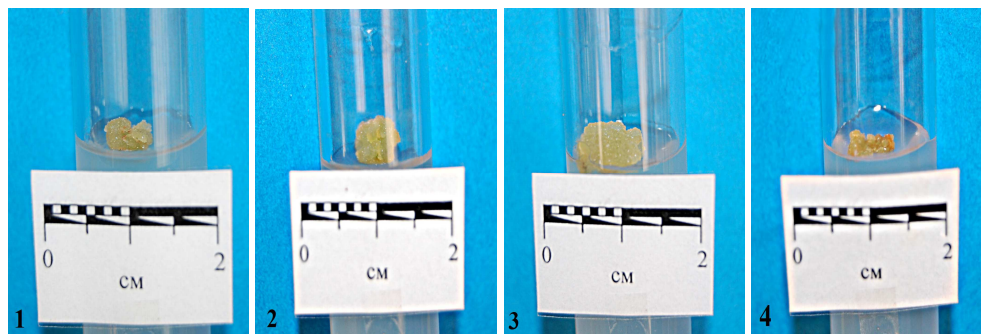


Рис. 1. Первичная каллусная ткань *Fatshedera lizei*, культивируемая на модифицированных питательных средах (30 суток) с добавлением Na_2SeO_3 : 1 – 0,5 мг/л Se; 2 – 1,0 мг/л Se; 3 – 2,0 мг/л Se; 4 – 5,0 мг/л Se.

Анализируя данные по влиянию селена на ростовые характеристики клеточных культур *Fatshedera lizei* нами было установлено, что при содержании в питательной среде Se^{2+} в концентрациях 0,5 и 1,0 мг/л индекс роста каллусной культуры повышался в 1,3–1,4 раза по сравнению с контрольным вариантом (рис. 2).

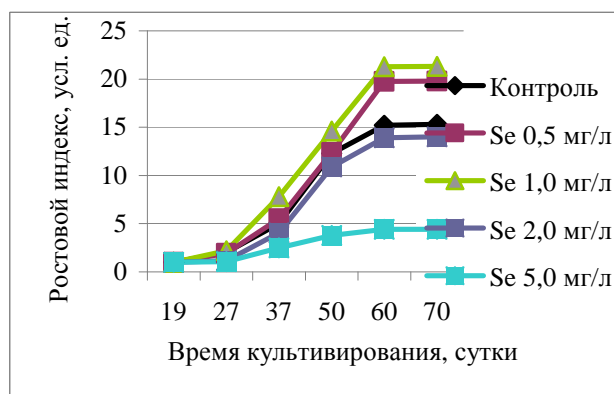


Рис. 2. Ростовой индекс каллусной культуры *Fatshedera lizei*, культивируемой на модифицированных питательных средах с добавлением Na_2SeO_3 .

При добавлении в питательную среду 5,0 мг/л селена было установлено, что при данной концентрации микроэлемента наблюдается достоверное снижение ростовой активности клеточных культур в 3,4 раза по сравнению с контролем (рис. 2).

При химическом анализе интактного материала *Fatshedera lizei* было выявлено 5 различных фракций тритерпеновых гликозидов, имеющие в качестве агликона – хедерагенин (сине-фиолетовые хроматографические зоны: **B**, **D**, **E**, **F** и **H**) и 3 фракции тритерпеновых гликозидов – олеаноловой кислоты (розовые хроматографические зоны: **A**, **C** и **G**). По ТСХ фракции гликозидов идентифицированы с заведомо известными образцами гликозидов. Установлено, что фракции **A** и **B** представляют собой 3-*O*- α -*L*-арабинопиранозиды олеаноловой кислоты (1) и хедерагенина (2), соответственно. Фракции **C** и **D** – 3-*O*- β -*D*-глюкопиранозил-(1 \rightarrow 2)-*O*- α -*L*-арабинопиранозиды

олеаноловой кислоты (3) и хедерагенина (4), соответственно. Фракция **Е** представляет собой 28-О-β-D-глюкопиранозильный эфир 3-О-β-D-глюкопиранозил-(1→2)-О-α-L-арабинопиранозида хедерагенина (5). Фракция **Г** – 28-О-α-L-рамнопиранозил-(1→4)-β-D-глюкопиранозил-(1→6)-О-β-D-глюкопиранозильный эфир 3-О-α-L-арабинопиранозида хедерагенина (6). Фракции **Г** и **Н** представлены 28-О-α-L-рамнопиранозил-(1→4)-β-D-глюкопиранозил-(1→6)-О-β-D-глюкопиранозильными эфирами 3-О-β-D-глюкопиранозил-(1→2)-О-α-L-арабинопиранозидов олеаноловой кислоты (7) и хедерагенина (8), соответственно (Рис. 3). Данные гликозиды ранее были выделены из различных видов растений семейства Аралиевых.

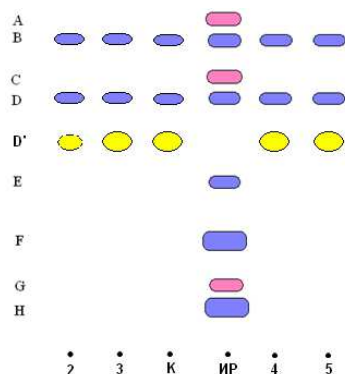
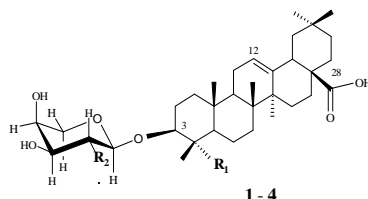


Рис. 3. Схема распределения гликозидных фракций из листьев интактных растений и каллусных культур растения *Fatshedera lizei*, культивируемых на модифицированных питательных средах с добавлением Na_2SeO_3 .

- К – концентрация Se^{2+} в среде – 0 мг/л (контроль);
- 2 – концентрация Se^{2+} в среде – 0,5 мг/л;
- 3 – концентрация Se^{2+} в среде – 1,0 мг/л;
- 4 – концентрация Se^{2+} в среде – 2,0 мг/л;
- 5 – концентрация Se^{2+} в среде – 5,0 мг/л.

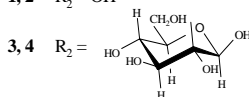
Анализ каллусных культур на содержание тритерпеновых гликозидов показал, что наличие в питательной среде Se^{2+} в разной концентрации не оказывает существенного влияния на синтез как тритерпеновых, так и фенольных гликозидов (**D***). В образцах каллусных культур не наблюдаются фракции гликозидов олеаноловой кислоты (фракции **A** и **C**), однако данный факт может и не быть связан с присутствием Se^{2+} т.к. в контрольном образце эти фракции также отсутствуют.

При химическом анализе каллусных культур нами установлено, что они отличаются от интактных эксплантов по фракционному составу исследуемых веществ и при этом продуцируются преимущественно монодесмозидные гликозиды, содержащие углеводный компонент только по атому агликона С-3. При анализе каллусных культур, культивируемых на питательных средах с различным содержанием селена, нами были идентифицированы только 2 фракции гликозидов (**B** и **D**).



1, 2 R₂ = OH

3, 4 R₂ =



1, 3 R₁ = CH₃

2, 4 R₁ = CH₂OH

Таким образом, проведенные исследования позволили подобрать составы питательных сред с содержанием селена для индукции каллусогенеза из эксплантов вегетативных органов растения *Fatshedera lizei*. Химический анализ каллусных культур показал присутствие в них различных фракций тритерпеновых гликозидов. Изложенные результаты подтверждают уже известные факты о возможности получения клеточных культур растений, накапливающих тритерпеновые гликозиды. Так, в последние годы удалось получить экспериментальные доказательства о содержании тритерпеновых гликозидов в каллусных и суспензионных клеточных культурах *Ginkgo biloba* L., *Atroгене sibirica* L., *Ycca macrocarpa* Englem, *Dioscorea deltoidea* W., *Clematis vitalba* L., *Nerium oleander* L. При этом было показано, что биосинтез гликозидов зависит от типа экспланта, способности к гистогенезу, условий культивирования и состава питательной среды.

Поскольку исследований по получению каллусных культур *Fatshedera lizei* на модифицированных питательных средах Мурасиге и Скуга с различными концентрациями селена и анализа их на тритерпеновые гликозиды ранее не проводилось, настоящая работа является первым экспериментальным доказательством получения каллусных культур данного вида, содержащих спектр тритерпеновых гликозидов, аналогичных интактному растению.

ВЫВОДЫ

1. Подобраны составы питательных сред с различными концентрациями селена для индукции каллусогенеза и получения каллусной культуры из эксплантов вегетативных органов *Fatshedera lizei*.
2. Показана зависимость изменения величины индекса роста каллусной культуры от различных концентраций селена в питательных средах Мурасиге и Скуга.
3. Установлено, что каллусные культуры из эксплантов ювенильных листьев и листовых черешков *Fatshedera lizei* содержат тритерпеновые гликозиды, характерные для интактного растения.

Список литературы

1. Левенко Б.А. Биотехнология растений: сегодня и завтра / Б.А. Левенко // Физиология и биохимия культурных растений. – 1999. – Т 32. – № 3. – С. 163–171.

2. Бутенко Р.Г. Клеточные технологии для получения экономически важных веществ растительного происхождения / Р.Г. Бутенко // Культура клеток растений и биотехнология. – М. : Наука, 1986. – С. 3–20.
3. Носов А.М. Регуляция синтеза вторичных соединений в культуре клеток растений / А.М. Носов // Биология культивируемых клеток и биотехнология растений. – М. : Наука, 1991. – С. 5–20.
4. Тамбиев А.Х. Аккумуляция селена микроводорослями и цианобактериями / А.Х. Тамбиев, Н.Н. Кирикова // Экология моря. – 2000. – Вып. 54. – С. 38.
5. Солдатов С.А. Влияние селената натрия на рост, развитие и проявление пола у двудомных растений конопли: *Cannabis sativa* L. 2005 [Электронный ресурс]. – Режим доступа к статье: <http://www.dissercat.com>.
6. Тайкова В.П. Влияние селена на ростовые характеристики *Astragalus dasyanthus* (Pall.) в культуре *in vitro* / В.П. Тайкова, Л.М. Теплицкая // Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2010. – Т. 23 (62). – № 2. – С. 157–162.
7. Гришковец В.І. Тритерпенові глікозиди аралівих: виділення, встановлення будови, біологічна активність та хемотаксономічне значення : автореф. дис... д-ра хім. наук : 02.00.10 / Гришковец Володимир Іванович; Фізико-хімічний інститут ім. О.В. Багатського НАН України. – Одеса, 2004. – 39 с.
8. Кунах В.А. Биотехнология лекарственных растений. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи / Кунах В.А. – К. : Логос, 2005. – 730 с.
9. Кемоклидзе З. Тритерпеновые гликозиды фатсии японской – *Fatsia japonica*, культивируемой в Грузии и новый лекарственный препарат фатцифлогин : автореф. дис. ... канд. фармац. наук спец: 15.00.02 – фармацевтическая химия, фармакология / Зураб Кемоклидзе; АН Грузии, Ин-т фармаколог. – Тбилиси, 1999. – 26 с.
10. Смычков В.Ф. Противовоспалительные свойства сапонинов плюща колхидского / В.Ф. Смычков, Н.Ф. Фаращук // Здравоохр. Белоруссии. – 1975. – Т. 2, № 11. – С. 27.
11. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // *Plant Physiol.* – 1962. – Vol. 15. – P. 473–497.
12. Калинин Ф.Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. – К. : Наукова думка, 1980. – 488 с.

Чмельова С.І. Вплив селену на ростові характеристики калусної культури *Fatshedera lizei* і накопичення в ній тритерпенових глікозидів / С.І. Чмельова, О.В. Омельченко, Д.О. Панов, Г.О. Шіріна // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2012. – Т. 25 (64), № 2. – С. 169-175.

Наведено дані про вплив різних концентрацій селеніту натрію на ростові показники *Fatshedera lizei* в культурі *in vitro*. Підібрано модифікації поживних середовищ Мурасіге і Скуга з додаванням Na_2SeO_3 для калусогенезу. Отримано експериментальні докази про присутність в калусних культурах різних фракцій тритерпенових глікозидів, аналогічних інтактній рослині.

Ключові слова: *Fatshedera lizei*, калусна культура, індекс росту, селен, тритерпенові глікозиди.

Chmeleva S.I. Effect of selenium on the growing characteristics callus culture *Fatshedera lizei* and accumulation in its triterpene glycosides // S.I. Chmeleva, A.V. Omelchenko, D.A. Panov, A.O. Shirina // Scientific Notes OF Taurida V.Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No 2. – P. 169-175.

The data on the effect of various concentrations of sodium selenite on the growth rates *Fatshedera lizei* in culture *in vitro*. Selected nutrient media modified Murashige and Skoog c Na_2SeO_3 addition to callus formation. Experimental evidence of the presence of callus cultures of various fractions of triterpene glycosides similar to those of intact plants.

Keywords: *Fatshedera lizei*, callus culture, the growth index, selenium, triterpene glycosides.

Поступила в редакцию 19.04.2012 г.