

УДК 581.143.6

ЗАКОНОМЕРНОСТИ ДЕЙСТВИЯ ОСМОТИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НА ПРОДУКТИВНОСТЬ И СИНТЕЗ СТЕРОИДНЫХ САПОНИНОВ В КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУРАХ *TRIGONELLA FOENUM-GRAECUM* L.

А.О. Логвина, Д.Ю. Глушакова, О.Н. Тышкевич, В.М. Юрин

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь,

e-mail: yurin@bsu.by

Введение

Пажитник греческий (*Trigonella foenum-graecum* L.) характеризуется уникальной способностью синтезировать стероидные сапонины – вещества, наличие которых обуславливает такие важные с точки зрения современной медицины свойства, как противораковая, антидиабетическая, противогипертоническая и другие виды активности.

Клеточные культуры являются альтернативными нативным лекарственным растениям источниками фармакологически ценных вторичных метаболитов [1], в частности стероидных сапонинов [2]. Хотя их синтез достаточно хорошо изучен в культурах клеток пажитника греческого *in vitro*, но до настоящего времени актуальными остаются вопросы, касающиеся повышения продуктивности биомассы и синтезируемых целевых соединений [3–5].

Существенное влияние на рост и синтетическую активность культур оказывает видовая принадлежность, генотип, а также эпигенетические факторы [6]. Поэтому необходимо разработать современные биотехнологические подходы к культивированию отдельных видов растений, тканей и клеток, позволяющие стимулировать процессы роста и биосинтеза вторичных метаболитов.

В связи с тем, что биосинтетические свойства клеточных культур в значительной степени зависят от активности прироста биомассы, фазы ростового цикла и их морфологических особенностей, требуется проведение детального морфофизиологического исследования культуры *in vitro* наряду с биохимическим. Также известно, что на физиолого-биохимические характеристики культуры *in vitro* может влиять ее происхождение, поэтому целесообразным является увеличение числа тестируемых клеточных линий разных органов одного растения для выявления наиболее продуктивной.

В отдельных исследованиях показано, что внесение в культивируемую среду элиситоров может повысить количество синтезированных сапонинов. Так, отмечается повышение накопления тритерпеновых сапонинов в каллусной культуре *Quillaja brasiliensis* под действием сорбита, хлорида натрия и полиэтиленгликоля. Такой же эффект был получен для культуры клеток женьшеня. Воздействие 0,3 М сорбита в момент инокуляции также повышает биосинтез сапонинов, но приводит к одновременному снижению скорости роста клеток [7].

Естественно, учитывая фототрофность растений, не последнюю роль в процессах роста и синтеза метаболитов должен играть и свет. В частности, перенесение выращиваемых в темноте гетеротрофных культур клеток и тканей на свет во многих случаях способствует повышению их биосинтетической способности [8]. Стимулирующий эффект света показан на синтез антоцианинов, виндолина, катарантина и кофеина в суспензионных культурах [9].

В этой связи целью настоящей работы было установление характера влияния сахароспиртов (сорбит, маннит, глицерин) в различных концентрациях, выполняющих и роль осмолитиков, на активность ростовых процессов и уровень накопления стероидных сапонинов в стеблевой каллусной культуре пажитника греческого в условиях темноты и света.

Методы исследования

Культивирование стеблевого каллуса пажитника греческого ярового сорта Ovari 4 осуществляли на питательной среде, состав которой был оптимизирован в наших

исследованиях [5]. Минеральная основа питательного раствора соответствовала среде Мурасиге и Скуга (МС) [10]. Среда МС дополняли 1,0 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты, 1,0 мг/л кинетина, 2,0 мг/л индолил-3-уксусной кислоты и 4% сахарозы. Для приготовления плотной среды был использован агар в концентрации 8 г/л. Величина рН питательных сред до автоклавирования составляла 5,7–5,8. Питательные среды стерилизовались путем автоклавирования при 0,5 атм и 130°C в течение 30–40 мин. Каллусная культура выращивалась в темноте в условиях микробиологического термостата при температуре 24°C (гетеротрофная линия) и на свету при освещенности 3000 люкс и комнатной температуре (фотопериод – 14 часов свет и 10 часов темнота) (фотомиксотрофная линия).

Исследование влияния многоатомных спиртов на рост и содержание стероидных сапонинов в каллусе пажитника греческого, выращиваемом на свету и в темноте включало тестирование следующих их концентрации: 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5%. Контролем служила питательная среда МС, не содержащая сорбит, маннит и глицерин.

Для оценки активности ростовых процессов каллусных культур пажитника греческого определяли удельную скорость роста по формуле:

$$V=(W_t-W_0)/\Delta t \times W_0 \quad (1.1),$$

где W_0 – начальная масса каллуса, г;

W_t – масса каллуса в конце цикла выращивания, г;

t – продолжительность культивирования, сут.

Общее содержание стероидных сапонинов в 70%-х водно-спиртовых экстрактах каллусов определяли с использованием общепринятой спектрофотометрической методики. К 2 мл этилацетата добавляли 0,5 мл 70%-го водно-спиртового экстракта, 1 мл 0,5%-го анисальдегида, приготовленного на этилацетате, и 1 мл 50%-го этилацетатного раствора серной кислоты. Смесь выдерживали на водяной бане при 60°C в течение 10 мин, затем охлаждали в течение 10 мин и определяли оптическую плотность опытных растворов на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 1 см при длине волны 430 нм. Контролем служил раствор, приготовленный описанным выше способом, но в который вместо экстракта был добавлен 70%-й этанол.

Расчет количественного содержания общего содержания стероидных сапонинов в пересчете на диосгенин проводили на стационарной фазе роста по следующей формуле:

$$C=(R \times DF \times V)/M, \quad (1.2),$$

где C – общее содержание стероидных сапонинов, мг/г сухой массы в эквиваленте диосгенина;

R – содержание стероидных сапонинов в эквиваленте диосгенина в аликвоте экстракта, соответствующее измеренной оптической плотности и найденное из калибровочного графика, мг/мл;

DF – степень разведения (если такое проводилось);

V – объем экстракта, мл;

M – масса навески растительного материала, взятая для экстракции, г.

Для обработки полученных результатов были использованы стандартные методы вариационной статистики. Основными статистическими характеристиками служили: средняя арифметическая величина, среднее квадратичное отклонение и ошибка средней величины. Для оценки достоверности различий между вариантами пользовались критерием Стьюдента [10].

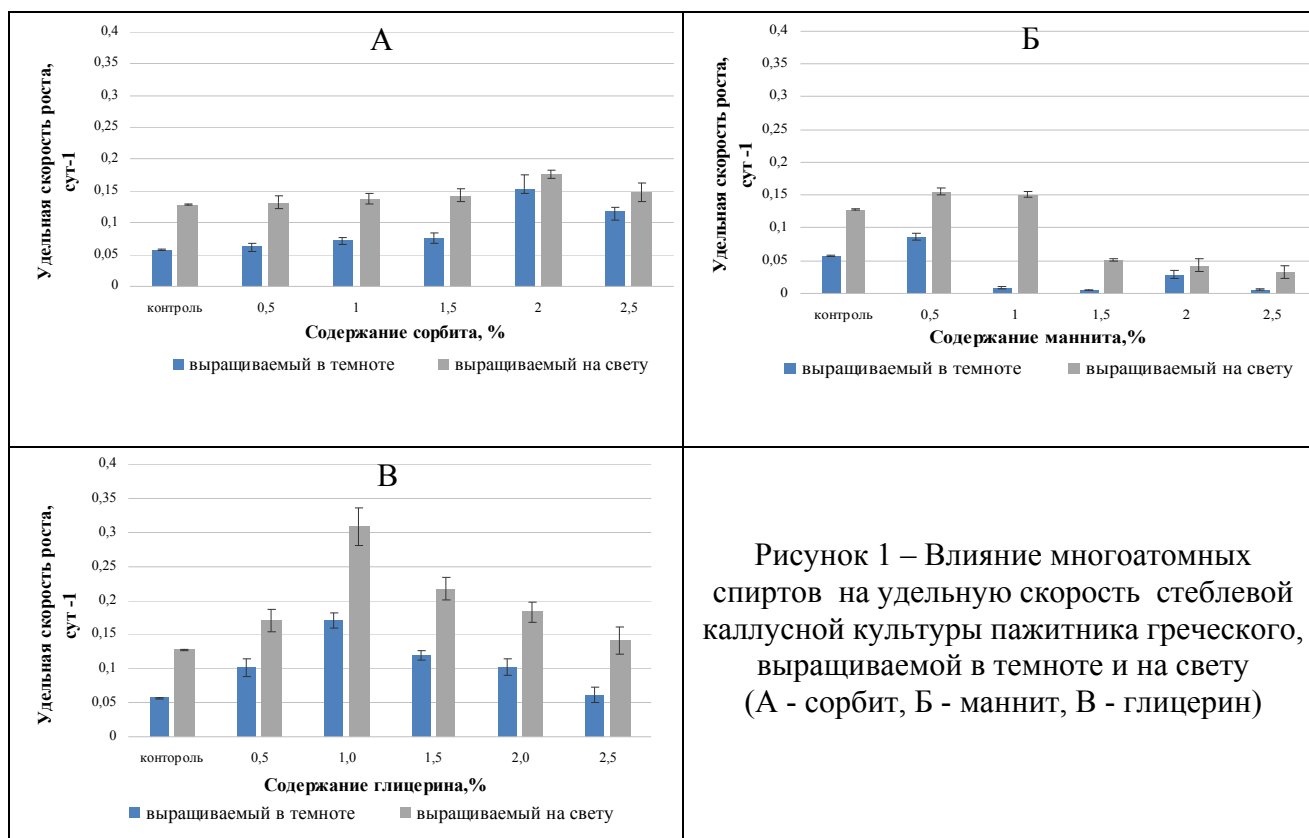
Результаты и обсуждение

Как отмечалось, уровни накопления продуктов вторичного метаболизма в культурах растительных клеток и тканей в большинстве случаев ниже, чем в интактных растениях.

Возможно, использование многоатомных спиртов позволит перераспределить предшественники с первичных метаболических путей на вторичный синтез.

Выделение данной группы индукторов связано с тем, что синтез вторичных метаболитов клеточными культурами является частью ответной стрессовой реакции, в частности осмотической.

Морфометрические показатели. При добавлении в питательную среду сорбита в концентрации 0,5% и последующем увеличении его содержания до 1,5% наблюдалось незначительное увеличение удельной скорости роста как гетеротрофной, так и фотомиксотрофной линий каллусной культуры пажитника греческого по сравнению с контролем. Осмолитик в концентрации 2% вызывал наибольший эффект, а именно, удельная скорость роста повышалась в 2,5 раза по сравнению относительно контрольного варианта. При внесении 2,5% сорбита в питательную среду наблюдаемый эффект снижался (рисунок 1, А).



Показано, что во всех исследуемых вариантах опытов скорость роста в присутствии сорбита была выше при культивировании каллусной ткани на свету, причем во всех случаях она превышала контрольные значения. Разница между удельной скоростью роста гетеротрофной и фотомиксотрофной линий культуры была более выражена при изменении концентрации указанного осмотика от 0,5% до 1,5%. При этом интенсивность роста обеих линий была наиболее высокой после внесения в состав питательной среды 2% сорбита (рисунок 1, А).

При добавлении в среду маннита в концентрации 0,5% и 1,0 % наблюдалась значительная достоверная стимуляция роста фотомиксотрофной линии каллусной ткани относительно контроля, но при увеличении содержания данного соединения до 1,5% и выше удельная скорость роста ее достоверно снижалась (рисунок 1, Б). Резкое снижение удельной скорости роста для гетеротрофной линии клеток происходило при внесении в питательный раствор осмолитика в концентрации 1,0% и выше.

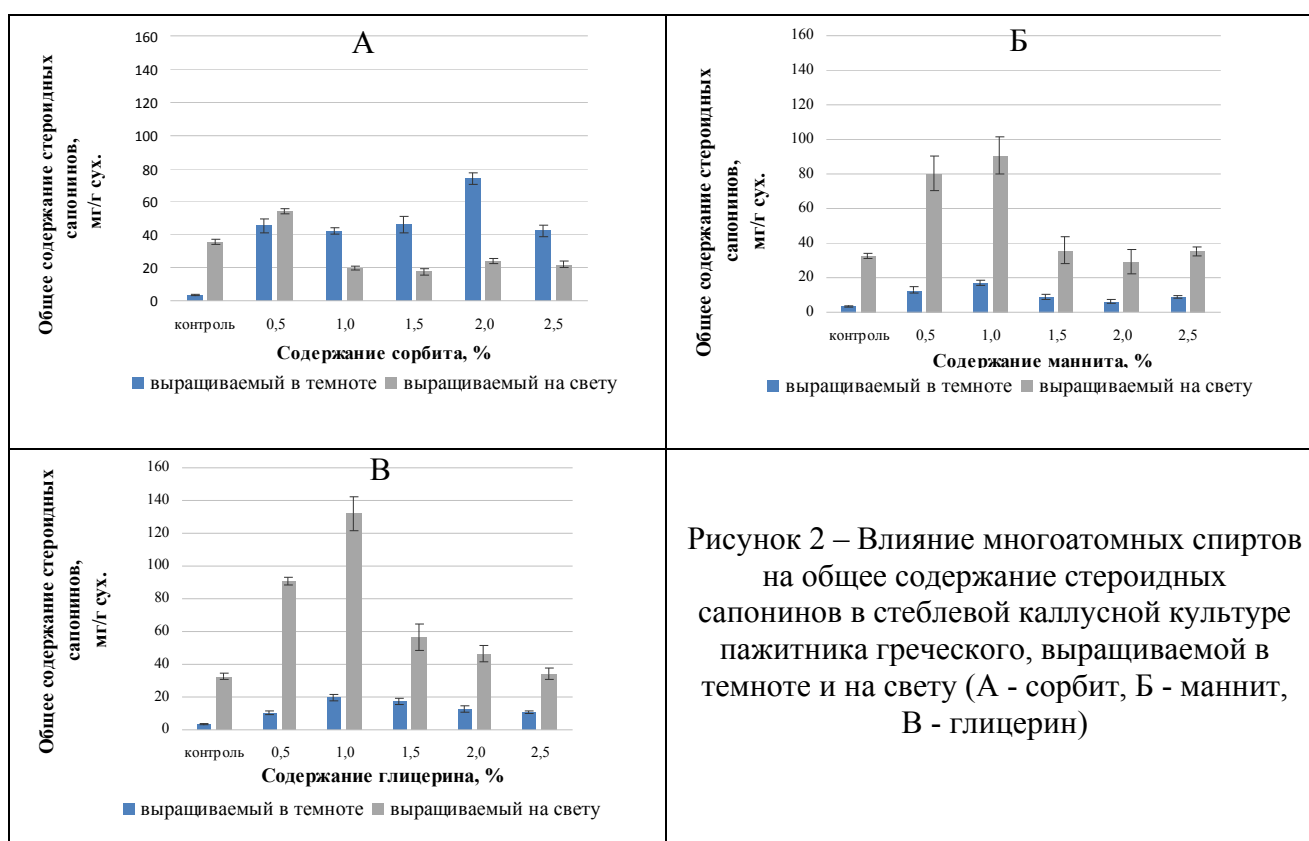
Таким образом, можно заключить, что культивирование каллусной культуры пажитника греческого на свету и при наличии в питательной среде маннита в концентрации 0,5% наилучшим образом сказывается на накоплении биомассы исследуемой каллусной культуры.

В ходе изучения действия глицерина на рост гетеротрофной клеток было установлено увеличение удельной скорости роста при его содержании 0,5-2% по сравнению с контрольным образцом (рисунок 2, В). При этом максимальный положительный эффект выявлен при внесении в питательную среду глицерина в концентрации 1%.

Глицерин в концентрациях 0,5% и 1% оказывал положительное влияние на удельную скорость роста фотомиксотрофной линии. Дальнейшее повышение уровня глицерина в питательной среде до 1,5, 2 и 2,5% вызывало замедление роста каллусов. Тем не менее активность ростовых процессов в данных вариантах оставалась выше, чем в контрольных образцах.

Таким образом, включение в состав среды глицерина в концентрации 1% оказывает наиболее значительное стимулирующее действие на уровень накопления биомассы каллусной культуры, полученной из эксплантов стебля, независимо от условий освещения.

Содержание стероидных сапонинов. Внесение в питательную среду сорбита во всех тестируемых концентрациях (0,5-2,5%) приводило к достоверному повышению содержания данных метаболитов в каллусе, выращиваемом в темноте, по сравнению с контролем (рисунок 2, А). Наибольшее влияние на накопление стероидных сапонинов оказывал осмолитик в концентрации 2%.



В случае фотомиксотрофной каллусной линии при добавлении в среду ее культивирования 1, 1,5, 2 и 2,5 % сорбита наблюдалось достоверное снижение значений определяемого биохимического показателя относительно контрольного варианта. Тогда как под действием сорбита в концентрации 0,5% происходило повышение биосинтетической активности в 2 раза по сравнению с контролем.

При внесении в состав питательной среды маннита в концентрациях 0,5 и 1% в каллусной ткани пажитника греческого, выращенной в темноте, выявлено достоверное увеличение накопления стероидных сапонинов по сравнению с контролем в 2 и 3 раза соответственно. Аналогичная закономерность отмечена и для фотомиксотрофной ткани (рисунок 2, Б). При дальнейшем увеличении концентрации маннита от 1,5 до 2,5% установлено уменьшение общего содержания стероидных сапонинов в каллусной культуре, выращиваемой как в темноте, с сохранением более высоких значения относительно контроля. Для фотомиксотрофной линии каллуса внесение в состав среды 1,5-2,5 % маннита значимого эффекта не оказывало.

Изучение влияния глицерина на биосинтетическую активность гетеротрофной линии каллусной культуры пажитника греческого показало, что при добавлении его в питательную среду в концентрациях 0,5-2,5% происходило достоверное увеличение содержания стероидных сапонинов по сравнению с контрольным образцом (рисунок 2, В). При этом максимальный положительный эффект глицерина выявлен для каллуса, выращенного на питательной среде с 1%-м содержанием осмотика.

В присутствии глицерина в концентрации 0,5 и 1% также наблюдалось повышение уровня стероидных сапонинов в фотомиксотрофной линии культуры относительно контроля. При дальнейшем увеличении содержания глицерина в среде до 1,5, 2 и 2,5% сохранялось его стимулирующее действие на образование стероидных сапонинов, однако оно было менее выраженным, чем при добавлении в среду данного осмолитика в более низких тестируемых концентрациях.

Анализ данных, полученных в ходе эксперимента, позволяет заключить, что наиболее значительный положительный эффект на уровень накопления стероидных сапонинов каллусом независимо от условий освещения глицерин оказывал в концентрации 1%. Более того, биосинтетическая активность фотомиксотрофной линии, выращиваемой на питательной среде с добавлением 1% глицерина, была выше по сравнению с гетеротрофной линией.

Во всех изученных вариантах опыта отмечается корреляция между удельной скоростью роста и содержанием стероидных сапонинов в фотомиксотрофной и гетеротрофной линиях каллуса пажитника греческого. Одновременно с этим оптимальные концентрации осмолитиков варьируют. Так, для сорбита это концентрация, равная 2 %, для маннита - 0,5 % и глицерина - 1%, причем более высокие показатели роста и биосинтетической активности характерны для фотомиксотрофной линии культуры.

Повышенная скорость роста и накопления стероидных сапонинов в каллусной ткани, выращиваемой на свету по сравнению с гетеротрофной линией, при более низких концентрациях исследуемых сахароспиртов связаны с их функциями в растениях, которые включают в себя запасание и генерацию восстановителей и органического углерода, осморегуляцию, защиту от окислительного стресса и регуляцию фотосинтетических процессов. Например, D- маннит является одним из первичных продуктов фотосинтеза у водорослей. В виде D-изомера сорбит довольно широко распространен как резервное вещество в высших растениях, водорослях. Глицерин при окислении превращается в два моносахарида – глицериновый альдегид и диоксиоцетон, которые играют важную роль в метаболизме углерода в растительной клетке. Кроме того, триглицериды, структурным компонентом которых является глицерин - основные компоненты клеточных мембраны [11–13].

Подавление исследуемых процессов повышенными концентрациями сорбита, маннита и глицерина, вероятно, обусловлено осмотическим стрессом, который ингибирует рост многих культур *in vitro*. Например, у гетеротрофных и фотомиксотрофных каллусов сосны водный стресс вызывал торможение роста и уменьшение клеточного объема [14]. В суспензионной культуре клеток моркови с уменьшением водного потенциала также отмечали снижение сырой и сухой массы неадаптированных клеток [15].

В заключение отметим, что используемые подходы позволяют повысить продуктивность и биосинтетическую способность стеблевых каллусных тканей пажитника греческого ярового сорта.

Выводы

Более интенсивное накопление биомассы гетеротрофной и фотомиксотрофной линиями стеблевой каллусной культуры пажитника греческого ярового сорта Ovari 4 отмечалось в присутствии в питательных средах 2% сорбита или 0,5% маннита или 1% глицерина. Культивирование на свету при однокомпонентном внесении многоатомных спиртов в состав питательных сред оказывало более выраженное положительное действие на удельную скорость роста каллусной ткани.

Добавление в питательную среду сорбита в концентрации 2% или маннита в концентрации 1% или глицерина в концентрации 1% стимулировало синтез стероидных сапонинов в каллусной культуре, выращенной как на свету, так и в темноте. При культивировании каллуса на свету внесение многоатомных спиртов в питательную среду оказывало более выраженное положительное влияние на синтез исследуемых вторичных метаболитов.

Для повышения биосинтетической продуктивности рекомендуется использовать фотомиксотрофную линию культуры с внесением в питательные растворы сорбита в концентрации 2% или маннита в концентрации 0,5% или глицерина в концентрации 1%.

Список литературы

1. Бутенко, Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе / Р.Г. Бутенко; под ред. Е.И. Павлович. – Москва: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 152 с.
2. Jha, T. V. Plant tissue culture: basic and applied / T. V. Jha, B. Ghosh. –Orient Blackswan, 2005. – 232 p.
3. Логвина, А.О. Динамика накопления фенольных соединений и сапонинов каллусными культурами пажитника греческого в ходе ростового цикла / А.О. Логвина, Д.Ю. Глушакова, Т.И. Дитченко, В.М. Юрин // Вестник БГУ. – 2014. – Сер. 2, ч. 1. – С. 27–31.
4. Lohvina, H.O. Induction of callus from leaves and stems of *Trigonella foenum-graecum* varieties / H.O. Lohvina, S. Makai, T.I. Ditchenko, V.N. Reshetnikov, E.V. Spiridovich, V.M. Yurin // Acta Agronomica Óváriensis. – 2012. – Vol. 54, iss. 2. – P. 29–37.
5. Логвина, А.О. Физиолого-биохимические характеристики клеточных культур *Trigonella foenum-graecum* L.6 дис. канд. биол. наук: 03.01.05 / А.О. Логвина.- Минск. 2015. – 239 с.
6. Endress, R. Plant Cell Biotechnology / R. Endress. // Berlin ; New York : Springer-Verlag, 1994. – 353. P. 56.
7. De Costa, F. Accumulation of a bioactive triterpene saponin fraction of *Quillaja brasiliensis* leaves is associated with abiotic and biotic stresses / De Costa F. [et al.] // Research Support.– 2013. – Vol. 10. – P.452-455.
8. Zhong, J.-J. Biochemical Engineering of the Production of Plant-Specific Secondary Metabolites by Cell Suspension Cultures / J.-J. Zhong // Advances in Biochemical Eng. / Biotechnology. - 2001. - Vol. 72 : Plant cells. - P. 1-26.
9. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // *Physiol. Plant.* – 1968. – Vol. 15, iss. 13. – P. 473–497.
10. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика / П.Ф. Рокицкий. – М.: Высш. шк., 1978. – 319 с.
11. Усов, А.И. Бурые водоросли Камчатки как источник маннита / А.И. Усов, Н.Г. Клочкова // Биоорганическая химия. – 1994. – Т. 20. № 11. – С. 1236-1241.
12. Loescher, W. H. Physiology and metabolism of sugar alcohols in higher plants / W.H. Loescher // *Physiol. Plant.* 1987. Vol. 70. P. 553–557
13. Кретович, В.Л. Биохимия растений: учебник для биол. Факультетов ун-тов. М.: Высш. Школа. 1980. 445 с.

14. Valluri J. V., Treat W. J., Castillon J., Soltes E. J. Comparison of photomixotrophic and heterotrophic callus and suspension cultures of *Pinus elliottii*. 2. Water stress induced changes in callus volume and protein profiles // *Plant Physiol. Biochem.* — 1990. — V. 28, N 1. — P. 57–64.

15. Fallon K., Phillips R. Responses to waterstress in adapted and unadapted carrot cell cultures // *J. Exp. Bot.* — 1989. — V. 40, N 1. — P. 681–687].

**PATTERNS OF EXPOSURE OF OSMOTIC ACTIVE SUBSTANCES
ON PRODUCTIVITY AND SYNTHESIS OF STEROIDAL SAPONINS
IN *TRIGONELLA FOENUM-GRÆCUM* L. CALLUS CULTURES**

H.O. Lohvina, D.Y. Hlushakova, O.N. Tyshkewich, V.M. Yurin

Belarusian State University, Minsk, Belarus

e-mail: yurin@bsu.by

The aim of this work was to determine the nature of the influence of some sugar alcohols (sorbitol, mannitol, glycerol) at various concentrations on the activity of the growth processes and the level of accumulation of steroidal saponins in stem callus culture of *Trigonella foenum-graecum* of “spring-summer” cultivar Ovari 4 under conditions of dark and light. It has been shown that the highest growth rate as well as biosynthetic activity observed for photomixotrophic callus line. Adding polyhydric alcohols (2% sorbitol or 0.5-1.0% mannitol or 1% glycerol) to nutrient medium resulted in increased biosynthetic productivity of the studied cultures *in vitro*.