

На правах рукописи



СМИРНОВА
Юлия Николаевна

**Действие синтетических ауксинов на рост,
цитоморфологию и синтез гинзенозидов в
суспензионных культурах клеток двух видов
рода *Rapax***

03.00.12 – физиология и биохимия растений

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2008

**Работа выполнена в Отделе биологии клетки и биотехнологии
Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии
наук, г. Москва.**

Научный руководитель: кандидат биологических наук
Смоленская Ирина Николаевна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор

Лобакова Елена Сергеевна

доктор биологических наук

Загоскина Наталья Викторовна

Ведущая организация: Российский Государственный Аграрный Университет –
Московская сельскохозяйственная академия им. К.А. Тимирязева

Защита состоится 21 октября 2008г. в 11 часов на заседании диссертационного
совета Д 002.210.01 при Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН
по адресу: 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35.

Факс: (495) 977 8018, электронная почта: m-azarkovich@ippras.ru; ifr@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института физиологии растений
им. К.А. Тимирязева Российской академии наук.

Автореферат разослан «18» сентября 2008 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

кандидат биологических наук



М.И. Азаркович

Актуальность. Целебные свойства растений рода *Panax* известны около 6000 лет и обусловлены уникальной композицией биологически активных веществ, центральное место среди которых принадлежит тритерпеновым гликозидам даммаранового ряда – гинзенозидам. Гинзенозиды обладают иммуностимулирующей и антиоксидантной активностями, нормализуют кровяное давление, стимулируют синтез РНК и ДНК, обладают противодиабетическим действием. По структуре агликона тритерпеновые гликозиды даммаранового ряда делят на две группы: 20(S)-протопанаксадиол (Rb-группа – Rb₁, Rb₂, R_c, R_d- гинзенозиды) и 20(S)-протопанаксатриол (Rg-группа – R_f, Rg₁, R_e-гинзенозиды). Биологическое действие соединений обеих групп различно, в частности, гликозиды Rb-группы подавляют активность ЦНС, понижают артериальное давление, а гликозиды Rg-группы увеличивают активность ЦНС и повышают артериальное давление. Поэтому, эффективность применения в лечебных целях препаратов женьшеня, в большей степени, зависит от композиции гинзенозидов, что подтверждается обоснованностью дифференцированного применения отдельных частей корня *P. ginseng* С.А. Meyer в традиционной китайской медицине.

В связи с тем, что количество растений рода *Panax* в природе крайне ограничено, широко исследуется возможность получения гинзенозидов биотехнологическим путем, используя культуру *in vitro*. Большинство из полученных линий клеток женьшеня отличаются от натуральных корней меньшим количеством и ограниченным составом гинзенозидов (Ходаковская и др., 1995; Langhansova et al., 2005). В настоящее время активно проводятся работы по получению высокопродуктивных штаммов представителей рода *Panax*, а также по исследованию их роста и биосинтеза гинзенозидов. При этом большое внимание уделяется оптимизации условий выращивания клеток, прежде всего составу питательных сред (Wu, Zhong, 1999). Хорошо известно, что регуляторы роста и их соотношение – важнейшие факторы, определяющие возможность существования популяций изолированных клеток. Они оказывают влияние, как на рост и дифференцировку клеток, так и на их метаболизм. Эффект определяется не только спецификой самого

фитогормона, но также зависит от природы вторичных соединений, а подчас от вида растения и даже от штамма культивируемых клеток.

Изучение в сравнительном аспекте цитофизиологических характеристик суспензионных культур клеток *P. japonicus* var. *repens* С.А. Meyer и *P. ginseng* С.А. Meyer, а также их способности к синтезу вторичных метаболитов, дает возможность установить особенности их существования, как самостоятельных биологических систем. Кроме того, влияние регуляторов роста на биосинтез гинзенозидов у разных видов женьшеня в условиях *in vitro* до сих пор окончательно не выяснено.

Цель и задачи исследования. Цель настоящей работы состояла в изучении влияния типа синтетического ауксина на процессы роста, цитофизиологические и цитогенетические характеристики, биосинтез гинзенозидов в культуре клеток растений двух видов рода *Panax*: *P. japonicus* var. *repens* С.А. Meyer и *P. ginseng* С.А. Meyer.

В связи с этим были поставлены следующие задачи:

1. Изучить ростовые, цитофизиологические и цитогенетические характеристики суспензионных культур клеток двух видов женьшеней.

2. Определить накопление гинзенозидов в отдельных циклах субкультивирования суспензионных культур клеток *P. japonicus* var. *repens* и *P. ginseng*.

3. Изучить влияние типа синтетического ауксина на ростовые и цитофизиологические характеристики суспензионных культур клеток женьшеней.

4. Изучить влияние типа синтетического ауксина на накопление гинзенозидов в суспензионных культурах *P. japonicus* var. *repens* и *P. ginseng*.

5. Рассмотреть возможную связь между ростовыми, цитофизиологическими характеристиками и синтезом тритерпеновых гликозидов в суспензионных культурах клеток *P. japonicus* var. *repens* и *P. ginseng*.

Научная новизна работы. Проведено сравнительное изучение длительно культивируемых суспензионных культур клеток двух видов женьшеня. Установлены

различия ростовых, цитофизиологических и биосинтетических показателей суспензионных культур *P. japonicus* var. *repens* и *P. ginseng*.

Показано, что основное влияние на накопление биомассы, агрегированность, эндоредупликацию ядерной ДНК, содержание и качественный состав гинзенозидов исследуемых культур оказывает химическая природа синтетического ауксина. У обеих суспензионных культур женьшеня НУК вызывает цитодифференцировку, проявляющуюся в увеличении доли крупных многоклеточных агрегатов, увеличении объёма клеток, возрастании числа клеток с удвоенным количеством ядерной ДНК, а также приводит к повышению синтеза гинзенозидов.

Установлено, что между уровнем синтеза гинзенозидов и цитофизиологическими характеристиками суспензий клеток существует зависимость – повышение синтеза гинзенозидов связано с процессами цитодифференцировки.

Впервые экспериментально показано, что в случае активного биосинтеза соотношение индивидуальных гинзенозидов, следовательно, и соотношение содержания гинзенозидов Rg и Rb групп достаточно стабильно.

Практическая значимость работы. В результате проведенных исследований, получены данные о гормональной регуляции роста и накопления тритерпеновых гликозидов даммаранового ряда в суспензиях клеток двух видов *Panax*. Охарактеризованы высокопродуктивные штаммы суспензионных культур *P. japonicus* var. *repens* и *P. ginseng*, которые могут быть рекомендованы для биотехнологического производства гинзенозидов. Результаты исследований дополняют данные о взаимосвязи цитодифференцировки клеток и уровня синтеза гинзенозидов в условиях *in vitro*.

Апробация работы. Основные положения работы были представлены на VIII Международной конференции "Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология" (Саратов, 2003); V съезде общества физиологов растений России и Международной конференции «Физиология растений – основа фитобиотехнологии» (Пенза, 2003); VI съезде общества физиологов растений России и Международной конференции «Современная физиология растений: от молекул до экосистем» (Сыктывкар, 2007);

IX Международной конференции "Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология" (Звенигород, 2008).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 10 работ.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, изложения полученных результатов и их обсуждения, выводов, списка литературы и приложения. Работа изложена на 107 страницах машинописного текста, содержит 30 рисунков, 10 таблиц. Список цитируемой литературы включает 194 наименования, из них 133 на иностранных языках.

Принятые сокращения и обозначения: ВККК ВР – Всероссийская коллекция культивируемых клеток высших растений; 2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота; НУК – α -нафтилуксусная кислота; БАП – 6-бензиламинопурин; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; *CV* – коэффициент вариации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В качестве объектов исследования были использованы суспензионные культуры клеток двух видов *Panax*: женьшеня японского *P. japonicus* var. *repens* С.А. Меуер и женьшеня настоящего *P. ginseng* С.А. Меуер. Каллусные ткани обеих культур были получены в 1996-1997 годах, а в 1998 году их начали культивировать как суспензии. Первичный каллус *P. japonicus* var. *repens* инициирован из двухлетнего корня интактного растения (Приморский край Дальнего Востока) в Институте пищевой химии и технологии НАН Украины Л.В. Желтоножской и А.Л. Чайко (Чайко и др., 1999). Каллусная культура *P. ginseng* получена из бокового корня шестилетнего плантационного растения (Ginseng & Tobacco Company, Южная Корея) в Отделе биологии клетки и биотехнологии ИФР РАН Н.Д. Черняк и А.В. Орешниковым. Культуры клеток *P. japonicus* var. *repens* и *P. ginseng* депонированы в ВККК ВР под номерами № 62 и № 66 соответственно.

Обе суспензии клеток выращивали на питательной среде Мурасиге и Скуга (Murashige, Skoog, 1962) с добавлением витаминов по Уайту. Кроме того,

стандартные питательные среды для суспензии *P. ginseng* содержали сахарозу (30 г/л), БАП (0,5 мг/л), 2,4-Д (2 мг/л); а для суспензии *P. japonicus* var. *repens* – сахарозу (25 г/л), кинетин (1 мг/л), НУК (2 мг/л), гидролизат казеина (500 мг/л). Суспензии культивировали в 0,5-литровых круглых плоскодонных колбах на качалке (90–100 об./мин) при 24–26°C в темноте. Продолжительность каждого пассажа – 21 сутки. Соотношение среды и инокулята для суспензий клеток *P. japonicus* var. *repens* и *P. ginseng* составило 6:1 и 5:1 соответственно.

Рост оценивали по приросту сырой и сухой биомассы и выражали индексом роста, который рассчитывали по формуле: $I = X_{\max}/X_0$, где X_{\max} и X_0 – максимальное и начальное значения показателя роста. Сухую биомассу определяли после высушивания ткани при 60°C в течение суток.

Жизнеспособность оценивали по числу неокрашенных 0,1%-ным раствором эозина клеток, при просмотре не менее 300 клеток.

Агрегированность определяли как соотношение числа разных типов агрегатов, выраженное в процентах. Просчитывали не менее 200 культивируемых единиц на 1 препарат в 3-х повторностях.

Митотический индекс определяли ежедневно на давленных препаратах, предварительно фиксированных смесью этиловый спирт: уксусная кислота (3: 1), окраска карболовым фуксином (Gould, 1986). На каждом препарате анализировали по 1000 клеток, просчитывали 3 препарата на каждую точку фиксации

Определение количества ядерной ДНК проводили с помощью цитофотометрии и микроспектрофлуорометрии. Усовершенствование этих методов, также как и разработка алгоритмов анализа результатов проведено ведущим научным сотрудником Отдела биологии клетки и биотехнологии ИФР РАН А.В. Носовым.

Цитофотометрический анализ выполняли на давленных препаратах после окрашивания их по Фельгену, используя модификацию (Filkuka, Kleinwachter 1981). Материал фиксировали смесью этиловый спирт-уксусная кислота (3:1) в течение одних суток, а затем хранили в 70° этаноле. Отмытую от этанола суспензию клеток подвергали гидролизу 5N HCl в течение 35 мин при 20°C. Окрашивали реактивом

Шиффа. Измерение количества ДНК производили на цитофотометре (“Reichert-Jung”, Австрия) двухволновым методом при $\lambda_1 = 550$ и $\lambda_2 = 500$ нм. В качестве стандарта содержания ДНК ($4C = 2,1$ пг) использовали клетки апикальной меристемы корня проростков *Vigna radiata* cv. Berken в различных фазах митоза. Было проанализировано 50 интерфазных ядер произвольно выбранных с 2-х препаратов.

Для микроспектрофлуорометрического измерения количества ДНК к клеткам добавляли 2 мл холодного (2°C) буфера (20 mM Mes, 10 mM ЭДТА, 100 mM NaCl, pH 6,0), детергент IGEPAL CA-630 (“Sigma”) до концентрации 0,5% и DAPI (1 мкг/мл) [4',6-бис (2'-имидазолил-4Н,5Н)-2-фенилиндол] (“Serva”), краситель, количественно связывающийся с ДНК (Schnedl et al., 1977). Для освобождения ядер из крупных агрегатов суспензию гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе Поттера. Измеряли интенсивность флуоресценции (в относительных единицах) при $\lambda = 470$ нм визуально целых ядер в составе клеток или лежащих отдельно с помощью микроскопа Univar с цитофотометром (“Reichert-Jung”, Австрия), используя объектив 40× и круглый измерительный зонд чуть большего диаметра, чем максимальный диаметр анализируемых ядер. Освещали препарат через объектив возбуждающим светом с $\lambda = 365$ нм, который отсекали барьерным фильтром с $\lambda = 420$ нм.

Анализ количества и состава гинзенозидов методом ВЭЖХ. Пробы сырой биомассы весом 2-3г (точная навеска) дважды экстрагировали метанолом при постоянном перемешивании. Время первой экстракции – 3 часа, второй – 1 час. Экстракты объединяли, упаривали под вакуумом на роторном испарителе при температуре 45-50°C. Высушенный метанольный экстракт, растворяли в воде, очищали на патронах Sep-Pak (“Tessek”, Чехия) с объемом сорбента Separon SGX C18 (60 мкм) 1 мл. Патрон с нанесенной пробой последовательно промывали водой, 20% этанолом и 80% этанолом. Сухой остаток последней фракции растворяли в смеси ацетонитрил-вода (35: 65, по объему), пропускали через тefлоновые микрофильтры (“Tessek”, Чехия) с порами 0,2 мкм и использовали для ВЭЖХ-анализа. Разделение гинзенозидов проводили на приборе фирмы «LKB» (Швеция), используя стальную колонку (4x250 мм), заполненную Lichrosorb RP-18 с размером частиц 5 мкм («LKB»,

Швеция). Для анализа использовали два различных изократических режима при скорости потока 0,5 мл/мин: для гинзенозидов Rf, Rb₁, Rc, Rb₂, Rd – ацетонитрил : вода в объемном соотношении 35 : 65; для гинзенозидов Rg₁, Re- ацетонитрил : вода в объемном соотношении 22 : 78. Детектирование проводили при длине волны 203 нм. Для количественного определения использовали метод абсолютной калибровки относительно индивидуальных гинзенозидов фирмы «Sigma» (США). Пересчет индивидуального и суммарного содержания гинзенозидов проводили на абсолютно сухой вес. Влажность образцов определяли по методике Государственной Фармакопеи СССР (Государственная Фармакопея СССР XI изд., 1987). Минимально определяемое количество каждого индивидуального гинзенозида было равно 20 мкг/г абсолютно сухой биомассы. Идентификация агликонов проведена ранее (Butenko et al., 1993) методом газовой хроматографии – масс-спектрометрии. Анализ проводили совместно со старшим научным сотрудником Отдела биологии клетки и биотехнологии ИФР РАН О.В. Решетняк.

Статистическую обработку результатов проводили по стандартным методикам (Рокицкий, 1973). На графиках и в таблицах представлены средние арифметические значения и стандартные отклонения из 3 биологических повторностей (3 колбы) для каждого срока, пассажа и варианта.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Ростовые и цитофизиологические параметры суспензионных культур клеток *P. japonicus* var. *repens* и *P. ginseng*, культивируемых на стандартных питательных средах

Определение ростовых и цитофизиологических параметров проводили в 70-м, 100-м и 150-м субкультивированиях *P. japonicus* var. *repens* и в 150-м цикле субкультивирования *P. ginseng* на стандартных питательных средах. Результаты накопления биомассы, представленные в таб. 1, указывают на активный рост суспензии клеток женьшеня японского. Необходимо отметить, что прирост биомассы суспензии *P. japonicus* был в 2 раза выше, чем в других культурах клеток рода *Panax* (Zhong, Wang 1996; Liu et al., 1998; Kunach et al., 2003; Wang et al., 2005). Индекс

роста биомассы *P. japonicus* var. *repens* в 1,5-1,8 раза выше, чем у *P. ginseng*. Пик митотической активности обоих видов женьшеня совпадал по времени и приходился на 5-6 сутки. Количество жизнеспособных клеток у обеих культур находилось на одном уровне.

Таблица 1

Характеристики роста суспензий клеток *P. japonicus* var. *repens* и *P. ginseng*

Показатели	<i>P. japonicus</i>	<i>P. ginseng</i>
Индекс роста I:		
сухая биомасса	6,1 ± 1,1	3,8 ± 0,5
сырая биомасса	6,0 ± 1,2	3,3 ± 1,3
Максимальный МИ, %	3,5 ± 1,3	2,3 ± 0,4
Жизнеспособность, %	86,8 ± 0,5	90,6 ± 1,7

Суспензия *P. japonicus* var. *repens* среднеагрегированна (рис. 1А) и состояла из агрегатов размером 10-50 клеток; на начальные сутки роста их составляли клетки меристемоподобного и паренхимоподобного типов (рис. 2А), а к концу субкультивирования в два раза возрастало число паренхимоподобных, появлялись вытянутые клетки.

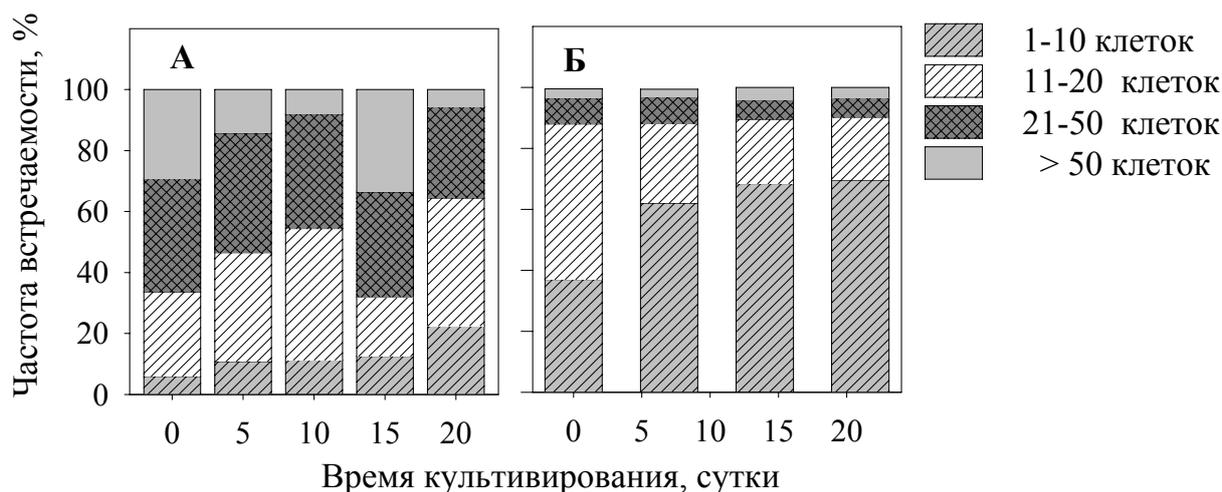


Рис. 1. Процентное содержание агрегатов с разным числом клеток в суспензионных культурах *P. japonicus* var. *repens* (А) и *P. ginseng* (Б), культивируемых на стандартных питательных средах.

Суспензия *P. ginseng* мелкоагрегированна (рис. 1Б) и на протяжении всего периода культивирования соотношение меристемоподобных и паренхимоподобных клеток не изменялось (рис. 2Б). Следует отметить, что в популяции женьшеня настоящего преобладали мелкие меристемоподобные клетки, а клетки паренхимоподобного и удлинённого типов присутствовали в незначительном количестве.

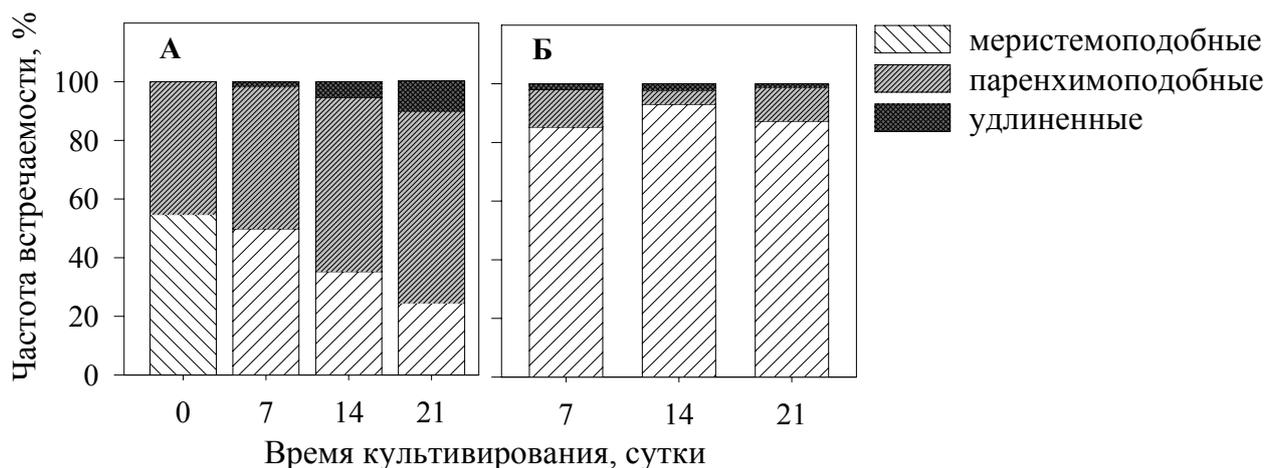


Рис. 2. Процентное содержание клеток разного типа в популяциях суспензионных культур клеток *P. japonicus* var. *repens* (А) и *P. ginseng* (Б), культивируемых на стандартных питательных средах.

Таким образом, суспензии клеток двух видов *Panax* значительно различались по приросту биомассы, агрегированности и составу клеточной популяции, а жизнеспособность обеих культур находилась на одном уровне.

2. Биосинтез гинзенозидов в суспензионных культурах клеток *P. japonicus* var. *repens* и *P. ginseng*

Количество и состав тритерпеновых гликозидов даммаранового ряда определяли в течение 70, 100 и 150-го циклов субкультивирования суспензии *P. japonicus* var. *repens* и 150-го и 175-го циклов субкультивирования суспензии клеток *P. ginseng*. В течение всего периода наблюдения отмечалось увеличение содержания гинзенозидов в суспензии клеток *P. japonicus*, а среднее накопление гинзенозидов в 70, 100 и 150-м субкультивированиях составило 1,67, 1,53 и 3,1% соответственно (рис. 3А). В противоположность этому, при культивировании

суспензии клеток *P. ginseng* на стандартной среде были определены лишь их следовые количества (рис. 3Б).

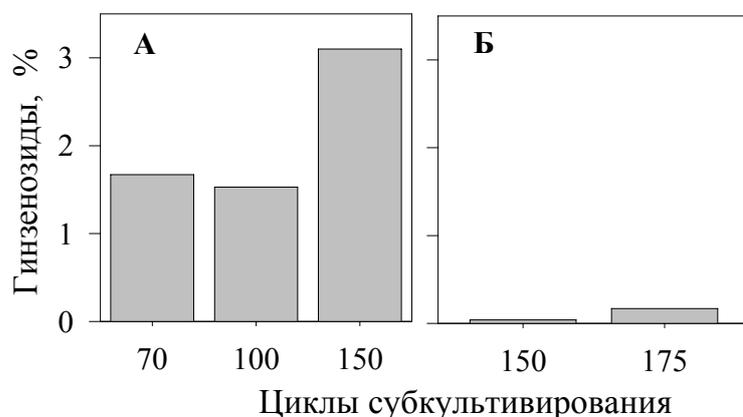


Рис. 3. Содержание гинзенозидов в суспензионных культурах клеток *P. japonicus* var. *repens* (А) и *P. ginseng* (Б), культивируемых на стандартных питательных средах (% от сухой биомассы).

Поскольку фармакологическое действие соединений Rb- и Rg-групп различно (Shibata S. et al., 1985), то для характеристики биологической активности женьшеня важным фактором является также соотношение гинзенозидов. Анализ суспензии *P. japonicus* var. *repens* показал присутствие в биомассе всех семи основных гинзенозидов (рис. 4А). К 150-му субкультивированию наблюдалось уменьшение Rf- и увеличение долей Rg₁- и Re-гинзенозидов, которые являлись мажорными. Отношение соединений Rg/Rb-групп в биомассе суспензии женьшеня японского с 70-го по 150-й пассаж в среднем находилось в пределах 5,5-6,8 (рис. 5А).

В отличие от *P. japonicus* var. *repens*, во всех проведенных определениях в биомассе женьшеня настоящего в основном присутствовала Rg-группа (рис. 4Б), а гинзенозиды Rb-группы в различных опытах то отсутствовали, то появлялись в незначительных количествах. В связи с этим, отношение Rg/Rb-групп гинзенозидов было не устойчиво (рис. 5Б). Так к концу 150-го субкультивирования суспензии *P. ginseng* этот показатель был равен 12,7, а из-за отсутствия синтеза соединений с агликоном 20(S)-протопанаксадиол в 175-м цикле – не возможно было определить.

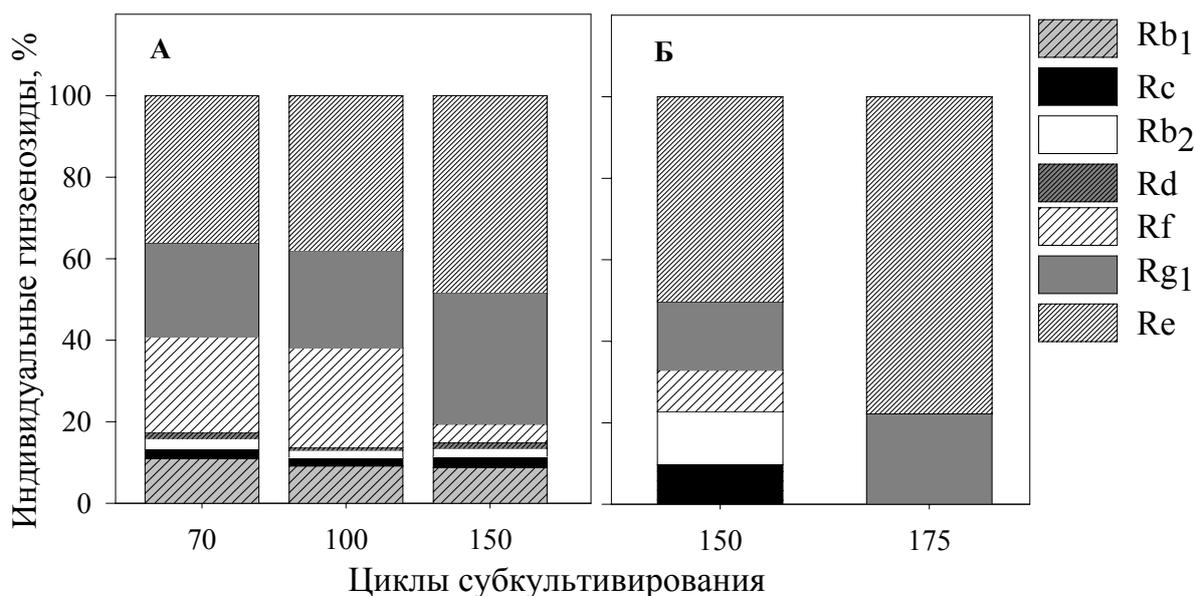


Рис. 4. Процентное содержание индивидуальных гинзенозидов в суспензионных культурах клеток *P. japonicus* var. *repens* (А) и *P. ginseng* (Б), культивируемых на стандартных питательных средах (% от суммы гинзенозидов).

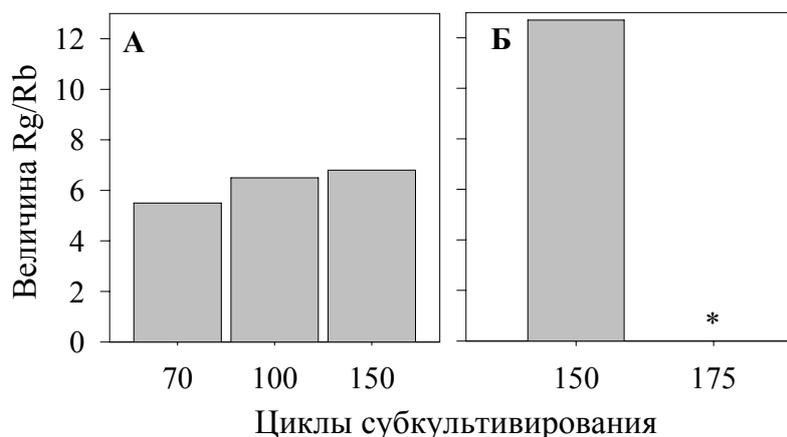


Рис. 5. Отношение содержания Rg/Rb групп гинзенозидов в суспензионных культурах клеток *P. japonicus* var. *repens* (А) и *P. ginseng* (Б), культивируемых на стандартных питательных средах; * – отношение не определено, значение группы Rb=0.

Итак, на основании полученных данных, можно сделать следующее заключение: при культивировании на стандартных питательных средах биосинтетическая активность суспензий клеток *P. japonicus* и *P. ginseng* существенно различалась по количеству гинзенозидов и их составу. В обоих случаях доминирующими были соединения Rg-группы с преобладанием Re-гинзенозида. В процессе длительного культивирования суспензии женьшеня японского накопление

гинзенозидов имело высокий уровень, а их состав не менялся. В культуре клеток женьшеня настоящего гинзенозиды синтезировались в следовых количествах и были представлены только соединениями Rg-группы.

Следует отметить, что стандартные питательные среды обеих суспензий имеют отличия, как по качественному, так и по количественному содержанию ауксинов; кроме того, стандартная (контрольная) среда для *P. japonicus var. repens* содержит гидролизат казеина (табл. 2). В связи с этим, задачей нашей дальнейшей работы было определить, каким образом изменение состава фитогормонов повлияет на ростовые, цитофизиологические параметры и специализированный метаболизм суспензионных культур клеток *P. japonicus var. repens* и *P. ginseng*. В течение 6-ти последовательных субкультивирований обе культуры выращивали на средах (табл. 2), отличающихся сочетаниями ауксинов и цитокининов, при этом их концентрации были выравнены в молярном отношении.

Таблица 2

Варианты сочетаний фитогормонов

Цитокинин ($4,6 \times 10^{-6} \text{M}$)	Ауксин ($1,1 \times 10^{-5} \text{M}$)	Гидролизат казеина (500 мг/л)	Сокращение
БАП	НУК	-	БН
БАП	НУК	+	БНгк
кинетин	НУК	-	КН
кинетин	НУК	+	КНгк
кинетин	2,4-Д	-	КД
кинетин	2,4-Д	+	КДгк
БАП	2,4-Д	-	БД
БАП	2,4-Д	+	БДгк
Контроль: <i>P. japonicus</i> – кинетин ($4,6 \times 10^{-6} \text{M}$) – НУК ($1,1 \times 10^{-5} \text{M}$), гидролизат казеина <i>P. ginseng</i> – БАП ($2,3 \times 10^{-6} \text{M}$) – 2,4-Д ($0,9 \times 10^{-5} \text{M}$)			конт

В весовом соотношении концентрации регуляторов роста составили: НУК – 2мг/л, 2,4-Д – 2,37мг/л, БАП – 1,04мг/л и кинетин – 1мг/л. Также изучали совместное действие гидролизата казеина и вышеуказанных регуляторов роста.

3. Влияние сочетаний ауксинов и цитокининов на рост и цитофизиологические характеристики суспензионных культур клеток *P. japonicus* var. *repens* и *P. ginseng*

Определение индекса роста сырой биомассы исследуемых суспензий проводили в 4-м и 6-м циклах субкультивирования на модифицированных средах. Из результатов, представленных на рис. 6, видно, что интенсивность роста максимальна в вариантах, где химическая природа ауксина соответствовала стандартной среде каждой культуры, т.е. у *P. japonicus* – в вариантах с НУК, а у *P. ginseng* – в вариантах с 2,4-Д.

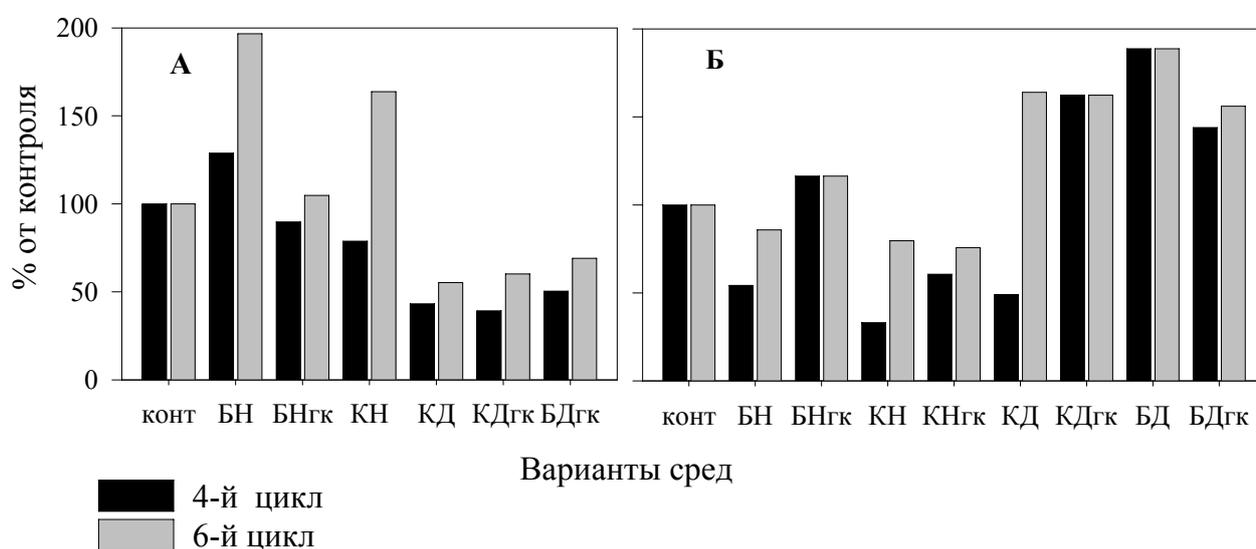


Рис. 6. Изменение индексов роста биомассы суспензионных культур клеток *P. japonicus* var. *repens* (А) и *P. ginseng* (Б) в 4-м и 6-м циклах культивирования на средах с различными сочетаниями ауксинов и цитокининов.

Суспензия женьшеня японского на средах с НУК прирастала в 2-2,5 раза больше, чем при добавлении 2,4-Д (рис. 6А). Биомасса суспензии женьшеня настоящего на экспериментальных средах с 2,4-Д прирастала в 2-2,8 раза больше, чем на НУК (рис. 6Б). Некоторая стабилизация роста обеих культур наблюдалась к 6-му пассажу и проявлялась в увеличении прироста биомассы суспензий на всех исследуемых фитогормонах приблизительно в 1,5 раза.

Жизнеспособность клеток обеих культур на различных сочетаниях ауксинов и цитокининов мало изменялась. В вариантах с добавлением НУК или 2,4-Д количество живых клеток *P. japonicus* var. *repens* находилось на уровне контроля (рис. 7А), а в суспензии *P. ginseng* – в пределах от 72% до 92% (рис. 7Б).

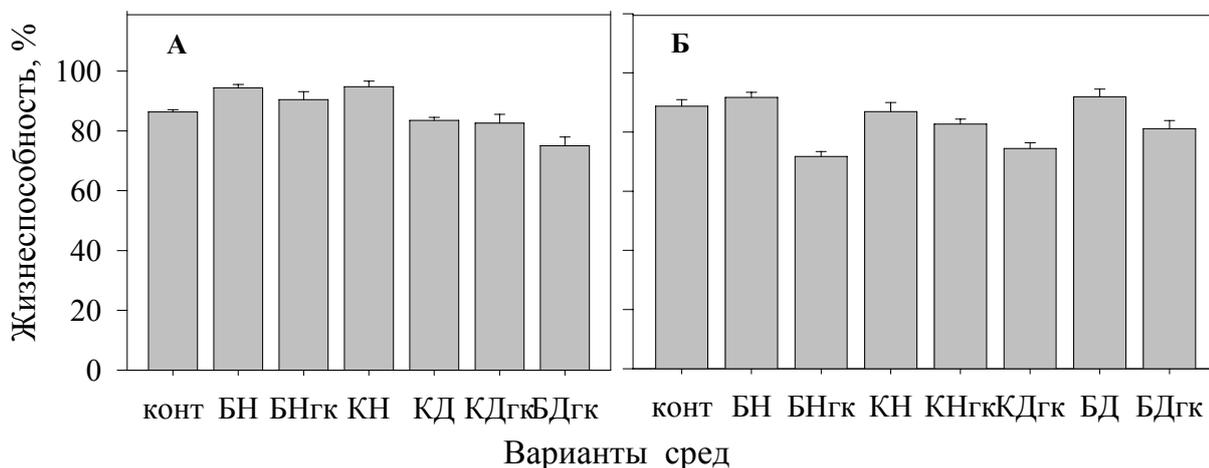


Рис. 7. Жизнеспособность суспензионных культур клеток *P. japonicus* var. *repens* (А) и *P. ginseng* (Б) при выращивании на средах с различным сочетанием ауксинов и цитокининов.

Агрегированность исследуемых суспензий на различных сочетаниях ауксинов и цитокининов существенно отличалась (рис. 8). В клеточной популяции *P. japonicus* var. *repens* количество крупных агрегатов (размером более 50 клеток) в вариантах с добавлением НУК было в 1,6 раза выше, чем в случае замены ауксина на 2,4-Д; а кластеры размером до 10 клеток, 10-20 и 20-50 клеток представлены в равных долях (рис. 8А). При использовании в качестве ауксина 2,4-Д агрегаты разного размера в суспензии женьшеня японского распределялись равномерно. Синтетический ауксин НУК также вызывал укрупнение агрегатов в суспензии женьшеня настоящего – в популяции в 22 раза увеличивалось количество крупных агрегатов размером более 50 клеток (рис. 8Б). На средах с 2,4-Д в сочетании с различными цитокининами суспензия *P. ginseng* была мелкоагрегирована и не отличалась от контроля.

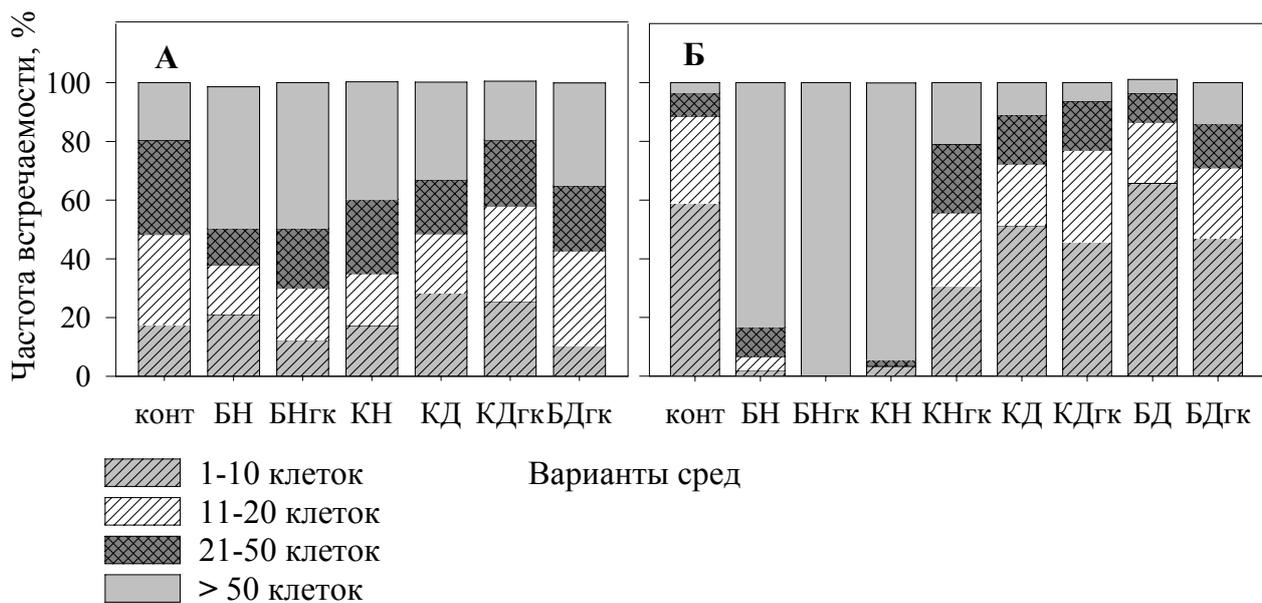


Рис. 8. Процентное содержание агрегатов с разным числом клеток в суспензионных культурах клеток *P. japonicus* var. *repens* (А) и *P. ginseng* (Б) при выращивании на средах с различным сочетанием ауксинов и цитокининов.

Таким образом, проведенные исследования показали, что на интенсивность роста и агрегированность суспензионных культур клеток *P. japonicus* var. *repens* и *P. ginseng* в большей степени оказывал влияние вид используемого ауксина, чем цитокинина. Наибольшая интенсивность роста определена в вариантах, где химическая природа ауксина соответствовала стандартной среде каждой культуры. Добавление НУК вызывало укрупнение агрегатов обеих суспензий. Гидролизат казеина несколько снижал жизнеспособность и не оказывал влияния на агрегированность и интенсивность роста суспензионных культур клеток *P. japonicus* var. *repens* и *P. ginseng*.

4. Влияние сочетаний ауксинов и цитокининов на биосинтез гинзенозидов в суспензионных культурах клеток *P. japonicus* var. *repens* и *P. ginseng*

Определение тритерпеновых гликозидов даммаранового ряда проводили на 21-е сутки 4-го цикла субкультивирования на модифицированных питательных средах. Из данных, представленных на рис. 9А, видно, что независимо от вида гормональных

добавок накопление гинзенозидов в суспензии клеток *P. japonicus* var. *repens* сохраняло высокий уровень. При культивировании на средах, содержащих НУК, он был немного выше, чем при использовании 2,4-Д. В серии сред с добавлением НУК синтез гинзенозидов в клетках женьшеня японского в среднем составил 2,8% ($CV=16\%$), а с 2,4-Д – 2,1% ($CV=17\%$).

В суспензии *P. ginseng* накопление гинзенозидов зависело от вида используемого ауксина (рис. 9Б). В серии сред с 2,4-Д накопление гинзенозидов в биомассе суспензии женьшеня настоящего не отличалось от контроля, тогда как в вариантах с добавлением НУК их содержание в среднем составило 4% ($CV=36\%$), что в 17,2 раза выше, чем на средах с 2,4-Д. Следует отметить, что гидролизат казеина не оказывает существенного влияния на синтез гинзенозидов в суспензиях клеток *P. japonicus* var. *repens* и *P. ginseng*.

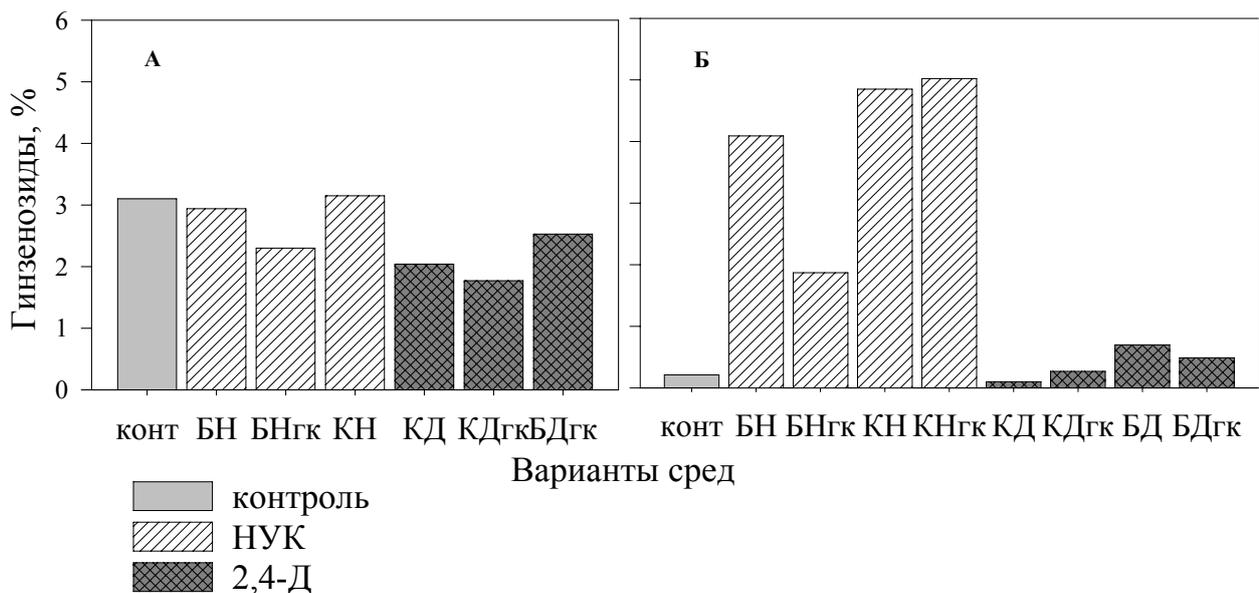


Рис. 9. Содержание гинзенозидов в суспензионных культурах клеток *P. japonicus* var. *repens* (А) и *P. ginseng* (Б) при выращивании на средах с различным сочетанием ауксинов и цитокининов (% от сухой биомассы).

Качественный анализ гинзенозидов (рис. 10) показал, что на всех модифицированных средах суспензия клеток женьшеня японского способна к синтезу всех 7-ми основных гинзенозидов, обнаруженных в контроле (рис.10А). Следует отметить, что при замене НУК на 2,4-Д увеличилась доля Re гинзенозида в 1,34 раза,

а доля Rg₁ гинзенозида уменьшилась в 2,55 раза. Таким образом, в зависимости от вида ауксина изменялось количество отдельных гинзенозидов, и как следствие их соотношение.

При использовании в качестве ауксина 2,4-Д в биомассе суспензии клеток *P. ginseng* присутствовали не все гинзенозиды, а их соотношение было не постоянно (рис.10Б). Только в вариантах с добавлением НУК в биомассе женьшеня настоящего состав гинзенозидов был представлен полностью – семь гинзенозидов (рис. 10Б), при этом соотношение индивидуальных гинзенозидов оказалось одинаковым.

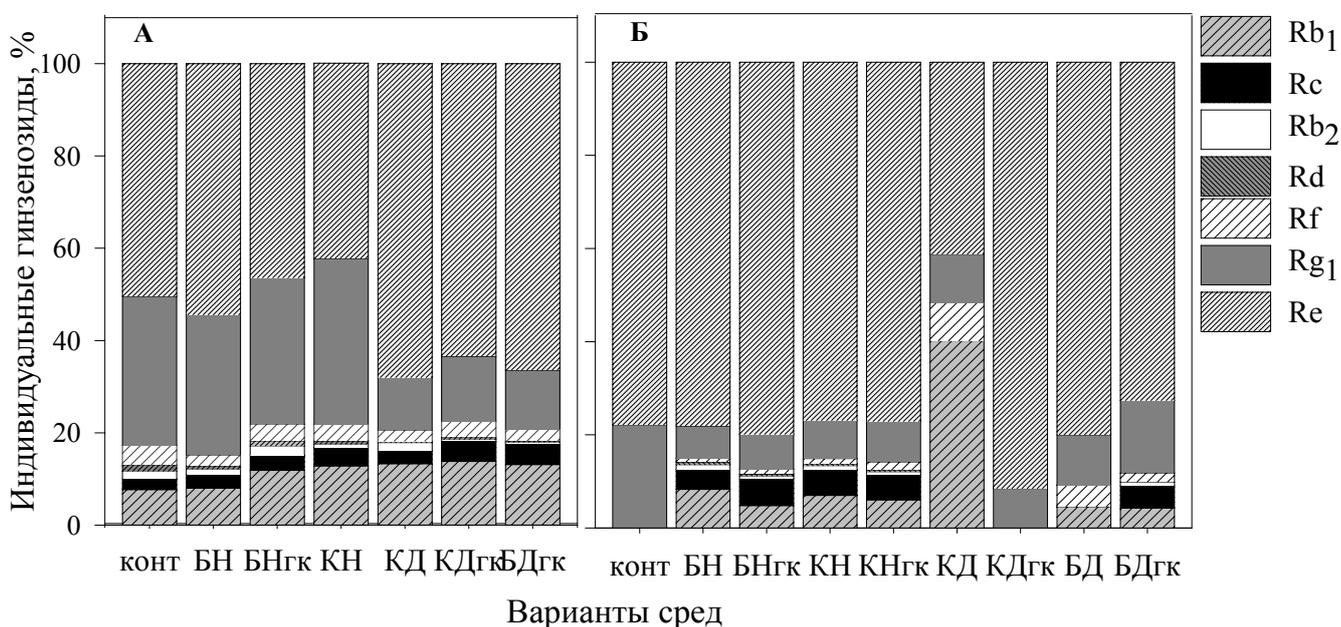


Рис. 10. Процентное содержание индивидуальных гинзенозидов в суспензионных культурах клеток *P. japonicus* var. *repens* (А) и *P. ginseng* (Б) при выращивании на средах с различным сочетанием ауксинов и цитокининов (% от суммы гинзенозидов).

В суспензии *P. japonicus* var. *repens* (рис. 11А) не выявлено влияние вида синтетического ауксина на отношение соединений Rg/Rb групп: на всех сочетаниях ауксинов и цитокининов, за исключением варианта БН, данный показатель находился в диапазоне 4,2-4,5. В суспензии *P. ginseng* (рис. 11Б) отношение Rg/Rb групп гинзенозидов изменялось в зависимости от используемого ауксина: во всех вариантах с НУК эти значения находились в пределах 6,1-7,6, а при использовании 2,4-Д – колебались, в связи с нестабильным синтезом индивидуальных гинзенозидов.

Представленные результаты также свидетельствуют о том, что в тех случаях, когда отмечается активный биосинтез гинзенозидов, то их состав, доля каждого гинзенозида, а также соотношение соединений Rg/Rb групп стабильны.

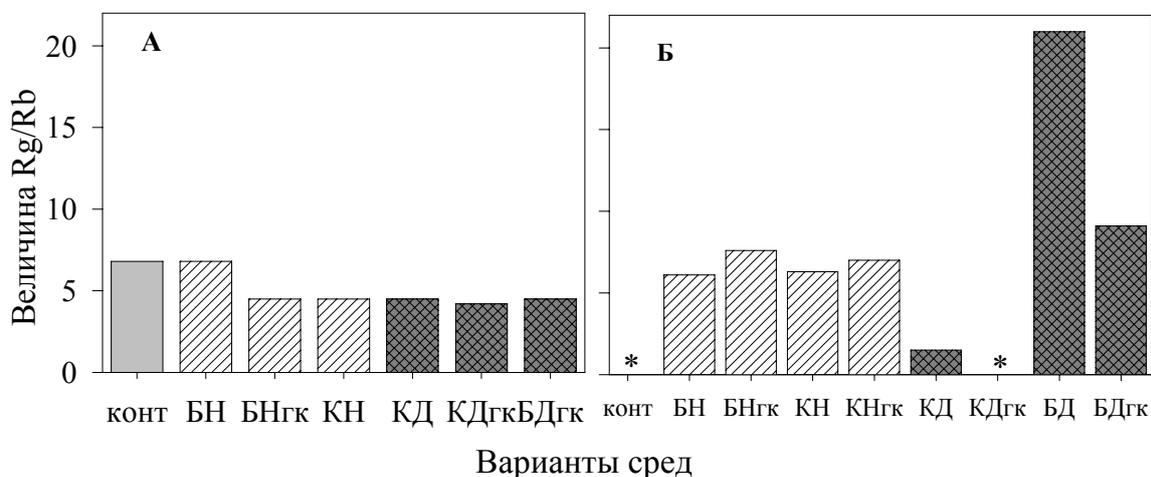


Рис. 11. Отношение содержания Rg/Rb групп гинзенозидов в суспензионных культурах клеток *P. japonicus var. repens* (А) и *P. ginseng* (Б) при выращивании на средах с различным сочетанием ауксинов и цитокининов; * – отношение не определено, значение группы Rb=0.

Таким образом, в суспензии *P. ginseng*, в отличие от *P. japonicus*, синтез тритерпеновых гликозидов даммаранового ряда на средах с 2,4-Д не стабилен. Для процесса биосинтеза гинзенозидов суспензиями обоих видов женьшеня более благоприятно присутствие в питательной среде НУК, о чем свидетельствует не только повышение общей суммы гликозидов, но одинаковое отношение групп гинзенозидов – Rg/Rb.

Для исследования влияния НУК на рост и вторичный метаболизм, мы определяли накопление сырой биомассы и содержание гинзенозидов в течение 7-ми циклов субкультивирования суспензии *P. ginseng* в варианте кинетин-НУК (рис. 12). В первые циклы культивирования прирост биомассы снижался и лишь к 6-му пассажу наблюдалось незначительное его увеличение. Накопление гинзенозидов с 0,25% в контроле увеличилось до 5% и 11% к 4-му и 7-му пассажу соответственно. Уже с 1-го субкультивирования активизировался синтез обеих групп соединений и к концу 2-го пассажа состав гинзенозидов был представлен полностью (табл. 3).

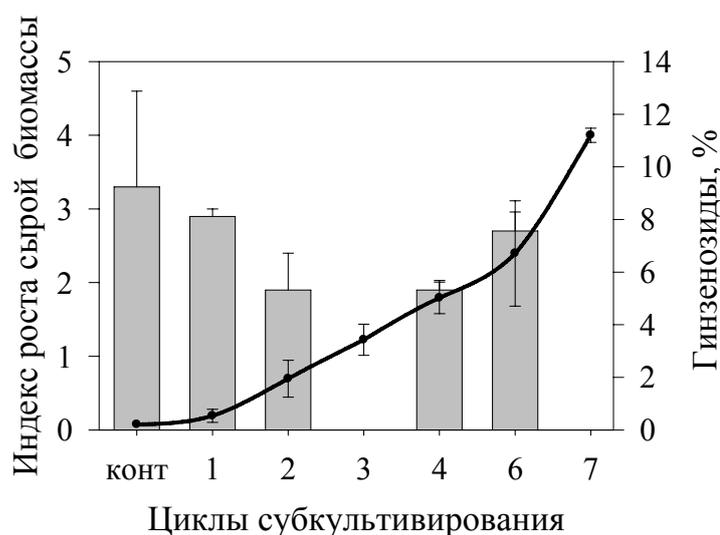


Рис. 12. Содержание гинзенозидов (кривая линия) при последовательных субкультивированиях суспензионной культуры клеток *P. ginseng* на среде кинетин-НУК; диаграмма – сырая биомасса.

Таблица 3

Накопление гинзенозидов в течение 7-ми циклов субкультивирования суспензионной культуры *P. ginseng* на среде кинетин-НУК

№ пассажа	Сумма, %	Состав гинзенозидов
1	0,54±0,19	Rb ₁ ; Rc;Rb ₂ ; Rf;Rg ₁ ;Re
2	1,95±0,14	Rb ₁ ; Rc;Rb ₂ ;Rd; Rf;Rg ₁ ;Re
3	3,43±0,59	Rb ₁ ; Rc;Rb ₂ ;Rd; Rf;Rg ₁ ;Re
4	5,02±0,04	Rb ₁ ; Rc;Rb ₂ ;Rd; Rf;Rg ₁ ;Re
6	6,71±1,10	Rb ₁ ; Rc;Rb ₂ ;Rd; Rf;Rg ₁ ;Re
7	11,2±0,27	Rb ₁ ; Rc;Rb ₂ ;Rd; Rf;Rg ₁ ;Re
Контроль (0,5мл/лБАП-2,4-Д)	0,04	Rb ₂ Rf; Rg ₁ ;Re

Известно, что в корнях интактных растений основная масса гинзенозидов локализуется в паренхимных клетках между флоэмой и перидермой (Kubo et al., 1980; Samukawa et al., 1995; Smith et al., 1996). Основываясь на этих данных, можно предположить, что в суспензионных культурах накопление метаболитов также происходит в паренхимоподобных клетках. Число последних значительно возрастало к концу пассажа суспензии *P. japonicus* var. *repens* и одновременно с этим в части культивируемых клеток удваивалось количество ядерной ДНК. Число клеток с

удвоенным количеством ядерной ДНК в суспензии женьшеня японского на среде с добавлением НУК составляло около 20% (рис. 13). В отличие от *P. japonicus*, на протяжении всего цикла роста в контроле (с добавлением 2,4-Д) суспензия *P. ginseng* в основном была представлена мелкими меристемоподобными клетками, а клеток с удвоенной ядерной ДНК было лишь 4%. При замене 2,4-Д на НУК в клетках женьшеня настоящего до 25% увеличивалось число ядер с удвоенным количеством ДНК (рис. 13); одновременно с этим возрастало число паренхимоподобных клеток (см. стр. 10).

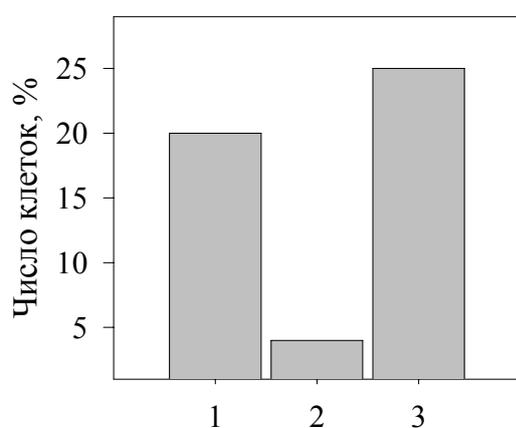


Рис. 13. Число клеток с удвоенным количеством ядерной ДНК в конце пассажа в суспензионных культурах *Panax*: 1 – суспензия клеток *P. japonicus* var. *repens* на среде с НУК; 2 – суспензия клеток *P. ginseng* на среде с 2,4-Д; 3 – суспензия клеток *P. ginseng* на среде с НУК.

Размер клеток, как правило, коррелирует с количеством ядерной ДНК и увеличение обоих параметров часто сопровождается дифференцировкой клеток и тканей (Melaragno et al., 1993; Sugimoto-Shirasu, Roberts, 2003). Вероятно, что под влиянием НУК в суспензионной культуре *P. ginseng* происходит замедление деления клеток, но усиливается их растяжение. Рассчитанный на основании данных по числу клеток и сырой массе, средний объём клеток суспензии женьшеня настоящего до 10-х суток субкультивирования был равен $10,8 \times 10^4$ мкм³ ($CV = 26\%$) и $13,2 \times 10^4$ мкм³ ($CV = 8\%$) на средах с 2,4-Д и НУК соответственно. При этом следует отметить, что с 14 до 21 суток субкультивирования средний объём на средах с 2,4-Д не претерпевал больших изменений, в то время как культивирование суспензии с НУК приводило к увеличению объёма клеток до $36,3 \times 10^4$ мкм³ ($CV = 39\%$). При этом растяжение клеток, вероятно, сопровождается эндоредупликацией ядерной ДНК. Очевидно, что два синтетических ауксина 2,4-Д и НУК противоположным образом действуют на деление и растяжение клеток суспензионной культуры *P. ginseng*, и как следствие, -

на синтез гинзенозидов. В недавней работе Campanoni и Nick (Campanoni, Nick, 2005) на культуре клеток табака было убедительно показано, что НУК стимулировал растяжение клеток в концентрации на порядок ниже той, которая требовалась для стимуляции делений, а 2,4-Д совсем не влияла на растяжение клеток и поддерживала только их деления. Авторы предполагают, что два ауксина активируют разные сигнальные пути, контролирующие деление и растяжение клеток. Причём в проведении сигнала от предполагаемого рецептора 2,4-Д принимают участие гетеротримерные G-белки. О вероятном существовании двух ауксиновых рецепторов, для ИУК и 2,4-Д, было сказано и в работе Kawano с соавторами (Kawano et al., 2003) и продемонстрировано, что 2,4-Д вызывает неконкурентное ингибирование эпинастического роста полосок листьев табака, под действием ИУК.

Таким образом, повышение синтеза гинзенозидов в клетках обеих культур связано с процессами цитодифференцировки, вызванными НУК. Вероятно, под влиянием НУК в суспензионной культуре женьшеня настоящего происходит замедление деления клеток, но усиливается их растяжение. Исходя из вышеизложенного, можно предположить, что изменение цитофизиологических показателей, состава и количества тритерпеновых гликозидов даммаранового ряда в суспензионных культурах *P. ginseng* и *P. japonicus* var. *repens* определяется главным образом видом синтетического ауксина.

Выводы

1. Установлены различия в росте и составе клеточной популяции суспензионных культур клеток *P. japonicus* var. *repens* и *P. ginseng*.
2. Показано, что обе суспензии отличаются по способности к синтезу гинзенозидов. В суспензии клеток *P. japonicus* var. *repens* высокий уровень синтеза всех семи гинзенозидов. В суспензии клеток *P. ginseng* синтез гинзенозидов не стабилен – определяются только следовые количества, а их состав представлен не полностью. У обеих культур доминируют соединения Rg-группы с преобладанием Re-гинзенозида.

3. Установлено, что замена ауксина в среде культивирования уменьшает прирост биомассы обеих суспензий. Наибольшая интенсивность роста отмечается в вариантах, где химическая природа ауксина соответствует стандартной среде каждой культуры. Показано, что НУК вызывает укрупнение агрегатов в суспензиях *P. japonicus* var. *repens* и *P. ginseng*.
4. Показано, что вид ауксина не оказывает существенного влияния на изменение жизнеспособности суспензионных культур клеток *P. japonicus* var. *repens* и *P. ginseng*.
5. Установлено, что в суспензии клеток *P. japonicus* var. *repens* накопление гинзенозидов на всех сочетаниях фитогормонов сохраняет высокий уровень.
6. Показано, что в суспензионной культуре клеток *P. ginseng* НУК вызывает значительное увеличение синтеза гинзенозидов всех групп, в результате состав гинзенозидов представлен полностью.
7. Установлено, что при активном биосинтезе суспензионных культур клеток *P. japonicus* var. *repens* и *P. ginseng* состав гинзенозидов и отношение соединений Rg/Rb групп – одинаковы.
8. Показано, что повышение синтеза гинзенозидов в обеих культурах связано с процессами цитодифференцировки, вызванными НУК: увеличение доли крупных многоклеточных агрегатов, объёма клеток и возрастание числа клеток с удвоенным количеством ядерной ДНК.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Решетняк О.В., Черняк Н.Д., Смирнова Ю.Н., Штратникова В.Ю., Орешников А.В. (2003) Изменение качественного и количественного состава гинзенозидов в процессе выращивания новых штаммов *Panax ginseng*. Тез. докл. VIII международной конференции “Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология”, Саратов, с. 270.
2. Решетняк О.В., Смоленская И.Н., Смирнова Ю.Н., Чайко А.Л., Носов А.В., Носов А.М. (2003) Рост суспензионной культуры клеток *Panax japonicus* и

биосинтез гинзенозидов. Тез. докл. VIII международной конференции “Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология”, Саратов, с. 288.

3. Решетняк О.В., Смоленская И.Н., Смирнова Ю.Н., Черняк Н.Д., Кривохарченко А.С., Носов А.М. (2003) Суспензионная культура клеток *Panax japonicus* и изменение ее агрегированности для криосохранения. Тез. докл. V съезда общества физиологов растений России и Международной конференции “Физиология растений – основа фитобиотехнологии”, Пенза, с. 530.

4. Смоленская И.Н., Зоринянц С.Э., Смирнова Ю.Н., Носов А.В., Чайко А.Л., Носов А.М. (2005) Суспензионная культура клеток *Panax japonicus* var. *repens* 1. Параметры роста и цитогенетические характеристики. *Биотехнология*, **5**, 21–28.

5. Решетняк О.В., Смоленская И.Н., Смирнова Ю.Н., Чайко А.Л., Носов А.В., Носов А.М. (2005) Суспензионная культура клеток *Panax japonicus* var. *repens* 2. Качественный и количественный состав гинзенозидов в клетках при культивировании *in vitro*. *Биотехнология*, **6**, 20–26.

6. Смоленская И.Н., Решетняк О.В., Смирнова Ю.Н., Черняк Н.Д., Глоба Е.Б., Носов А.М., Носов А.В. (2007) Противоположное влияние синтетических ауксинов – 2,4-дихлорфеноксиуксусной и 1-нафтилуксусной кислот на рост культуры клеток женьшеня настоящего и синтез гинзенозидов. *Физиология растений*, **54**, 243–252.

7. Смоленская И.Н., Решетняк О.В., Носов А.В., Смирнова Ю.Н., Носов А.М. (2007) Оптимизация условий роста и биосинтеза гинзенозидов в суспензионной культуре клеток женьшеня настоящего. Тез. докл. VI съезда общества физиологов растений России и Международной конференции «Современная физиология растений: от молекул до экосистем». Сыктывкар, Часть 3, с. 202-203.

8. Smolenskaya I.N., Reshetnyak O.V., Nosov A.V., Zorinians S.E., Chaiko A.L., Smirnova Y.N., Nosov A.M. (2007) Ginsenoside production, growth and cytogenetic characteristics of sustained *Panax japonicus* var. *repens* cell suspension culture. *Biologia plantarum*, **51**, 235-241.

9. Решетняк О.В., Черняк Н.Д., Смоленская И.Н., Орешников А.В., Смирнова Ю.Н., Носов А.М. (2008) Сравнительный анализ гинзенозидов в разных частях корней и в культивируемых клетках женьшеня настоящего. *Хим. фарм. журн.*, 42, 34-39.

10. Смирнова Ю.Н., Решетняк О.В., Смоленская И.Н., Носов А.В. (2008) Влияние ауксинов на синтез гинзенозидов в суспензионной культуре клеток женьшеня настоящего. *Тез. докл. IX международной конференции "Биология клеток растений in vitro и биотехнология"*, Звенигород, с. 350.