

ЛЕШИНА Л.Г. ✉, БУЛКО О.В., ЛИТВИНОВ С.В., ПЧЕЛОВСКАЯ С.А., СОКОЛОВА Д.А.,
БЕРЕСТЯНАЯ А.Н., ТОНКАЛЬ Л.В., САЛИВОН А.Г.

Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины,

Украина, 03143, г. Киев, ул. Академика Заболотного, 148, e-mail: llioshina@ukr.net

✉ llioshina@ukr.net, (050) 581-32-95, (068) 800-21-69

ВЛИЯНИЕ РЕДКОИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА БИОХИМИЧЕСКИЙ СТАТУС РЕГЕНЕРАНТОВ *DIGITALIS PURPUREA* L. В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Наперстянка пурпурная (*Digitalis purpurea* L.) – ценное лекарственное растение семейства Подорожниковые (Plantaginaceae), источник гликозидов, применяющихся для лечения сердечно-сосудистых заболеваний. Важной задачей является введение наперстянки в культуру *in vitro* с целью разработки перспективного способа биотехнологического получения лекарственных веществ. Реализация данной задачи предполагает разработку методики культивирования растений и культур клеток, которая позволила бы добиться эффективного прироста биомассы и высокой удельной концентрации в ней фармацевтически ценных гликозидов. Ранее было показано, что набором требуемых качеств обладают растения, полученные путем регенерации из корней «hairy roots», полученных в результате трансформации растительных эксплантов бактерией *Agrobacterium rhizogenes* [1, 2]. Такие трансформанты характеризуются увеличением синтеза ряда вторичных метаболитов вследствие интеграции в растительный геном и активации экспрессии генов *rol* плазмидной Т-ДНК агробактерии [2]. Однако в случае с *D. purpurea* требуется стимулировать синтез конкретного класса метаболитов – кардиогликозидов, содержание которых в листьях коррелирует с концентрацией флавоноидов, а также с фотосинтетической активностью [3]. Последняя зависит от состояния фотосистем I и II типов, общего содержания и соотношения хлорофиллов *a* и *b*. В то же время известно, что экспрессия гена *rolC* в клетках трансформированных растений снижает концентрацию хлорофилла прежде всего за счет необходимости для эффективного фотосинтеза *a* формы [2]. Мы предложили решить данную проблему с помощью облучения растений-регенерантов наперстянки редкоионизирующим излучением, которое в интервале стимулирующих доз увеличивает содержание хлорофилла [4, 5]. Кроме

того, облученные растения испытывают физиологический стресс, который активирует антиоксидантную систему, что в свою очередь должно вызвать усиление синтеза защитных флавоновых соединений и параллельную стимуляцию синтеза гликозидов за счет активации биохимических путей анаболизма флавоноидов. С целью проверки предложенной гипотезы была проведена серия опытов с облучением интактных растений и *Ri*-трансформированных регенерантов наперстянки пурпурной с последующим сравнением физиологических и биохимических показателей в двух вариантах опыта.

Материалы и методы

Агробактериальную трансформацию листовых эксплантов, получение культуры генетически трансформированных корней «hairy roots», регенерацию растений *D. purpurea* и последующее культивирование *in vitro* осуществляли по методике, описанной в работе [6]. Для трансформации использовали штамм *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834. 4-недельные интактные растения и *Ri*-трансформированные регенеранты облучали на рентгеновской установке РУМ-17 (Национальный институт рака, Киев, Украина) в дозах 1, 2, 3, 5, 10, 20 Гр и мощности дозы 1,27 сГр/с (по 5 растений обоих вариантов на каждую дозу облучения, включая два необлученных контроля). Границы интервала стимулирующих доз, использованных в наших опытах, определяли на основе данных по всхожести облученных семян и накоплению биомассы надземной частью *D. purpurea* [7]. Через неделю после облучения измеряли оводненность, митотический индекс в апикальной меристеме корня согласно стандартным методикам [8], содержание хлорофиллов *a* и *b*, суммы каротиноидов и флавоноидов в листьях в мг на 1 г сухой массы. Затем эксплантаты пересаживали на све-

жую среду МС и культивировали в течение месяца до следующего измерения показателей. Таким образом были получены и проанализированы данные для трех последовательных пассажей интактных растений и растений-регенерантов. Пигменты и флавоноиды экстрагировали 70 % этиловым спиртом. Концентрацию хлорофиллов определяли на спектрофлюориметре Флюорат-02-Панорама (Россия) в фотометрическом режиме при длинах волн 649 нм и 665 нм, а каротиноидов – при 470 нм. Суммарное содержание флавоноидов детектировали спектрофотометрическим методом с использованием комплексообразующей реакции с хлоридом алюминия при длине волны 415 нм [9]. В качестве эталона сравнения использовали комплекс рутина с хлоридом алюминия. Обработка и анализ результатов проведены в приложении Excel стандартного пакета Microsoft Office XP («Microsoft», США). На рисунках представлены усредненные для каждого варианта значения показателей и стандартные отклонения. Для сравнения выборочных средних величин использован непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Количественную меру взаимосвязи между радиационно-индуцированной вариацией различных биохимических показателей оценивали по значению коэффициента ранговой корреляции ρ Спирмена.

Результаты и обсуждение

Острое облучение в интервале тестируемых доз (кроме дозы 5 Гр) через неделю после экспозиции увеличивает оводненность как интактных растений, так и растений-регенерантов. Необлученные растения обоих вариантов имеют один и тот же показатель оводненности – 77–80 %. Во втором и третьем пассаже оводненность растений всех групп и вариантов была одинаковой – 90–95 %, за исключением регенерантов, облученных в дозе 5 Гр, оводненность которых снизилась с 86 % до 78 %. Важно отметить, что при всех других дозах облучения наблюдалась положительная динамика оводненности через месяц и два месяца после облучения. Таким образом, только доза 5 Гр имела долговременный ингибирующий эффект, причем только в отношении трансформированных растений. Стимулирующее влияние острого рентгеновского облучения растений, культивируемых *in vitro*, оказалось преходящим. В качестве другого критерия физиологического состояния растений был выбран митотический индекс, определяемый в апикальной меристеме корня (из анализа исключили

корни растений, облученных дозами 10 и 20 Гр, вызывающими радиационную задержку митозов). Дозы 1–5 Гр в нашем исследовании стимулировали деление клеток интактных растений в первом пассаже, но через два месяца после облучения показатели возвращались к норме. Повышенное, по сравнению с контролем, значение митотического индекса сохранялось только в меристеме нетрансформированных растений через 5 недель после облучения рентгеновскими лучами в дозе 1 Гр (пассаж II). На митотическую активность корней регенерированных растений облучение в дозах до 5 Гр оказало противоположное влияние – митотический индекс снизился по сравнению с таковым в необлученном варианте. Аналитическая ценность митотического индекса как показателя для сравнения устойчивости интактных растений и Ri-трансформантов к действию ионизирующей радиации ограничена тем, что его величина различна и в необлученных контролях. Митотическая активность меристем трансформированных растений выше, и за счет этого они менее радиоустойчивы по данному показателю. Кроме того, скорость деления клеток в конусе нарастания корня может отражать различные по направленности процессы и не обязательно характеризует состояние растения как целостного организма. Что касается оводненности, то это достаточно надежный индикатор текущего функционального состояния растения, но он, во-первых, слишком вариабельный для работы с небольшими выборками, а во-вторых, не отражает долгосрочных изменений метаболизма. Поэтому для оценки эффекта облучения было решено использовать интегральные характеристики пигментной системы: суммарное содержание хлорофиллов a и b ($Ca+Cb$) в листьях в пересчете на 1 г сухой массы, отношение Ca/Cb и $(Ca+Cb)/Ck$, где Ck – содержание каротиноидов в листьях, мг/г. Относительную радиочувствительность оценивали, выразив абсолютное значение соотношений пигментов в % от необлученного контроля. При этом физиологическое состояние растения наиболее тесно коррелирует с индексом Ca/Cb и особенно с $(Ca+Cb)/Ck$ [10]. Графики дозовых зависимостей для этих показателей приведены на рисунке 1. Чем ниже значения Ca/Cb наряду с $(Ca+Cb)/Ck$, то есть чем ниже активность фотосинтетической системы I и чем больше синтезируется каротиноидов сверх количества, необходимого для защиты фотосинтетического аппарата, тем сильнее выражен физиологический стресс. Анализ приведенных на рис. 1

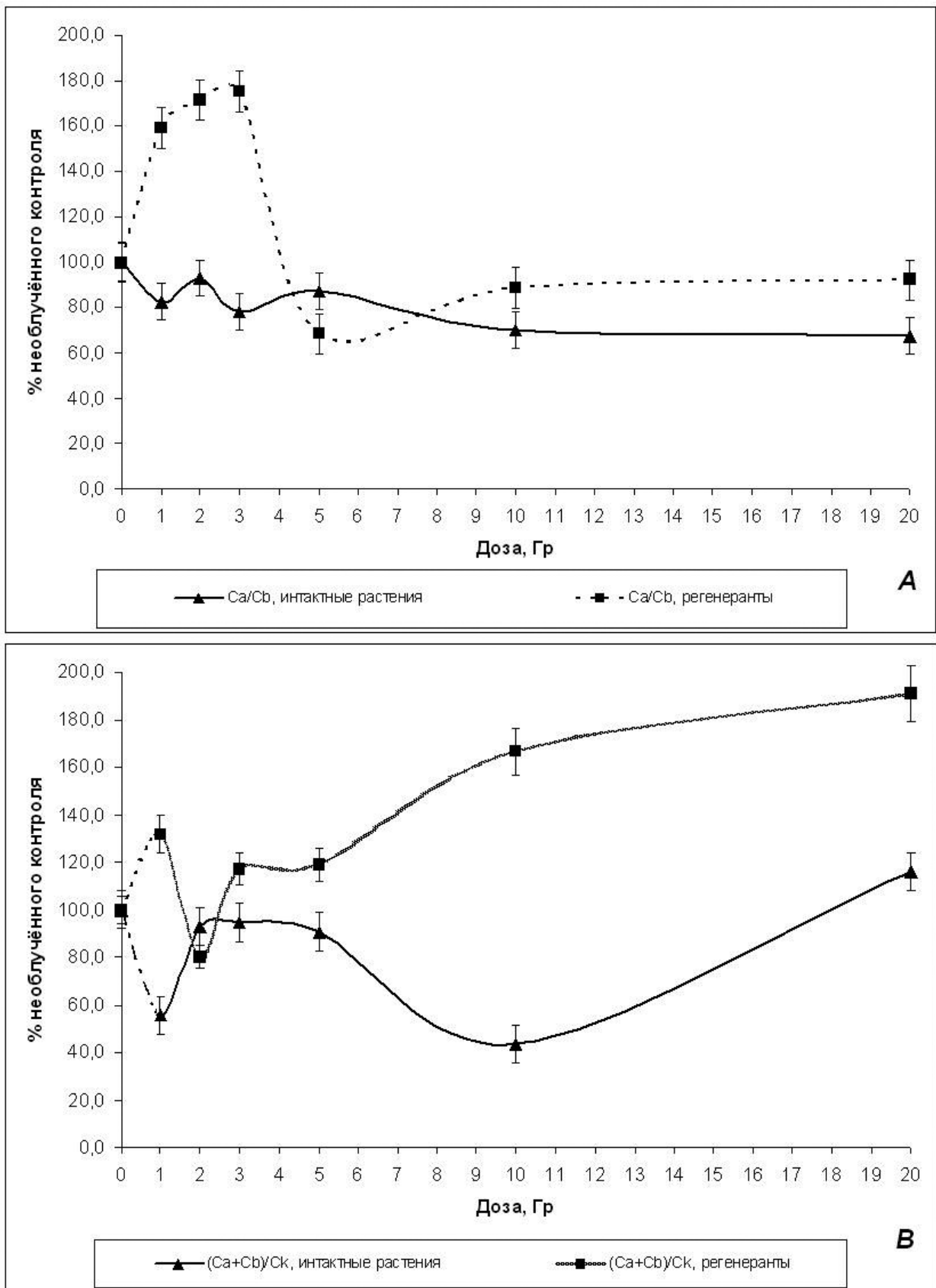


Рис. 1. Соотношение хлорофилла *a* к хлорофиллу *b* (A), суммы хлорофиллов *a+b* к каротиноидам (B) в% от необлучённого контроля в листьях *D. purpurea* через неделю после облучения

дозовых зависимостей показывает, что Ri-трансформанты значительно более устойчивы к действию ионизирующего облучения по сравнению с нетрансформированными растениями. При этом наблюдаемый эффект ослабляется к 5-й неделе после облучения (пассаж II) и вовсе исчезает к 9-й неделе (пассаж III). При облучении дозами 10 и 20 Гр как интактные растения, так и растения-регенеранты на протяжении двух месяцев после экспозиции сохраняют стрессовый физиологический статус. Это говорит о том, что при указанных дозах способность к послерадиационному восстановлению *D. purpurea in vitro* снижается. Также при облучении в дозе 1 Гр наблюдается стимуляция фотосистемы I у регенерированных трансформантов в отдаленный период после облучения (сверхвосстановление). Модификация нормального (сопоставимого с контро-

лем) состояния пигментной системы в результате воздействия ионизирующей радиации четко прослеживается по дозовым зависимостям, отраженным на рисунке 2. Ингибирующий эффект достигается при дозах в 10 и 20 Гр. В области малых доз (1–3 Гр) отмечается активная стимуляция синтеза хлорофиллов и каротиноидов, причем стимулирующие дозы для регенерантов при облучении 2 Гр выше, вероятно, в связи с их большей радиоустойчивостью. Увеличение в несколько раз содержания хлорофиллов обеих форм в листьях трансформированных растений при дозе 3 Гр свидетельствует не только об ингибировании процессов конститутивной дегградации хлорофилла, но и об активации его биосинтеза. Возможно, это связано с резким повышением содержания каротиноидов и снижением массовой доли флавоноидов. Расчет показыва-

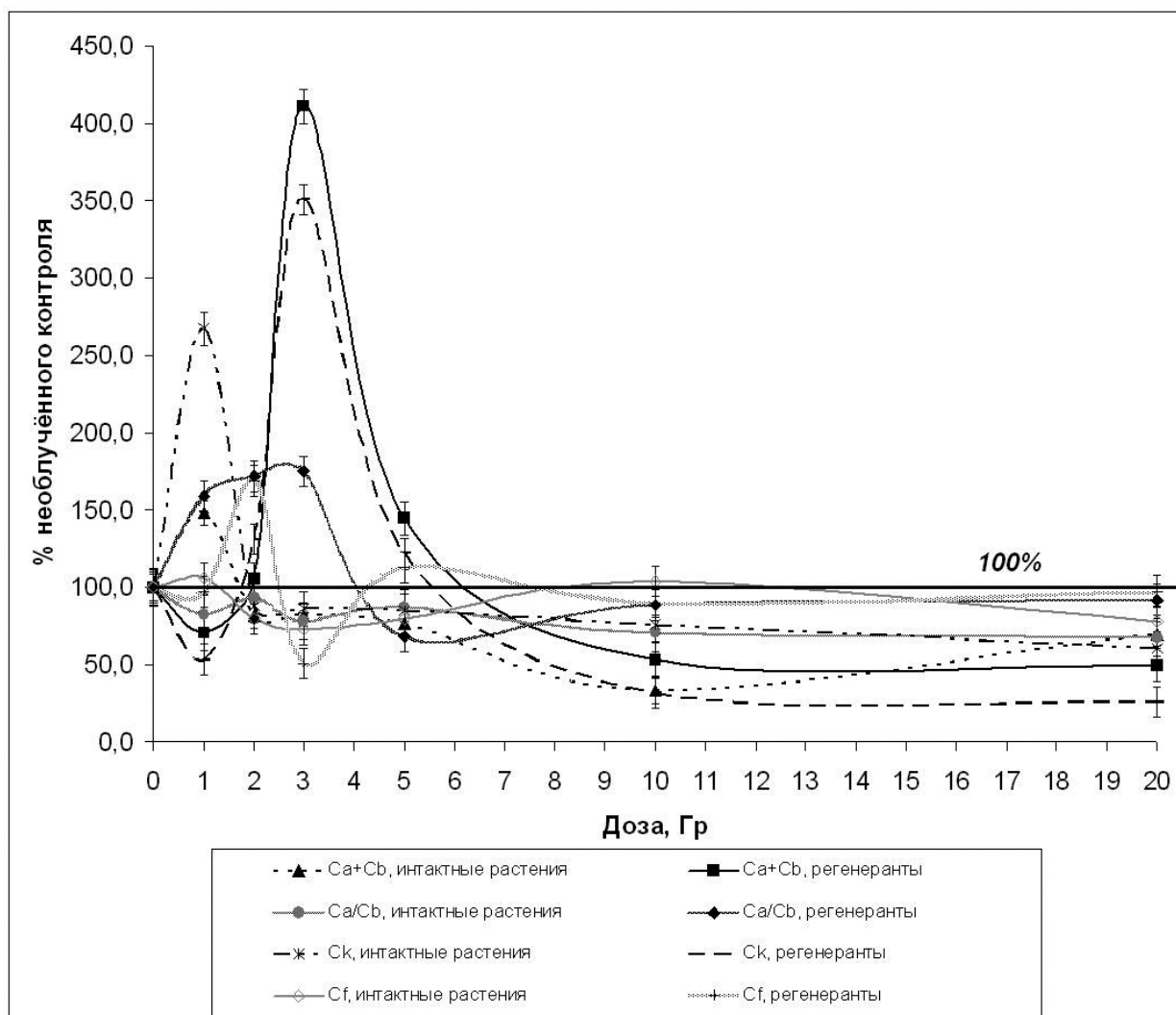


Рис. 2. Динамика содержания хлорофиллов Ca+Cb, их соотношения Ca/Cb, каротиноидов Ck и флавоноидов Cf в листьях *D. purpurea* через неделю после облучения

ет, что между содержанием в листьях каротиноидов и индексом Sa/Cb существует позитивная зависимость на уровне тенденции ($\rho = 0,71$ для интактных растений и $\rho = 0,57$ для Ri-трансформантов; $p < 0,05$), что подтверждает защитную роль каротиноидов в отношении фотосистемы I. Интересно, что необлученные растения-регенеранты в первом пассаже содержат больше хлорофиллов, чем интактные растения, за счет более высокого содержания хлорофилла b. Также в их листьях содержится в 2 раза больше каротиноидов на единицу массы и примерно на 10 % меньше флавоноидов, чем в листьях нетрансформированных растений *D. purpurea*. Однако по окончании культивирования различия между вариантами по всем трем классам метаболитов «меняют знак», что мы объясняем экспрессией *pRi*-генов Т-ДНК агробактерии перенесенных в ядерный геном растений в результате трансформации [2]. Как видно из графика на рис. 2, радиостимуляция синтеза флавоноидов имеет место только при облучении регенерантов *D. purpurea* и только при стрессогенных дозах 2 Гр и 5 Гр (рис. 1, В). Также отметим, что между содержанием флавоноидов в листьях Ri-трансформированных растений через неделю после облучения и стрессовым индексом $(Sa+Cb)/Ck$ существует обратная зависимость ($\rho = -0,64$; $p < 0,05$). Отсюда можно заключить, что в Ri-трансформированных растениях активируется синтез флавоноидов в ответ на физиологический стресс, вызванный ионизирующим облучением. Значимая

корреляция между этими двумя показателями в случае интактных *D. purpurea* отсутствует.

Исходя из этого факта и различий между вариантами по содержанию флавоноидов и каротиноидов в листьях облученных растений, можно предположить, что интактные и трансформированные растения *D. purpurea*, выращенные в условиях *in vitro*, используют различные стратегии адаптации к оксидативному стрессу. Первые активируют систему пассивной антиоксидантной защиты, связанную с каротиноидами, вторые с флавоноидами, что может быть обусловлено агробактериальной трансформацией.

Выводы

В результате проведенных опытов было показано различное по силе и направленности влияние редкоизионизирующего излучения на пигментную систему и синтез флавоноидов в листьях интактных и Ri-трансформированных растений наперстянки пурпурной *in vitro*. Достигнутый радиобиологический эффект был транзитивным и нелинейно зависел от дозы в интервале 1–20 Гр. Пигментная система листьев трансформированных регенерантов показала большую устойчивость к радиационному фактору по сравнению с интактными растениями. Продемонстрирована принципиальная возможность использования редкоизионизирующей радиации с целью стимуляции синтеза биологически активных веществ – хлорофиллов, каротиноидов, флавоноидов в тканях Ri-трансформированных растений-регенерантов *D. purpurea* в условиях *in vitro*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лешина Л.Г., Булко О.В. Культивирование *in vitro*, ростовые параметры и оценка способности к биосинтезу гликозидов культуры клеток *Digitalis purpurea* L. // Физиология и биохимия культурных растений. – 2011. – 43, № 2. – С. 164–170.
2. Bulgakov V.P., Shkryl Y.N., Veremeichik G.N., Gorpenchenko T.Y., Inyushkina Y.V. Application of *Agrobacterium* Rol genes in plant biotechnology: a natural phenomenon of secondary metabolism regulation [Electronic resource] // «Genetic Transformation», book edited by María Alvarez. – 2011. – Mode of access: <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/18823.pdf>.
3. Степаненко О.Г. Последствие радиации в прорастающих семенах и вегетирующих лекарственных растениях: автореф. дис. на соискан. учен. степени док. биол. наук: спец. 06.01.03 «Агрочововедение, агрофизика». – Санкт-Петербург, 2002. – 348 с.
4. Al-Enezi N.A., Al-Khayri J.M. Alterations of DNA, ions and photosynthetic pigments content in date palm seedlings induced by X-irradiation // International Journal of Agriculture & Biology. – 2012. – 14, № 3. – P. 329–336.
5. Шамаль Н.В., Гапоненко В.И. Влияние засоления почвы на состояние растений ячменя, выросших из гамма-облученных семян // Материалы III Международной научной конференции «Ксенобиотика и живые системы», 22–24 октября 2008 г. – Минск: Изд. центр БГУ, 2008. – С. 155–157.
6. Liozhina L.G., Bulko O.V. Plant regeneration from hairy roots and calluses of periwinkle *Vinca minor* L. and foxglove purple *Digitalis purpurea* L. // Cytology and Genetics. – 2014. – 48, № 5. – P. 302–307.
7. Grodzinsky D., Shylyna Y., Pchelovska S., Litvinov S., Sokolova D., Zhuk V., Tonkal L., Salivon A., Nesterenko O. Effect of acute X-Ray irradiation of medicinal plants seeds to the secondary metabolites productivity [Electronic resource] // Book of Abstracts RAD 2016. – 2015. – Mode of access: http://www.rad-conference.org/user_book_abstracts.php.
8. Соколова Д.А., Венгжен Г.С., Кравец А.П. Роль эпигенетического полиморфизма проростков кукурузы в реакциях на УФ-С облучение // Физиология растений и генетика. – 2014. – 46, № 3. – С. 221–229.

9. Лобанова А.А., Будаева В.В., Сакович Г.В. Исследование биологически активных флавоноидов в экстрактах из растительного сырья // Химия растительного сырья. – 2004. – № 1. – С. 47–52.
10. Кынчева Р., Илиев И., Борисова Д., Георгиев Г. Раннее обнаружение физиологического стресса растительности по многоспектральным данным // Современные проблемы дистанционного зондирования Земли из космоса. – 2011. – 8, № 4. – С. 319–326.

LIOSHINA L.G., BULKO O.V., LITVINOV S.V., PCHELOVSKA S.A., SOKOLOVA D.A., BERESTYANA A.N., TONKAL L.V., SALIVON A.G.

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 03143, Kiev, Akad. Zabolotnogo str., 148, e-mail: llioshina@ukr.net

EFFECT OF IONIZING RADIATION ON BIOCHEMICAL STATUS OF *DIGITALIS PURPUREA* L. REGENERANTS *IN VITRO*

Aim. *Digitalis purpurea* L. is the source of a number of biologically active substances used for medical purposes. *Agrobacterium rhizogenes*-transformed plants show changes in secondary metabolism. Influence of acute exposure to ionizing radiation on modification of the pigment system and accumulation of flavonoids in regenerants *in vitro* was studied. **Methods.** Spectrophotometric measurement of chlorophyll, carotenoid and flavonoid content in extracts from plants, have been irradiated at dose interval 1-20 Gy X-rays, combined with calculation of water-content index in shoots and mitotic index of root apical meristem, were performed. **Results.** Nonlinear dose dependence of acute X-rays irradiation influence on *in vitro D. purpurea* has been shown. Transformed plants were found to be more resistant to the damaging effects of radiation. **Conclusions.** Exposure to ionizing radiation in a certain dose interval can be used to stimulate the accumulation of biologically active substances of *in vitro D. purpurea*.

Keywords: *Digitalis purpurea* L., Ri-transformants, ionizing radiation, pigment, flavonoid.