

*Биология*

УДК 615.322:547.836.3.012

Е. Н. ЩЕРБАКОВА, Ю. Г. ПОПОВ

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА СИНТЕЗ  
НАФТОХИНОНОВ В ИЗОЛИРОВАННЫХ ТКАНЯХ АЛКАННЫ  
(*ALKANNA ORIENTALIS* L.) И ОНОСМЫ (*ONOSMA SERICEA* L.)

Изучено влияние некоторых минеральных солей и гормональных соединений на синтез нафтохинонов в изолированных тканях *Alkanna orientalis* и *Onosma sericea*. Исключение из питательной среды аммиачного азота, увеличение концентрации меди и бензиламинопурина интенсифицировали синтез нафтохинонов в изолированных тканях алканны. Нафтилуксусная кислота оказывала стимулирующее влияние на рост тканей алканны, но угнетала биосинтетические процессы.

**Введение.** Определение роли отдельных компонентов питательной среды на рост и метаболизм изолированных растительных тканей было предметом изучения большого числа исследователей. Как правило, в изолированных культурах резко снижается биосинтетический потенциал продуцирования вторичных метаболитов, что связано, прежде всего, с полной или частичной потерей способности этих культур к реализации генетической информации, относящейся к вторичному обмену [1]. Однако присущая растительным клеткам тотипотентность свидетельствует о том, что генетическая информация не исчезает полностью и для ее реализации требуются специфические условия. К факторам, способным восстановить замаскированную генетическую информацию, относятся регуляторы роста, предшественники, отдельные элементы питания, свет [1–5].

Полученная нами культура алканны способна к видоспецифическому синтезу нафтохинонов [6]. Но для повышения биосинтетической активности ткани необходимо подобрать соответствующие условия роста и, в первую очередь, состав питательной среды.

Целью представляемой работы являлось изучение влияния регуляторов роста – бензиламинопурина (БАП), нафтилуксусной кислоты (НУК), индоллил-3-уксусной кислоты (ИУК) и некоторых минеральных солей на рост и синтез нафтохинонов в изолированных тканях алканны и оносмы.

**Методы исследования.** Объектом исследований являлись полученные нами каллусные ткани алканны восточной (*Alkanna orientalis*) различного

происхождения [6], а также оносы шелковистой (*Onosma sericea*) листового происхождения.

При выяснении роли отдельных компонентов питательной среды на рост и биосинтез нафтохинонов в изолированных тканях алканны и оносы использовались различные питательные среды:

- среда Р – среда Мурасиге и Скуга (МС) [7] с добавлением 2 мг/л БАП и 0,5 мг/л ИУК (контроль);
- среда № 5 – МС с добавлением 3 мг/л БАП и 0,5 мг/л ИУК;
- среда № 6 – не содержит нитрат аммония, концентрация меди увеличена до 0,2 мг/л, БАП 2 мг/л и ИУК 0,5 мг/л;
- среда № 7 – среда № 6, в которой вместо ИУК добавлена НУК в концентрации 0,5 мг/л;
- среда № 8 – среда № 6, но с увеличенным до 3 мг/л количеством БАП;
- среда № 9 – среда № 7 с увеличенным до 3 мг/л количеством БАП.

Для характеристики ростовой активности каллусных культур во всех вариантах определяли вес сырой массы ткани в граммах и ростовой индекс (РИ, отношение полученной сырой биомассы к первоначальному весу) [8]. Определение нафтохинонов проводили методом, описанным нами ранее в [6]. Контролем для каллусных культур служил корень интактного растения оносы, так как именно в подземных органах накапливаются нафтохиноны [9].

**Результаты и обсуждение.** Для контроля каллусные ткани алканны различного происхождения (лист, стебель, корень) выращивали на питательной среде Р. На этой среде каллусные ткани листового и корневого происхождения имеют буро-коричневый цвет, твердые, рыхлые, при встряхивании распадаются на отдельные кусочки. Каллусная ткань стеблевого происхождения более рыхлая, мягкая, имеет бурый цвет. К 20 дню культивирования на поверхности каллусов появляются клетки карминного цвета, а к концу пассажа (на 30–35 день) вся ткань приобретает буро-вишневый цвет.

Каллусная ткань оносы на среде Р растет медленнее, индекс роста составляет всего 8–10 (против 15–17 у алканны). Каллус компактный, но мягкий, имеет также буро-коричневый цвет.

Проведенный спектрофотометрический анализ экстрактов из каллусных тканей алканны и оносы, выращенных на среде Р, показал наличие в них нафтохиноновых пигментов (см. табл.).

С целью стимулирования процессов биосинтеза в изолированных тканях алканны и оносы последние выращивались на различных питательных средах, отличающихся набором и концентрацией гормональных соединений и некоторых минеральных солей. Оказалось, что повышение концентрации БАП в питательной среде до 3 мг/л (среда № 5), не влияя на ростовые показатели, способствовало увеличению количества нафтохинонов в каллусных тканях алканны листового и стеблевого происхождения в 5 и 8 раз соответственно по сравнению с контролем. На корневую ткань повышение концентрации БАП не оказало влияния, а у ткани оносы даже ингибировало синтез нафтохинонов (см. табл.).

Рост каллусных тканей *A. orientalis* и *O. sericea* и содержание в них нафтохинонов в зависимости от происхождения культуры и состава питательной среды

Происхождение культуры	Питательная среда	РИ	Сумма нафтохинонов, мг/г сухого в-ва	Нафтохиноны, % от сух. веса	
<i>Alkanna orientalis</i>	лист	Р (контр.)	17	1,11	0,11
		5	16	5,50	0,55
	стебель	Р (контр.)	14	0,93	0,093
		5	16	8,10	0,81
		6	13	4,8–14,85	0,48–1,49
		7	21	3,40	0,34
		8	17	11,54	1,15
		9	23	4,68	0,47
	корень	Р (контр.)	16	1,40	0,14
		5	15	1,87	0,19
		6	11	3,17–29,80	0,32–2,98
		7	19	1,50	0,15
		8	14	5,07	0,51
<i>Onosma sericea</i>	лист	Р (контр.)	10	0,56	0,06
		5	9	0,25	0,03
		6	10	0,40	0,04
		7	8	0,81	0,08
	Лист интактного растения			0,09	0,01
	Корень интактного растения			2,37	0,24

Изучая зависимость синтеза шиконина в клеточной культуре *Lithospermum erythrorhizon* от состава питательной среды, Гайсер и Хейде [4] установили, что на питательной среде Линсмайера и Скуга, содержащей ионы аммония, происходит подавление синтеза шиконина. А в производственной среде, не содержащей ионы аммония и при наличии ионов меди, продукция шиконина возрастала. Исходя из вышесказанного, мы изменили состав минеральных солей в питательной среде для роста изолированных тканей алканны и оносмы, а именно, исключили из среды нитрат аммония, а концентрацию меди в составе микроэлементов по МС увеличили до 0,2 мг/л (среда № 6). Это несколько снизило темпы роста каллусных тканей алканны стеблевого и корневого происхождения, а на поверхности каллусов уже на 12–15 день культивирования появлялись участки, окрашенные в темно-красный цвет. Спектрофотометрическое определение нафтохинонов в экстрактах из таких тканей алканны 3–5 пассажей показало увеличение количества нафтохинонов по сравнению с контролем в 3–4 раза (4,8 мг/г сух. веса у стеблевой ткани и 3,7 мг/г сух. веса у корневой). При дальнейшем пассировании каллусных тканей алканны нами каждый раз отбирались наиболее окрашенные участки, в результате чего к 21–22 пассажу уже вся масса каллусной ткани имела красно-бордовый цвет. Спектрофотометрический анализ экстрактов из этих тканей показал значительное увеличение нафтохинонов (в 16–21 раз) по сравнению с контролем – 14,85 мг/г сух. веса в стеблевой ткани и 29,80 мг/г сух. веса в корневой ткани (см. табл). Следует отметить, что в корневой каллусной ткани биосинтетические процессы происходили более активно,

чем в стеблевой, а количество нафтохинонов здесь почти в 12 раз было больше, чем в корнях интактного растения оносмы.

Исключение аммиачного азота и увеличение концентрации меди на фоне повышенного содержания БАП в среде № 8, не влияя на рост каллусных тканей, стимулировали биосинтетические процессы в стеблевой каллусной ткани алканны, но при этом уровень нафтохинонов оставался ниже, чем на среде № 6. В корневой же каллусной ткани такое соотношение компонентов в питательной среде если и вызывало незначительное увеличение количества нафтохинонов по сравнению с контролем, то в сравнении со средой № 6 резко ингибировало биосинтез нафтохинонов.

Замена ИУК на НУК в питательных средах №№ 7 и 9 приводила к увеличению ростовых показателей в каллусных тканях алканны, но синтез нафтохинонов резко снижался.

На рост каллусной ткани оносмы изменение состава питательной среды не оказало никакого влияния. И только наличие НУК в среде № 7 незначительно повысило количество синтезируемых нафтохинонов по отношению к контролю (см. табл.).

Обобщая полученные результаты, можно сказать, что изменение состава минеральных солей в питательной среде способствует значительному повышению уровня нафтохинонов в тканях алканны. Но если при этом заменить ИУК на НУК, то наблюдается усиление ростовых процессов, а синтез нафтохинонов снижается. Увеличение концентрации БАП в среде на фоне ИУК также способствует усилению биосинтетических процессов в тканях алканны, а замена ИУК на НУК это стимулирующее влияние снимает. И только для ткани оносмы НУК оказывает незначительное стимулирующее влияние на синтез нафтохинонов.

*Институт ботаники НАН РА,  
кафедра микробиологии и биотехнологии  
растений и микроорганизмов ЕГУ*

*Поступила 16.11.2010*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. **Запрометов М.Н.** Культура клеток растений. М.: Наука, 1981, с. 37–50.
2. **Атанасов А.И.** Биотехнология в растениеводстве. Новосибирск: ИЦИГ СО РАН, 1993, 241 с.
3. **Носов А.М.** Физиология растений, 1994, т. 41, вып. 6, с. 873–878.
4. **Gaisser S., Heide L.** Phytochemistry, 1996, v. 41, № 4, p. 1665–1672.
5. **Шевелуха В.С., Калашникова Е.А., Дегтярев С.В., Кочиева Е.З., Прокофьев М.И., Новиков М.И., Ковалев В.М., Калашников Д.В.** Сельскохозяйственная биотехнология. М.: Высшая школа, 1998, 416 с.
6. **Щербакова Е.Н., Карягина Т.Б., Попов Ю.Г.** Ученые записки ЕГУ, 2005, № 2, с. 100–105.
7. **Murashige T., Skoog F.** Physiol. Plantarum, 1962, v. 15, № 13, p. 473–479.
8. **Брезнеговская Л.Н., Гусев И.Ф., Дмитрук С.Е., Смородин А.В., Смородин В.В., Трофимова Н.А., Шмыкова Н.А.** Культура тканей и клеток алкалоидных растений. Томск: Изд-во Томского университета, 1975, 194 с.
9. Растительные ресурсы СССР. Цветковые растения, их химический состав, использование. Кн. 5 (под ред. Соколова П.Д.). Л.: Наука, 1990, 328 с.

Ե. Ն. ՇՉԵՐԲԱԿՈՎԱ, Յու. Գ. ՊՈՊՈՎ

ԽԱՐԻԻ (*ALKANNA ORIENTALIS* L.) ԵՎ ԻՇՀՈՏՈՏԻ (*ONOSMA SERICEA* L.)  
ՄԵԿՈՒՄԱՑՎԱԾ ՀՅՈՒՄՎԱԾՔՆԵՐՈՒՄ ՆԱՎԹԱՔԻՆՈՆՆԵՐԻ  
ՄԻՆԹԵԶԻ ՎՐԱ ՄՆԴԱՄԻՋԱՎԱՅՐԻ ԿԱԶՄԻ ԱԶԳԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ

#### Ա մ փ ո փ ո մ

Ուսումնասիրվել է որոշ հանքային աղերի և հորմոնների ազդեցությունը *Alkanna orientalis* և *Onosma sericea* մեկուսացված հյուսվածքներում նավթաքինոնների սինթեզի վրա: Սննդամիջավայրից ամոնիակային ազոտի հեռացումը, պղնձի և բենզիլամինոպուրինի կոնցենտրացիաների մեծացումը բարձրացրել են խարիի մեկուսացված հյուսվածքներում նավթաքինոնների սինթեզը: Նավթիլքացախաթթուն խթանել է խարիի հյուսվածքի աճը, սակայն ճնշել է կենսասինթեզի գործընթացները:

Ye. N. SHCHERBAKOVA, Yu. G. POPOV

INFLUENCE OF COMPOSITION OF NUTRIENT MEDIUM ON THE  
SYNTHESIS OF NAPHTHAQUINONES IN ISOLATED TISSUES OF  
ALKANET (*ALKANNA ORIENTALIS* L.) AND ONOSMA (*ONOSMA SERICEA* L.)

#### Summary

The influence of some mineral salts and hormonal substances on the synthesis of naphthaquinones in isolated tissues of *Alkanna orientalis* and *Onosma sericea* was studied. Exclusion of ammoniac salts from the nutrient medium as well as increasing of copper and BAP concentration intensified the synthesis of naphthaquinones in the isolated tissues of alkanet. NAA stimulated the growth of alkanet tissues, but suppressed biosynthetic processes.