

УДК 58.085

ВЛИЯНИЕ МЕТИЛЖАСМОНАТА НА БИОСИНТЕЗ ЭКДИСТЕРОИДОВ В КУЛЬТУРЕ *HAIRY ROOTS SILENE LINICOLA* С.С. GMELIN

© А.А. Эрст^{1*}, Л.Н. Зибарева², Е.С. Филоненко², Т.В. Железниченко¹

¹Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, ул. Золотодолинская, 101, Новосибирск, 630090 (Россия), e-mail: annaerst@yandex.ru

²Национальный исследовательский Томский государственный университет, пр. Ленина, 36, Томск, 634050 (Россия)

Культура *hairy roots* привлекает все большее внимание исследователей как система получения ценных вторичных метаболитов, так как имеет ряд существенных преимуществ – генетическая стабильность (по сравнению с культурой клеток) и относительно быстрый рост (по сравнению с корнями интактных растений). Методом *Agrobacterium* – опосредованной трансформации – нами получена культура *hairy roots* экдистероидсодержащего вида *Silene linicola*. ВЭЖХ-анализ исследуемых образцов показал, что в заданных условиях эксперимента синтезируются 20-гидроксизидон (20Е), туркестерон и полипидин В. Установлено стимулирующее влияние метилжасмоната в концентрации 100 мкМ на биосинтез 20Е на 3-й день эксперимента на 74%, туркестерона – на 6-й день на 35%. Отмечено, что в суммарном содержании экдистероидов исследуемых образцов туркестерон составляет от 25 до 60%, а содержание 20Е варьирует от 8 до 30%. Показано, что в контроле происходит снижение уровня биосинтеза 20Е с 0.023 до 0.014%. Линии *hairy roots S. linicola* с различной реакцией на присутствие элиситоров в культуральной среде могут быть использованы для изучения путей биосинтеза экдистероидов.

Ключевые слова: фитоэкдистероиды, ВЭЖХ, метилжасмонат, *hairy roots*, *Silene linicola*.

Работа выполнена в рамках государственного задания Центрального сибирского ботанического сада СО РАН № 0312-2016-0001 по проекту «Оценка морфогенетического потенциала популяций растений Северной Азии экспериментальными методами»; а также в рамках гранта РФФИ р_а проект № 16-44-7000634 «Исследование лекарственных растений Томской области, адаптивных возможностей интродуцентов с целью создания сырьевой базы видов, перспективных для лечения социально-значимых заболеваний».

Введение

Экдистероиды – группа вторичных метаболитов, широко распространенных как в животном, так и растительном царствах. В настоящее время фитоэкдистероиды обнаружены во многих растениях, и в довольно высоких концентрациях. Выделены и установлены структуры более 400 экдистероидов, в том числе и из растений семейства *Caryophyllaceae* Juss [1]. Одним из наиболее богатых по количеству экдистероидсодержащих видов является род *Silene* L. [2, 3]. Состав и содержание экдистероидов представителей этого рода является видоспецифичными и в значительной степени зависят от места произрастания, стадии развития и условий выращивания [4, 5]. По этой причине использование культуры клеток и органов является важным альтернативным источником получения суммы и отдельных экдистероидов представителей рода *Silene*, позволяющим избежать проблем, связанных с непостоянным уровнем биосинтеза вторичных метаболитов, а также представляет собой модельную систему для изучения путей их биосинтеза.

Известно, что, используя технологию *in vitro*, можно регулировать накопление биологически активных веществ (БАВ) в культуре, оптимизируя

Эрст Анна Алексеевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, e-mail: annaerst@yandex.ru
Зибарева Лариса Николаевна – доктор химических наук, заведующая лабораторией, e-mail: zibareva.lara@yandex.ru
Филоненко Елена Сергеевна – техник I категории, e-mail: filonenkoelenaserg@mail.ru
Железниченко Татьяна Витальевна – кандидат биологических наук, научный сотрудник, e-mail: zhelez05@mail.ru

* Автор, с которым следует вести переписку.

питательную среду путем добавления в нее регуляторов роста, элиситоров и предшественников синтеза и подбирая условия культивирования [6–8]. Например, показано положительное влияние метилжамоната (МеЖ), широко применяемого элиситора при культивировании клеток, тканей и органов растений *in vitro* [9–12], на содержание экдистероидов, в частности 20E, в растениях *in vitro* и *ex vitro*. Жасмонаты (жасмоновая кислота и ее производные, в том числе МеЖ) являются продуктами липоксигеназного окисления α-линоленовой кислоты, высвобождаемой из мембран пластид при действии липаз в качестве сигнальных молекул растений в ответ на поранение и атаку насекомых и патогенов [13]. Жасмонаты участвуют в регуляции многих процессов у растений: вегетативном развитии, контроле фертильности, созревании, старении и регуляции клеточного цикла, вовлечены в развитие устойчивости растений к широкому кругу биотических стрессоров. Наиболее сильное влияние МеЖ оказывает на регуляцию вторичного метаболизма, стимулируя накопление алкалоидов, терпеноидов, фенолов, кумаринов, таксанов, глюкозинолатов и др. [14] и рассматривается как один из перспективных элиситоров в культуре клеток и органов растений. Так, добавлением МеЖ более чем в 2–3 раза увеличено содержание 20E в суспензионных культурах и *hairy roots* культурах *A. turkestanica* [15]. Эффективность использования МеЖ на накопление фитоэкдистероидов отмечено и при его воздействии на интактные растения *Spinacia oleracea* L. [16]. Возможно, изменение уровня биосинтеза и состава экдистероидов объясняется как вовлечением данных компонентов в различные биохимические процессы, так и ответом на изменяющиеся культуральные условия. Например, для интактных растений *Serratula quinquefolia* M. Bieb. ex Willd. показано, что переключение биосинтеза вторичных метаболитов с 20E на его структурный изомер инокостерон в листовых пластинках происходит при смене условий выращивания и указывает на связь между биосинтезом экдистероидов и адаптивной реакцией растений в ответ на повреждающее действие света [17]. Кроме того, клеточные, суспензионные культуры и культуры *hairy roots* имеют определенные фазы развития (латентная, экспоненциальная, линейная, фаза замедленного роста и стационарная фазы), и уровень биосинтеза веществ зависит от конкретной фазы. Для культуры клеток *Serratula coronata* L. показано, что наиболее выраженное увеличение суммарного содержания экдистероидов происходит в фазу экспоненциального роста каллуса, достигая максимума в стационарной фазе 0.007% [18]. В работах по культивированию *in vitro* *A. turkestanica* показано, что состав экдистероидов зависит также от применяемой биотехнологической системы. Например, в суспензионной культуре данного вида синтезируется только 20E, в то время как в культуре *hairy roots* обнаружены 20E, туркестерон, циастерон, циастерон 22-ацетат [15].

Данные результаты свидетельствуют о возможности использования МеЖ как для устойчивого производства метаболически активных фитоэкдистероидов через *hairy roots* системы, так и усиления их биосинтеза. Ранее нами показано, что культура *hairy roots* *S. linicola* является перспективной системой для изучения путей биосинтеза фитоэкдистероидов и механизмов его направленного регулирования [19]. А введение элиситора – ацетата натрия в питательную среду способствовало синтезу экдистероидов в образцах *hairy roots* *S. linicola*. Кроме того, в присутствии элиситора происходил биосинтез более разнообразного спектра экдистероидов по сравнению с контролем.

Цель данной работы – оценить влияние МеЖ на биосинтез экдистероидов в культуре *hairy roots* *Silene linicola*.

Экспериментальная часть

Объектом нашего исследования является смолевка льняная – *Silene linicola* C.C.Gmelin (*Caryophyllaceae* Juss). Семена для культивирования получены от растений, интродуцированных в Сибирский ботанический сад Томского государственного университета (СБС ТГУ, Томск, Россия) в период 1994–2015 гг.

Получение культуры *hairy roots*. Для получения асептической культуры семена стерилизовали в 20% растворе «Domestos» (Россия) с последующим трехкратным промыванием стерильной дистиллированной водой и помещали на 0.6% водный раствор агара для проращивания. Условия культивирования семян – фотопериод 16/8 свет/темнота, 24±2 °С.

Штамм *Agrobacterium rhizogenes* Conn. A-4 культивировали в чашках Петри на среде YEB (дрожжевой экстракт 1 г, мясной бульон+пептон 5 г, сахароза 6.6 г, MgSO₄×7H₂O 3 г, агар 7 г, pH=7). Условия культивирования – темнота, первые 2-е суток в термостате при +26 °С, далее на протяжении 28 дней при +7 °С. Данный штамм был получен из Института физиологии растений РАН (г. Москва) в 2014 г.

Трансформацию проводили по следующей схеме: семядольные листья накалывали иголкой инсулинового шприца и инокулировали в течение 24 ч в жидкой питательной среде MS [20], содержащей суспензию агробактерий *A. rhizogenes* суточного возраста. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре «Biospectrometer kinetic», D600 = 0.2 (Германия). После экспозиции инокуляты промывали стерильной средой ½ MS и помещали для проявления трансформации на агаризованную среду ½ MS с добавлением антибиотика – 500 мг/л цефтриаксона (Россия). Через 3 недели, после появления розетки корней их отделяли и пересаживали на ту же питательную среду с цефтриаксоном (500 мг/л) для элиминирования бактерий. Повторную пересадку кончиков корней проводили на среду с 250 мг/л цефтриаксона.

Hairy roots культивировали на жидкой питательной среде В₅ [21] с добавлением 500 мг/л гидролизата казеина с интервалом 30–42 дня. Для пересадки брали 1 г сырой биомассы корней и помещали в конические колбы на 250 мл в 100 мл среды, pH доводили до 5.8 до автоклавирования. Условия культивирования: темнота, 24±2 °С, 90 об/мин (шейкер орбитальный, «Elmi, S-3-02L») (Латвия).

Элиситацию накопления экдистероидов проводили, добавляя в питательные среды МеЖ на 9-м пассаже в конце периода субкультивирования (30-й день) в концентрации 100 или 200 мкМ (для этого 22.43 или 44.86 мг МеЖ растворяли в 4 мл 70% этанола соответственно) вместе с 30 мл питательной среды В₅ (концентрация этанола в среде 0.28%). Для оценки влияния МеЖ на ростовые характеристики культуры и биосинтез экдистероидов часть образцов культивировали только с добавлением растворителя этанола (в концентрации аналогичной опыту с МеЖ) и 30 мл среды В₅. Анализ образцов проводили через 3, 6 и 12 дней, после внесения компонентов в питательные среды (на 33-й, 36-й и 42-й день культивирования соответственно). Также в работе использовали два контроля. Контролем 1 (к1) служили образцы *hairy roots* в начале эксперимента (30-й день культивирования), контролем 2 (к2) являлись образцы в конце эксперимента (42-й день культивирования), без добавления МеЖ, этанола и питательной среды.

Для определения сырой и сухой биомассы *hairy roots* промывали проточной водой от питательной среды, просушивали фильтровальной бумагой и взвешивали до и после высушивания при температуре 100 °С до постоянной массы.

Эксперименты проводили в двух повторностях. Статистическую обработку результатов и анализ полученных данных проводили с использованием программы STATISTICA 6.0 (LSD-test, $p \leq 0.05$) и программы Microsoft Excel 7.0. Данные представлены в виде средних значений и доверительных интервалов ($p \leq 0.05$).

Методы исследования биологически активных веществ растений. Экстракты из 1–2 г культур *hairy roots* получены методом трехкратной экстракции 70% раствором этанола с последующим концентрированием до 2 мл с помощью ротационного испарителя «КА НВ 10 digital» (Германия).

Анализ содержания фитоэкдистероидов осуществляли в лаборатории фитохимии СБС ТГУ (г. Томск) с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). ВЭЖХ/УФ-анализ выполнен на жидкостном хроматографе «Shimadzu LC-20 AD» (Япония) с диодноматричным детектором. Хроматографическая колонка Perfect Sil Target ODS-3; 4.6 × 250 мм, размер зерна сорбента – 5 мкм, элюирование смесью ацетонитрила и изопропилового спирта (5 : 2) и 0.1% трифторуксусной кислоты в градиенте от 15 до 35% в течение 40 мин. Скорость элюирования – 1 мл/мин. Объем инъекции – 5 мкл. Аналитическая длина волны $\lambda_{\max} = 254$ нм для регистрации фитоэкдистероидов, время анализа – 60 мин. Хроматографический анализ проведен при 3–5-кратной повторности. Расчет содержания экдистероидов осуществляли по уравнению кривой на основе площади пика 20Е в анализируемом образце экстракта. Для построения градуировочного графика использовали смесь стандартных образцов четырех компонентов, включая и 20Е. Смеси готовили путем разбавления 96% этиловым спиртом. Концентрации 20Е в подготовленных смесях составили: 1; 0.325; 0.1625; 0.0813 мг/мл. На основе полученных хроматограмм с помощью программы LC solution Postrun был построен градуировочный график зависимости площади пика от концентрации и получено уравнение расчета содержания экдистероидов.

Обсуждение результатов

Параметры роста культуры hairy roots. Оценку параметров роста культуры *Hairy Roots S. linicola* проводили на 3, 6 и 12-й день после внесения компонентов (элиситор + растворитель + питательная среда или растворитель + питательная среда) к образцам. При введении в питательную среду МеЖ в концентрации 100 мкМ на 6-й и 12-й дни отмечено незначительное (на 14–18%) увеличение сырой биомассы по сравнению с контролем к1 (рис. 1а). Однако анализ данных прироста в расчете на сухую массу не показал

достоверного увеличения данного параметра (рис. 1б). Это указывает на то, что МеЖ в невысоких концентрациях (100 мкМ) способствует оводнению растительной ткани в процессе культивирования. Добавление как одного растворителя (этанол), так и МеЖ в концентрации 200 мкМ к исследуемым образцам ингибировало рост биомассы корней в обоих случаях по сравнению с контролем к2. В контрольных образцах к2 накопление биомассы было максимальным и превышало биомассу к1 на 26% (рис. 1 б).

В работах В. Furden с соавторами на суспензионной культуре *Linum album* Kotschy ex Boiss. отмечено, что добавление как элиситора (МеЖ), так и отдельно растворителя (этанол) не оказывало влияния на параметры роста данной культуры на протяжении эксперимента по сравнению с контролем [22]. Тогда как для культуры адвентивных корней *in vitro Eleutherococcus koreanum* Nakai показано, что внесение 50 мкМ МеЖ за 7 дней до конца периода субкультивирования негативно сказывалось на росте биомассы, но при этом способствовало накоплению целевых вторичных метаболитов [23].

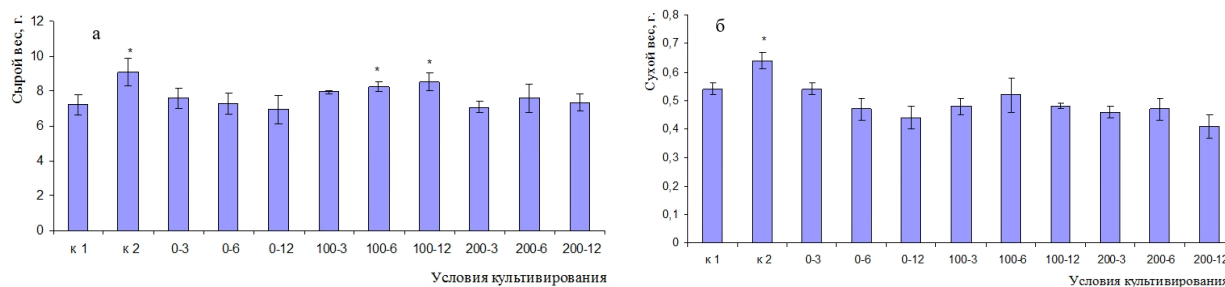


Рис. 1. Влияние МеЖ и времени культивирования на параметры роста культуры *hairy roots Silene linicola*: а – сырая биомасса, б – сухая биомасса. Примечание: к1 – контроль начало эксперимента; к2 – контроль конец эксперимента (12-й день); 0-3 – этанол, 3-й день; 0-6 – этанол, 6-й день; 0-12 – этанол, 12-й день; 100-3 – 100 мкМ МеЖ, 3-й день; 100-6 – 100 мкМ МеЖ, 6-й день; 100-12 – 100 мкМ МеЖ, 12-й день; 200-3 – 200 мкМ МеЖ, 3-й день; 200-6 – 200 мкМ МеЖ, 6-й день; 200-12 – 200 мкМ МеЖ, 12-й день.

* – достоверное увеличение биомассы при $p \leq 0.05$ (LSD-test).

Идентификация экистероидов в этанольных экстрактах культур *hairy roots* методом ВЭЖХ

Путем сопоставления времен удерживания стандартов и пиков соединений с максимумами поглощения, свойственными экистероидам – λ 240–250 нм, в этанольных экстрактах культур *hairy roots* идентифицированы туркестерон, 20Е, полиподин В. 20Е обнаружен во всех образцах, туркестерон – практически во всех, за исключением образца 200-12, тогда как полиподин В выявлен только в контрольном образце к2 на 42-ой день культивирования. ВЭЖХ анализ исследованных образцов *hairy roots S. linicola* показал, что в заданных условиях эксперимента синтезируется ряд экистероидов, в том числе неполярные в интервале времен удерживания 23.7–51.0 мин. Следует отметить, что при использовании ацетата натрия зафиксирован другой состав экистероидов *hairy roots S. linicola* [19], в частности, не обнаружен ценный и редкий экистероид – туркестерон, однако выявлены экизон и распространенные в видах гвоздичных – 2-дезоксидеокси-20-гидроксиэкизон и 2-дезоксидеоксиэкизон.

Количественное определение экистероидов в экстрактах культур *hairy roots Silene linicola*

Результаты количественного содержания экистероидов образцов в пересчете на абсолютно сухое сырье приведены в таблице.

Как следует из данных таблицы и рисунка 2а, содержание 20Е в контроле уменьшилось с 0.023 до 0.014%. В образцах без элиситора, но с добавлением этанола наблюдается также уменьшение содержания 20Е (рис. 2а). Однако при этом происходит активный синтез туркестерона (Т), достигая максимума на 6-й день (рис. 2в, г). Следует отметить, что содержание туркестерона превышает таковое 20Е в соответствующие дни эксперимента в 1.7–3 раза. По всей вероятности, происходит гидроксильное 20Е в 11С-положение, в результате чего синтезируется туркестерон или в 5С – полиподин В и другие положения стероидного ядра, при этом наблюдается уменьшение содержания исходного компонента (20Е), но повышение уровня других.

Следует отметить, что при внесении МеЖ в концентрации 100 мкМ, увеличение содержания 20Е (рис. 2б) по сравнению с контролем и образцами, которые культивировали с этанолом наблюдается на 3-й

день эксперимента (рис. 2а). Характер изменений туркестерона (рис. 2в, г) при внесении 100 мкМ МеЖ аналогичен образцам добавлением этанола, максимальный уровень которого, как и суммарного содержания экдистероидов (табл.), отмечается на 6-й день культивирования. Однако сравнение уровней туркестерона показало, что его содержание в образце 100-6 превышает контроль в 4.5–6 раз, а 0-6 в 1.4 раза (рис. 2в, г). В суммарном содержании экдистероидов в контрольных образцах туркестерон составляет до 25%, тогда как в образцах с добавлением этанола 40–60% и 35–52% с добавлением МеЖ в концентрации 100 мкМ. При этом содержание 20Е в сумме экдистероидов варьирует от 8 до 30%. Ранее установлен состав экдистероидов в интактных растениях *Silene linicola* [24], включающий 20Е, полиподин В, экдизон, 2-дезоксид-20-гидроксиэкдизон, витикостерон Е, туркестерон, интегристерон А. В интродуцированном виде *Silene linicola* мажорным компонентом является 20Е, а соотношение 20Е : Т составляло 367 : 1 [24].

Показано, что в эксперименте с добавлением МеЖ в концентрации 200 мкМ происходит слабое ингибирование процессов синтеза экдистероидов (табл.).

Содержание экдистероидов в экстрактах *hairy roots Silene linicola*

№	Образцы	Содержание 20Е, % ($\bar{x} \pm m$)	Содержание туркестерона, % ($\bar{x} \pm m$)	Суммарное содержание экдистероидов, %
1	к1	0.023±0.0008	0.016±0.0003	0.063±0.0006
2	к2	0.014±0.0004	0.012±0.0005	0.055±0.0005
3	0-3	0.019±0.0002	0.045±0.0013	0.100±0.0008
4	0-6	0.018±0.0005	0.054±0.0009	0.094±0.0007
5	0-12	0.016±0.0003	0.028±0.0012	0.073±0.0008
6	100-3	0.033±0.0009	0.038±0.0037	0.107±0.0023
7	100-6	0.030±0.0011	0.073±0.0023	0.138±0.0017
8	100-12	0.011±0.0003	0.046±0.0007	0.134±0.0005
9	200-3	0.025±0.0012	0.010±0.0003	0.056±0.0008
10	200-6	0.018±0.0007	0.023±0.0014	0.061±0.0011
11	200-12	0.021±0.0003	–	0.038±0.0003

Примечание: см. рис. 1.

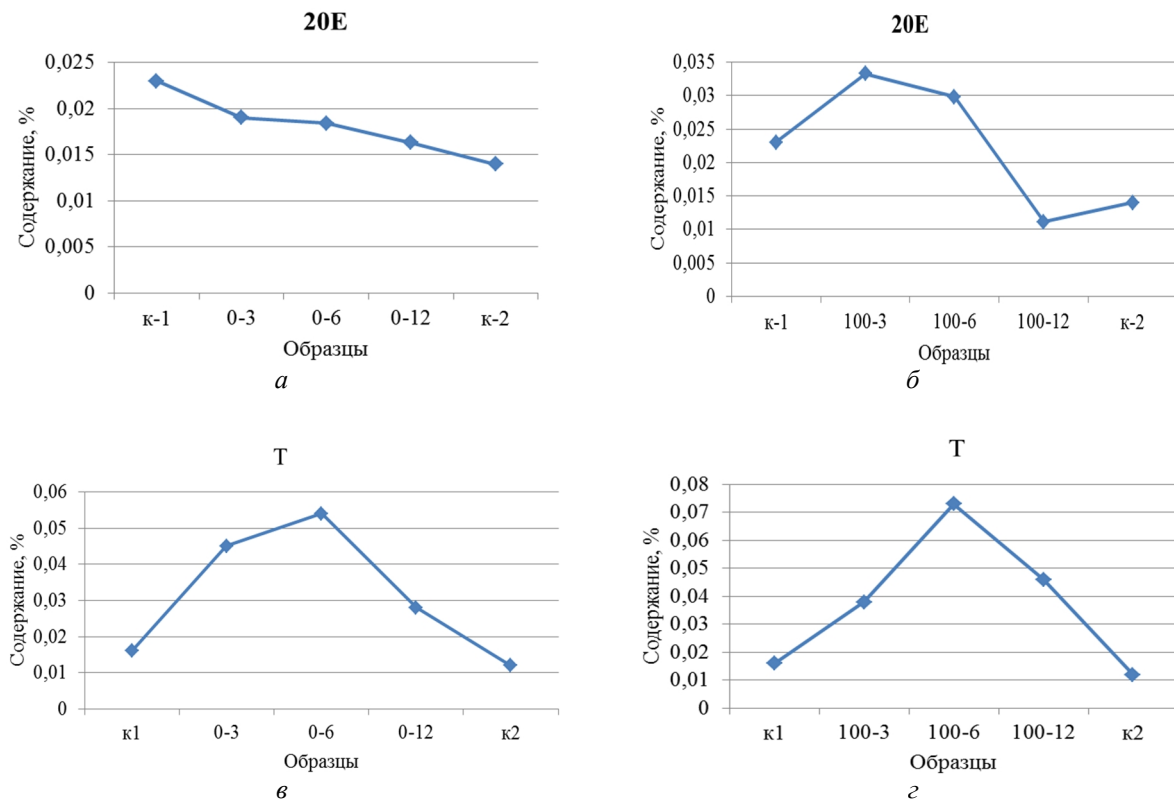


Рис. 2. Изменение содержания экдистероидов в процессе культивирования в *hairy roots* образцах *Silene linicola*. Примечание: см. рис. 1.

Полипидин В и туркестерон являются окси-производными 20Е, и отличие их химических структур заключается в различном положении дополнительной по сравнению с 20Е ОН-группы – в 5β-положении у полипидина В, тогда как в туркестероне – в 11 положении (рис. 3). Возможно, биосинтез во всех *hairy roots* образцах *Silene linicola* предпочтительно идет по пути образования туркестерона, ценного в фармакологическом плане вторичного метаболита. Известно, что туркестерон повышает адаптационные возможности организма мышей в условиях иммобилизационного стресса, оказывает благотворное действие на энергетические реакции организма, работоспособность, выносливость, при этом, не являясь допингом [25, 26].

Таким образом, *hairy roots* культуры *Silene linicola* при масштабировании эксперимента могут служить источником получения редкого экидистероида – туркестерона. До настоящего времени его присутствие выявлено лишь в пяти видах растений: *Ajuga turkestanica*, *Vitex glabrata*, *Vitex canescens* (*Lamiaceae*), *Leuzea carthamoides* (*Asteraceae*), *Silene linicola* (*Caryophyllaceae*) и грибах *Tapinella panuoides* (*Fungi*) [1].

Известно, что уровень биосинтеза вторичных метаболитов также значительно зависит как от используемой линии *hairy roots*, поскольку линии образуются из индивидуальной генетически модифицированной клетки [27], так и от применяемого штамма агробактерий [28]. Так, в полученной нами ранее линии *hairy roots S. linicola* с использованием штамма *A. rhizogenes* R-1601, содержание 20Е составило 0.18%, [19], а в составе экидистероидов присутствовали экизон и распространенные в видах гвоздичных – 2-дезоксидэкизон и 2-дезоксидэкизон, но не обнаружен ценный и редкий экидистероид – туркестерон.

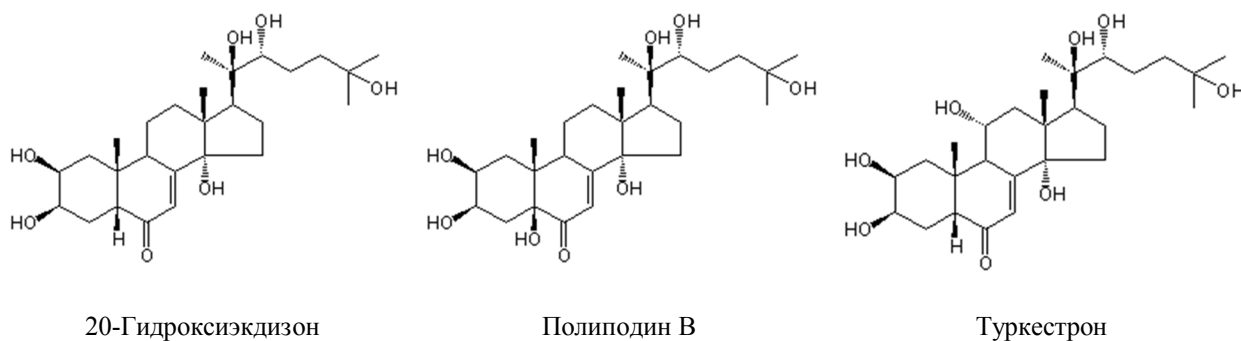


Рис. 3. Структуры идентифицированных экидистероидов в *hairy roots* культурах *Silene linicola*

Выводы

В результате исследования получена культура *hairy roots S. linicola* с использованием штамма *A. rhizogenes* А-4, способная синтезировать экидистероиды – 20Е, туркестерон и полипидин В. Отмечено, что в контроле происходит снижение уровня биосинтеза 20Е с 0,023 до 0,014%. Показано стимулирующее влияние МеЖ в концентрации 100 мкМ на биосинтез 20Е на 3-й день, туркестерона – на 6-й день эксперимента. В случае применения МеЖ наблюдается увеличение суммарного содержания экидистероидов в 2 раза и редко встречающегося в растениях туркестерона в 4.5–6 раз по сравнению с контролем. Таким образом, используя элиситор – метилжасмонат, а также изменяя продолжительность периода культивирования, можно варьировать набор экидистероидов в культурах *hairy roots S. linicola* и направлять биосинтез на получение ценного и редкого туркестерона.

При подготовке публикации использовались материалы биоресурсной научной коллекции ЦСБС СО РАН «Коллекции живых растений в открытом и закрытом грунте», УНУ № USU 440534.

*Авторы выражают благодарность заведующей группой специализированного метаболизма корней ИФР РАН, к.б.н. Кузовкиной Инне Николаевне за предоставленные для работы штаммы *Agrobacterium rhizogenes*.*

Список литературы

1. The Ecdysone Handbook [Электронный ресурс]. URL: <http://ecdybase.org/>
2. Zibareva L., Volodin V., Saatov Z., Savchenko T., Whiting P., Lafont R., Dinan L. Distribution of phytoecdysteroids in the Caryophyllaceae // *Phytochemistry*. 2004. Vol. 64. Pp. 499–517. DOI: 10.1016/S0031-9422(03)00376-5.

3. Зибарева Л.Н., Волкова О.В., Морозов С.В., Черняк Е.И. Фитоэктистероиды корней *Silene frivaldszkyana* Hampe // Химия растительного сырья. 2017. №1. С. 71–75. DOI: 10.14258/jcrgm.2017011416.
4. Зибарева Л.Н., Еремина В.И. Динамика содержания эктистероидов в видах *Silene* // Растительные ресурсы. 1996. Т. 32, вып. 1-2. С. 106–110.
5. Зибарева Л.Н., Еремина В.И., Иванова Н.А. Новые эктистероидоносные виды рода *Silene* L. и динамика содержания в них эктистерона // Растительные ресурсы. 1997. Т. 33, вып. 3. С. 73–76.
6. Giri A., Narasu M.L. Transgenic hairy roots: recent trends and applications // Biotechnology Advances. 2000. Vol. 18. Pp. 1–22. DOI: 10.1016/S0734-9750(99)00016-6.
7. Kim Y., Wyslouzil B.E., Weathers P.J. Secondary metabolism of hairy root cultures in bioreactors // In vitro Cell. Dev. Biol.–Plant. 2002. Vol. 38. Pp. 1–10. DOI: 10.1079/IVP2001243.
8. Georgiev M.I., Weber J., Maciuk A. Bioprocessing of plant cell cultures for mass production of targeted compounds // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2009. Vol. 83. Pp. 809–823. DOI: 10.1007/s00253-009-2049-x.
9. Shabania L., Ehsanpoura A.A., Asgharib G., Emamib J. Glycyrrhizin production by *in vitro* cultured *Glycyrrhiza glabra* elicited by methyl jasmonate and salicylic acid // Russian Journal of Plant Physiology. 2009. Vol. 56. N5. Pp. 621–626. DOI: 10.1134/S102144370905006.
10. Martin K.P., Sabovljevic A., Madassery J. High-frequency transgenic plant regeneration and plumbagin production through methyl jasmonate elicitation from hairy roots of *Plumbago indica* L. // J. Crop Sci. Biotech. 2011. Vol. 14. N3. Pp. 205–212. DOI: 10.1007/s12892-010-0123-7.
11. Chodiseti B., Rao K., Gandi S., Giri A. Gymnemic acid enhancement in the suspension cultures of *Gymnema sylvestre* by using the signaling molecules—methyl jasmonate and salicylic acid // In Vitro Cell. Dev. Biol.–Plant. 2015. Vol. 51. Pp. 88–92. DOI: 10.1007/s11627-014-9655-8.
12. Ram M., Prasad K. V., Singh S. K., Hada B. S., Kumar S. Influence of salicylic acid and methyl jasmonate elicitation on anthocyanin production in callus cultures of *Rosa hybrida* L. // Plant Cell Tiss. Organ Cult. 2013. Vol. 113. Pp. 459–467. DOI: 10.1007/s11240-013-0287-1.
13. Wasternack C., Hause B. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development // Ann. Bot. 2013. Vol. 111. Pp. 1021–1058. DOI: 10.1093/aob/mct067.
14. Yan Y., Borrego E., Kolomiets M.V. Jasmonate biosynthesis, perception and function in plant development and stress responses // Lipid Metabolism. In Tech. 2013. Pp. 393–442.
15. Cheng D.M., Yousef G.G., Grace M.H., Rogers R.B., Gorelick-Feldman J., Raskin I., Lila M.A. *In vitro* production of metabolism-enhancing phytoecdysteroids from *Ajuga turkestanica* // Plant Cell Tiss. Organ. Cult. 2008. Vol. 93. Pp. 73–83. DOI: 10.1007/s11240-008-9345-5.
16. Schmelz E.A., Grebenok R.J., Ohnmeiss T.E., Bowers W.S. Phytoecdysteroid turnover in spinach: Long-term stability supports a plant defense hypothesis // J. Chem. Ecol. 2000. Vol. 26. Pp. 2883–2896. DOI: 10.1023/A:1026454213510.
17. Володин В.В., Володина С.О., Чадин И.Ф., Пылина Я.И., Бачаров Д.С., Джумырко С.Ф., Бутенко Л.И. Состав эктистероидов в дикорастущих и культивируемых растениях *Serratula quinquefolia* Vieb. ex Willd // Вестник ИБ. 2010. №4. С. 29–34.
18. Филлипова В.Н., Володина С.О., Смоленская И.Н. Эктистероиды в культурах клеток *Serratula coronata* и *Ajuga reptans* // Химия растительного сырья. 2002. №1. С. 69–80.
19. Erst A.A., Zheleznichenko T.V., Badulina A.A., Zibareva L.N., Kovzunova O.V. Biosynthesis of phytoecdysteroids in the hairy root culture of *Silene linicola* C.C. Gmelin // Plant Cell. Biotechnology and Molecular Biology. 2016. Vol. 17. N7-8. Pp. 326–334.
20. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiol. Plantarum. 1962. Vol. 15. N2. Pp. 473–497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
21. Gamborg O.L., Eveleigh D.E. Culture methods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley // Can. J. Biochem. 1968. Vol. 46. N5. Pp. 417–421.
22. Van Furden B., Humburg A., Fuss E. Influence of methyl jasmonate on podophyllotoxin and 6-methoxypodophyllotoxin accumulation in *Linum album* cell suspension cultures // Plant Cell. Rep. 2005. Vol. 24. Pp. 312–317. DOI: 10.1007/s00299-005-0954-8.
23. Lee E.J., Park S.Y., Paek K.Y. Enhancement strategies of bioactive compound production in adventitious root cultures of *Eleutherococcus koreanum* Nakai subjected to methyl jasmonate and salicylic acid elicitation through airlift bioreactors // Plant Cell. Tiss. Organ Culture. 2015. Vol. 120. N1. Pp. 1–10. DOI: 10.1007/s11240-014-0567-4.
24. Зибарева Л.Н. Фитоэктистероиды растений семейства Caryophyllaceae. Saarbrücken, Germany – LAP Lambert Academic Publishing GmbH&Co, 2012. 195 с.
25. Gizatullina Z.Z., Gagelgans A.I., Syrov V.N. Ecdysterone, turkesterone and nerobol alter thymocyte energy metabolism // Doklady Akademii Nauk Respubliki Uzbekistan. 1994. Vol. 10. Pp. 49–52.
26. Syrov V.N., Kurmukov A.G. Anabolic properties of the phytoecdysones turkesterone and turkesterone tetraacetate in experiments on male rats // Problemy Endokrinologii. 1976. Vol. 22(3). Pp. 107–112.
27. Bourgaud F., Bouque V., Guckert A. Production of flavonoids by *Psoralea* hairy root cultures // Plant Cell. Tiss. Organ. Cult. 1999. Vol. 56. Pp. 97–104. DOI: 10.1023/A:1006206104795.

28. Jittayasothorn Y., Yang Y., Chen S., Wang X., Zhong Y. Influences of *Agrobacterium rhizogenes* strains, plant genotypes, and tissue types on the induction of transgenic hairy roots in *Vitis* species // *Vitis*. 2011. Vol. 50. N3. Pp. 107–114.

Поступила в редакцию 11 марта 2018 г.

После переработки 27 марта 2018 г.

Принята к публикации 12 апреля 2018 г.

Для цитирования: Эрст А.А., Зибарева Л.Н., Филоненко Е.С., Железниченко Т.В. Влияние метилжасмоната на биосинтез экдистероидов в культуре *Hairy Roots Silene Linicola* C.C. Gmelin // *Химия растительного сырья*. 2018. №4. С. 159–167. DOI: 10.14258/jcprm.2018043807.

Erst A.A.^{1*}, Zibareva L.N.², Filonenko E.S.², Zheleznichenko T.V.¹ INFLUENCE METHYL JASMONATE ON PRODUCTION OF ECDYSTEROIDS FROM HAIRY ROOTS OF *SILENE LINICOLA* C.C. GMELIN

¹Central Siberian Botanical Garden, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, ul. Zolotodolinskaya, 101, Novosibirsk, 630090 (Russia), e-mail: annaerst@yandex.ru

²National Research Tomsk State University, pr. Lenina, 36, Tomsk, 634050 (Russia)

Hairy root cultures are being considered as promising system for producing valuable second metabolites. These genetically transformed root cultures are characterized by high growth rate, genetic stability and growth in hormone free media. Using *A. rhizogenes*-mediated transformation method (strain A-4), we have obtained *hairy root* cultures of the ecdysteroid-containing species of *Silene linicola*. HPLC analysis of the sample studied revealed that 20-hydroxyecdysone (20E), turkesterone and polygodin B were synthesized under the specified experimental conditions. Application of methyl jasmonate at a concentration of 100 μM resulted in stimulation of 20E biosynthesis (up 74%) after 3 days of cultivation and turkesterone up to 35% at 6 days. It was noted that total ecdysteroid content in sample tested varied: turkesterone from 25 to 60%, and 20E from 8 to 30%. At the same time the level of 20E biosynthesis decreased from 0.023 to 0.014% in the samples without methyl jasmonate treatment. *Hairy root* lines of *S. linicola* with different responses to the presence of elicitors in the culture medium can be used to study the pathways of ecdysteroid biosynthesis.

Keywords: phytoecdysteroids, HPLC, methyl jasmonate, hairy roots, *Silene linicola*.

References

1. *The Ecdysone Handbook* [Electronic resource]. URL: <http://ecdybase.org/>
2. Zibareva L., Volodin V., Saatov Z., Savchenko T., Whiting P., Lafont R., Dinan L. *Phytochemistry*, 2004, vol. 64, pp. 499–517. DOI: 10.1016/S0031-9422(03)00376-5.
3. Zibareva L.N., Volkova O.V., Morozov S.V., Chernyak Ye.I. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2017, no. 1, pp. 71–75. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.2017011416.
4. Zibareva L.N., Yeremina V.I. *Rastitel'nyye resursy*, 1996, vol. 32, no. 1-2, pp. 106–110. (in Russ.).
5. Zibareva L.N., Yeremina V.I., Ivanova N.A. *Rastitel'nyye resursy*, 1997, vol. 33, no. 3, pp. 73–76. (in Russ.).
6. Giri A., Narasu M. L. *Biotechnology Advances*, 2000, vol. 18, pp. 1–22. DOI: 10.1016/S0734-9750(99)00016-6.
7. Kim Y., Wyslouzil B.E., Weathers P.J. *In vitro Cell. Dev. Biol.–Plant.*, 2002, vol. 38, pp. 1–10. DOI: 10.1079/IVP2001243.
8. Georgiev M.I., Weber J., Maciuk A. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2009, vol. 83, pp. 809–823. DOI: 10.1007/s00253-009-2049-x.
9. Shabania L., Ehsanpoura A.A., Asgharib G., Emamib J. *Russian Journal of Plant Physiology.*, 2009, vol. 56, no. 5, pp. 621–626. DOI: 10.1134/S102144370905006.
10. Martin K.P., Sabovljevic A., Madassery J. *J. Crop Sci. Biotech.*, 2011, vol. 14, no. 3, pp. 205–212. DOI: 10.1007/s12892-010-0123-7.
11. Chodiseti B., Rao K., Gandhi S., Giri A. *In Vitro Cell. Dev. Biol.–Plant.*, 2015, vol. 51, pp. 88–92. DOI: 10.1007/s11627-014-9655-8.
12. Ram M., Prasad K. V., Singh S. K., Hada B. S., Kumar S. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 2013, vol. 113, pp. 459–467. DOI: 10.1007/s11240-013-0287-1.

* Corresponding author.

13. Wasternack C., Hause B. *Ann. Bot.*, 2013, vol. 111, pp. 1021–1058. DOI: 10.1093/aob/mct067.
14. Yan Y., Borrego E., Kolomiets M.V. *Lipid Metabolism. In Tech*, 2013, pp. 393–442.
15. Cheng D.M., Yousef G.G., Grace M.H., Rogers R.B., Gorelick-Feldman J., Raskin I., Lila M.A. *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.*, 2008, vol. 93, pp. 73–83. DOI: 10.1007/s11240-008-9345-5.
16. Schmelz E.A., Grebenok R.J., Ohnmeiss T.E., Bowers W.S. *J. Chem. Ecol.*, 2000, vol. 26, pp. 2883–2896. DOI: 10.1023/A:1026454213510.
17. Volodin V.V., Volodina S.O., Chadin I.F., Pylina YA.I., Bacharov D.S., Dzhumyrko S.F., Butenko L.I. *Vestnik IB*, 2010, no. 4, pp. 29–34. (in Russ.).
18. Fillipova V.N., Volodina S.O., Smolenskaya I.N. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2002, no. 1, pp. 69–80. (in Russ.).
19. Erst A.A., Zhelezniichenko T.V., Badulina A.A., Zibareva L.N., Kovzunova O.V. *Plant Cell. Biotechnology and Molecular Biology*, 2016, vol. 17, no. 7-8, pp. 326–334.
20. Murashige T., Skoog F. *Physiol. Plantarum.*, 1962, vol. 15, no. 2, pp. 473–497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
21. Gamborg O.L., Eveleigh D.E. *Can. J. Biochem.*, 1968, vol. 46, no. 5, pp. 417–421.
22. Van Furden B., Humburg A., Fuss. E. *Plant Cell. Rep.*, 2005, vol. 24, pp. 312–317. DOI: 10.1007/s00299-005-0954-8.
23. Lee E.J., Park S.Y., Paek K.Y. *Plant Cell. Tiss. Organ. Culture*, 2015, vol. 120, no. 1, pp. 1–10. DOI: 10.1007/s11240-014-0567-4.
24. Zibareva L.N. *Fitoekdisteroidy rasteniy semeystva Caryophyllaceae*. [Phytoecdysteroids of plants of the Caryophyllaceae family]. Saarbrücken, Germany – LAP Lambert Academic Publishing GmbH&Co, 2012, 195 p. (in Russ.).
25. Gizatullina Z.Z., Gagelgans A.I., Syrov V.N. *Doklady Akademii Nauk Respubliki Uzbekistan*, 1994, vol. 10, pp. 49–52.
26. Syrov V.N., Kurmukov A.G. *Problemy Endokrinologii*, 1976, vol. 22(3), pp. 107–112.
27. Bourgaud F., Bouque V., Guckert A. *Plant Cell. Tiss. Organ. Cult.*, 1999, vol. 56, pp. 97–104. DOI: 10.1023/A:1006206104795.
28. Jittayasothorn Y., Yang Y., Chen S., Wang X., Zhong Y. *Vitis*, 2011, vol. 50, no. 3, pp. 107–114.

Received March 11, 2018

Revised March 27, 2018

Accepted June 4, 2018

For citing: Erst A.A., Zibareva L.N., Filonenko E.S., Zhelezniichenko T.V. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2018, no. 4, pp. 159–167. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.2018043807.

