

УДК 581.1

**И. Н. Смоленская, О. В. Решетняк, Е. С. Суханова,
С. Ю. Воевудская, А. М. Носов**

УВЕЛИЧЕНИЕ СИНТЕЗА ГИНЗЕНОЗИДОВ В СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ЖЕНЬШЕНЯ НАСТОЯЩЕГО ПРИ ДЕЙСТВИИ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА

Изучено влияние синтетических ауксинов – НУК (α -нафтилуксусная кислота) и 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксисуксусная кислота) на накопление и состав тритерпеноидных гликозидов в суспензионной культуре клеток женьшеня настоящего в течение длительного культивирования. Наряду с повышением уровня содержания гинзенозидов произошло изменение их качественного состава: в биомассе клеток, выращиваемых на среде с α -НУК, присутствовали семь основных гинзенозидов Rb- и Rg-групп, характерных для интактного растения.

Ключевые слова: *Panax ginseng*, гинзенозиды, суспензионная культура клеток, тритерпеновые гликозиды.

Введение. Женьшень – одно из самых древних лекарственных растений на Земле, имеющий достаточно узкий ареал распространения. Целебные свойства растений рода *Panax* известны давно и обусловлены уникальной композицией биологически активных веществ, центральное место среди которых принадлежит тритерпеновым гликозидам даммаранового ряда – гинзенозидам. По структуре агликона эти соединения делятся на две группы: 20(S)-протопанаксадиола (Rb-группа – Rb₁, Rb₂, Rc, Rd гинзенозиды) и 20(S)-протопанаксатриола (Rg-группа – Rf, Rg₁, Re гинзенозиды). По их содержанию оценивают сырье женьшеня при широком использовании его в медицине [1].

Фармакологическое действие этих двух групп соединений хорошо изучено, причем показано, что часто их активность имеет альтернативный характер [2].

Однако получение гинзенозидов из растений женьшеня процесс достаточно трудоемкий, поскольку запасы его ограничены как ареалом распространения, так и природными условиями. Введение растений рода *Panax* в культуру клеток может быть одним из способов замены природного растительного сырья. При получении культур клеток из этого растения исследователи прежде всего пытаются сохранить в условиях *in vitro* биосинтез тритерпеновых гинзенозидов даммаранового ряда, как наиболее активных фармакологических соединений. Изменяя состав и концентрации компонентов питательной среды, иногда удается повысить синтез вторичных метаболитов в культивируемых клетках. При этом важно сохранение всех составляющих групп гинзенозидов аналогично тому, что имеется в растении [3].

К соединениям, повышающим накопление вторичных метаболитов, относятся регуляторы роста, применяемые в различных концентрациях и сочетаниях. Однако сведения о влиянии гормонов на синтез соединений вторичного метаболизма и об их роли в этом процессе часто противоречивы [4,5].

Цель настоящей работы состояла в изучении влияния синтетических ауксинов – НУК (α -нафтилуксусная кислота) и 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксисукусная кислота) на накопление и состав тритерпеноидных гликозидов в суспензионной культуре клеток женьшеня настоящего в течение длительного культивирования.

Техника эксперимента. В качестве объекта исследования использована культура клеток *Panax ginseng* (С.А. Меу), полученная из корня шестилетнего плантационного растения (Ginseng & Tobaco, Южная Корея), депонированная в Российскую коллекцию культивируемых клеток высших растений (РККК-ВР) под № 66. В коллекции суспензия клеток сохраняется в течение 10 лет на среде Мурасиге и Скуга [6] с содержанием в качестве регуляторов роста 2,4Д (2 мг/л) и БАП (6-бензиламинопурин; 0,5 мг/л). Определение гинзенозидов проводили с помощью ВЭЖХ-анализа описанным ранее методом [7].

Изложение и интерпретация результатов. За время цикла выращивания суспензионная культура *P. ginseng* на стандартной среде прирастала в разных опытах от трех до пяти раз. Однако синтез гинзенозидов в этой суспензии практически отсутствовал. В разных циклах выращивания он колебался от 0,04 до 0,17 % от сухой биомассы и был представлен тремя гинзенозидами только Rg-группы (табл.1).

Т а б л и ц а 1

Сочетания фитогормонов

Цитокинины	Ауксины
Кинетин – 1 мг/л	2,4-Д – 2,37 мг/л
Кинетин – 1 мг/л	НУК – 2 мг/л
БАП – 1,04 мг/л	2,4-Д – 2,37 мг/л
БАП – 1,04 мг/л	НУК – 2 мг/л
БАП – 0,5 мг/мл Контроль	2,4-Д – 2 мг/л

Примечание: концентрация кинетина 1мг/л эквимолярна 1,04 мг/л БАП. Концентрация НУК 2 мг/л эквимолярна 2,37 мг/л 2,4-Д.

генетические, так и физиологические перестройки в результате различных воздействий. Об этом свидетельствует изменение их ростовых и биохимических параметров в ответ на смену регуляторов роста [9–10].

Для исследования влияния фитогормонов на синтез гинзенозидов в суспензионной культуре клеток *P. ginseng* параллельно с выращиванием на стандартной среде (содержащей 2 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л БАП) проводили выращивание этой линии на средах, отличающихся составом фитогормонов. Всего использовали четыре варианта сред, помимо контроля (табл.1). Количество и состав тритерпеновых гликозидов даммаранового ряда определяли на 21 сутки в течение первых 10 субкультивирований.

На средах, содержащих НУК, суспензия прирастала в 2–2,5 раза [10], этот показатель был ниже, чем на стандартной среде. Результаты ВЭЖХ-анализа для каждого варианта гормонального состава сред (А – Г) представлены в табл. 2.

Из представленных данных видно, что на средах, содержащих НУК в качестве ауксина (табл. 2, варианты В и Г), накопление гинзенозидов было гораздо выше – до 4–5 %

Снижение содержания гинзенозидов и сужение их спектра в условиях *in vitro* по сравнению с исходным растением наблюдали достаточно часто при получении других линий клеток *P. ginseng*, где их синтез либо был также низким, либо отсутствовал совсем [5, 8].

Одной из возможных причин низкого накопления гинзенозидов в суспензионных культурах клеток *P. ginseng* являются не оптимальные для их синтеза условия культивирования, в частности, состав регуляторов роста в питательной среде.

Популяции клеток *in vitro* высоко чувствительны к условиям культивирования, поскольку являются лабильными системами, претерпевающими значительные как

Таблица 2

**Количество и состав гинзенозидов в суспензионной культуре клеток
P.ginseng при длительном выращивании на различных средах**

№№ цикла суб- культи- вирования	Содержание гинзенозидов в мг/г абсолютно сухой биомассы							%
	Rb ₁	Rc	Rb ₂	Rd	Rf	Rg ₁	Re	
А) 1 мг/л кинетина и 2,37 мг/л 2,4-Д								
2	0,05	-	0,02	-	0,02	0,06	0,31	0,05
4	0,39	-	-	-	0,08	0,10	0,40	0,10
Контроль	-	-	-	-	0,07	0,08	0,23	0,04
Б) 1,04 мг/л БАП и 2,37 мг/л 2,4-Д								
1	0,07	-	0,04	-	0,05	0,16	0,36	0,07
4	0,03	-	-	-	0,03	0,07	0,52	0,07
6	0,03	-	-	-	0,03	0,41	1,34	0,18
10	0,85	--	--	--	0,15	1,98	1,60	0,46
Контроль	-	-	-	-	0,07	0,08	0,23	0,04
В) 1 мг/л кинетина и 2 мг/л НУК								
1	1,48	0,96	0,13	0,09	0,41	3,38	7,58	1,40
4	3,39	2,71	0,40	0,19	0,52	4,00	37,33	5,02
5	4,68	0,74	0,55	0,21	0,30	1,56	30,72	3,88
6	10,80	1,20	2,86	0,80	0,64	4,73	57,50	7,85
7	7,0	0,94	0,83	1,00	0,52	4,89	92,16	10,7
8	3,17	0,52	2,50	0,10	0,32	1,39	8,50	1,65
Контроль	-	-	-	-	0,07	0,08	0,23	0,04
Г) 1,04 мг/л БАП и 2 мг/л НУК								
2	0,93	0,15	0,12	0,08	0,33	2,16	4,63	0,84
4	3,39	1,75	0,40	0,25	0,34	2,81	32,00	4,09
6	2,91	0,40	0,35	0,21	0,36	2,34	17,49	2,41
10	0,41	--	--	--	0,15	2,20	20,00	2,3
17	1,05	след	след	0,30	след	2,36	13,71	1,74
Контроль	-	-	-	-	0,07	0,08	0,23	0,04

на 4 цикле субкультивирования (в контрольном варианте – 0,04 %). Однако на среде, содержащей в качестве цитокинина БАП (табл. 2, вариант Г), при дальнейшем субкультивировании уровень гинзенозидов снизился до 2 %, а на среде с кинетином (табл. 2, вариант В) – наоборот, повысился до 11 % к 7 пассажу.

В серии сред с использованием в качестве ауксина 2,4-Д (табл. 2, варианты А и Б) содержание вторичных метаболитов варьировало. В среднем в течение шести циклов выращивания их сумма составляла не более 0,18 %. В вариантах с 2,4-Д состав гинзенозидов Rb-группы был нестабилен.

При этом на средах с НУК синтез активизировался с 1-го субкультивирования, и в этих вариантах присутствовали все семь гинзенозидов, что сравнимо с интактным корнем растения (Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Rf, Rg₁, Re). Анализ спектра индивидуальных гинзенозидов показал, что в присутствии НУК активизируется синтез обеих групп соединений в суспензии, но больше всего Rb-группы. Основными компонентами были соединения с агликоном 20(S)-протопанаксатриол (Rf, Rg₁, Re – Rg-группа). Они составляют

наибольшую массу и накапливаются в течение всего цикла роста культуры. Мажорным в этой группе являлся Re-гинзенозид. Соединения с агликоном 20(S)-протопанаксадиол (Rb₁, Rb₂, Rc, Rd – Rb группа) содержатся в значительно меньших количествах – от 10 до 14 %, и вклад их в общую сумму гинзенозидов невелик, хотя синтез их также возрастает. Основным в этой группе являлся Rb₁-гинзенозид. К 6 и 7 пассажам увеличивается содержание всех семи гинзенозидов, и спектр их не меняется.

Преобладание гинзенозидов Rg-группы характерно и для других линий клеток *P. ginseng* [5, 11, 9] и *P. notoginseng* [12], в то время как в корнях растений чаще преобладает Rb-группа [13]. При сравнении динамики биосинтеза гинзенозидов в культуре клеток *P. ginseng* [10] с динамикой биосинтеза других тритерпенов [14,15] была выявлена закономерность – максимальное накопление этих соединений наблюдали в конце пассажей, когда пролиферативная активность минимальна и обычно происходит растяжение клеток и удвоение ДНК.

Вывод. Таким образом, на изменение количества и состава вторичных метаболитов в суспензии клеток *P. ginseng* большое влияние оказывает химическая природа ауксина. Присутствие НУК в питательной среде более благоприятно для процесса биосинтеза тритерпеновых гликозидов даммаранового ряда, о чем свидетельствует повышение их общей суммы и появление всех семи гинзенозидов, характерных для интактного корня, а также одинаковое отношение соединений Rg/Rb-групп.

Список литературы

1. Tanaka, O. Saponins of ginseng and related plants / O. Tanaka, R. Kaasi // Progress in chemistry of organic natural products: Berlin, Springer-Verlag. – 1984. – Vol. 46. – P. 1-76.
2. Craig, W.J. Health-promotion properties of common herbs / W.J. Craig // Amer. J. Clin. Nutr. – 1999. – Vol.70 (Suppl.). – P. 491S–499S.
3. Briskin, D.P. Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health / D.P. Briskin // Plant Physiol. – 2000. – Vol.124. – P. 507–514.
4. Liu, S. Phosphate effect on production of ginseng saponin and polysaccharide by cell suspension cultures of *Panax ginseng* and *Panax quinquefolium* / S. Liu, J.J. Zhong // Process Biochem. – 1998. – Vol. 33. – P. 69–74.
5. Чой, К.-Т. Продукция гинзенозидов культурой клеток женьшеня (*Panax ginseng* С.А. Мейер) / К.-Т. Чой, И.-О. Ан, Д.-Ч. Парк // Физиология растений. – 1994. – Т. 41. – С. 784-788.
6. Murashige, T. A Revised medium for rapid growth and bio assays with *Tobacco* tissue culture / T. Murashige, F. Skoog // Physiol.Plant. – 1962. – Vol. 15. – P.473-495.
7. Решетняк, О.В. Сравнительный анализ гинзенозидов в разных частях корней и в культивируемых клетках женьшеня настоящего / О.В. Решетняк, Н.Д. Черняк, И.Н. Смоленская и др. // Химико-фармацевтический журнал. – 2008. – Т. 42. – С. 34-39.
8. Кунах, В.А. Продуктивность и генетическая структура популяции клеток *Panax ginseng* С.А. Мейер при культивировании *in vitro* / В.А. Кунах, Л.П. Можилевская, В.И. Адонин, С.И. Губарь // Биотехнология. – 2003. – № 3. – С. 25–35.
9. Bonfill, M. Influence of auxins on organogenesis and ginsenoside production in *Panax ginseng* callus / M. Bonfill, R.M. Cusido, J. Palazón, M. Pinol, C. Morales // Plant Cell, Tissue and Organ Cult. – 2002. – Vol. 68. – P. 73–78.
10. Смоленская, И.Н. Противоположное влияние синтетических ауксинов – 2,4-дихлорфеноксиуксусной и 1-нафтилуксусной кислот на рост культуры клеток женьшеня настоящего и синтез гинзенозидов / И.Н. Смоленская, О.В. Решетняк, Ю.Н. Смирнова и др. // Физиология растений. – 2007. – Т. 54. – С. 243-252.
11. Mallol, A. Ginsenoside production in different phenotypes of *Panax ginseng* transformed roots // A. Mallol, R.M. Cusido, J. Palazon, M. Bonfill, C. Morales, M.T. Pino // Phytochemistry. – 2001. – Vol. 57. – P.365-371.
12. Wang, W. Enhancement of ginsenoside biosynthesis in high-density cultivation of *Panax notoginseng* cells by various strategies of methyl jasmonate elicitation // W. Wang, Z.Y. Zhang, J.J. Zhong // Appl.Microbiol.Biotechnol. – 2005. – Vol. 67. – P. 752-758.

13. Булгаков, В.П. Содержание даммарановых гликозидов в различных каллусных линиях *Panax ginseng* С.А. Мей / В.П. Булгаков, Ю.Н. Журавлев, М.М. Козыренко и др. // Растительные ресурсы. – 1991. – Т.27. – С.94-100.

14. Hayashi, H. Molecular Cloning and characterization of isomultiflorenol synthase, a new triterpene synthase from *Luffa cylindrica*, involved in biosynthesis of bryonolic acid / H. Hayashi, P. Huang, K. Inoue et al. // Eur. J. Biochem. – 2001. – Vol. 268. – P. 6311–6317.

15. Flores-Sánchez, I.J. Biosynthesis of sterols and triterpenes in cell suspension cultures of *Uncaria tomentosa* / I.J. Flores-Sánchez, J. Ortega-López, M.C. Montes-Horcasitas, A.C. Ramos-Valdivia // Plant Cell Physiol. – 2002. – Vol. 43. – P. 1502–1509.

Статья поступила в редакцию 08.11.11.

Работа выполнена в рамках межгосударственной целевой программы ЕвразЭС «Инновационные биотехнологии», гос.контракт с Министерством образования и науки РФ № 16.M04.12.0003 от 14 апреля 2011 г. «Развитие национальных коллекций культур клеток растений для развития методов современной селекции и сохранения редких генотипов».

I. N. Smolenskaya, O. V. Reshetnyak, E. S. Sukhanova, S. Yu. Voevudskaya, A. M. Nosov

GINSENOSES SYNTHESIS INCREASE IN PANAX GINSENG SUSPENSION CELL CULTURE WITH THE GROWTH REGULATOR IN ACTION

The synthetic auxins, NAA (α-Naphthaleneacetic acid) and 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) influence on a triterpenoid glycosides composition and its accumulation in Panax ginseng suspension cell culture during a long-term cultivation is studied. Together with ginsenosides concentration increase, their qualitative composition changed: all the 7 main ginsenosides of Rb- and Rg-groups, which are typical for the intact plant, are represented in the cell biomass, growing with the NAA.

Key words: *Panax ginseng, ginsenosides, suspension cell culture, triterpene glycosides.*

СМОЛЕНСКАЯ Ирина Николаевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории физиологии культивируемых клеток (группа Всероссийской коллекции культур клеток высших растений) Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Область научных интересов – биология культивируемых клеток *in vitro*, вторичный метаболизм. Автор 102 публикаций.

E-mail: ismolenskaya@ippras.ru

РЕШЕТНЯК Оксана Владимировна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории физиологии культивируемых клеток Института физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН. Область научных интересов – вторичный метаболизм, биология культивируемых клеток *in vitro*. Автор 52 публикаций.

E-mail: ox_reshetnyak@mail.ru

СУХАНОВА Елена Сергеевна – научный сотрудник кафедры физиологии растений Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. Область научных интересов – биология культивируемых клеток *in vitro*, вторичный метаболизм. Автор 10 публикаций.

E-mail: mushilda@mail.ru

ВОЕВУДСКАЯ Светлана Юрьевна – научный сотрудник лаборатории физиологии культивируемых клеток Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Область научных интересов – биология культивируемых клеток *in vitro*. Автор семи публикаций.

E-mail: mushilda@mail.ru

НОСОВ Александр Михайлович – доктор биологических наук, профессор кафедры физиологии растений Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. Область научных интересов – биология культивируемых клеток *in vitro*, вторичный метаболизм, биотехнология. Автор 270 научных и учебно-методических работ, в том числе пяти монографий и двух учебных пособий.

E-mail: al_nosov@mail.ru