

**УДК 582.736.3: 546.23**

## **КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ СЕЛЕНА КАЛЛУСНЫМИ КУЛЬТУРАМИ *ASTRAGALUS DASIANTHUS (PALL.)***

**Юркова И.Н., Тайкова В.П., Бугара И.А., Теплицкая Л.М.**

*Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Украина  
E-mail: nanosilver@rambler.ru*

Исследованы закономерности накопления селена каллусными культурами *Astragalus dasyanthus* в зависимости от концентрации селена в питательной среде. Показано, что при ступенчатом увеличении концентрации селена в питательной среде значительно повышается степень концентрирования селена и ростовая активность. Максимальное содержание селена в каллусной биомассе увеличилось в 74 раза по сравнению с контролем.

**Ключевые слова:** каллусные культуры, *Astragalus dasyanthus*, селен, концентрирование.

### **ВВЕДЕНИЕ**

В последнее время у исследователей резко повысился интерес к селену – микроэлементу, необходимому для жизнедеятельности организма. Спектр действия селена в организме широк. Он выполняет каталитическую, структурную и регуляторную функции, взаимодействует с витаминами, ферментами и биологическими мембранами [1], участвует в окислительно-восстановительных процессах, обмене жиров, белков и углеводов [2]. Миграция селена осуществляется по цепочке: почва – вода – пищевые продукты – человек.

Основными путями поступления селена в организм являются продукты животного и растительного происхождения, к которым относятся растения-концентраторы селена, в зависимости от его содержания в почве накапливающие до 15 г Se/кг а.с.в. [3]. Самая высокая биодоступность селена в составе различных растительных источников.

Однако во многих регионах, в том числе в Украине, в почвах сельскохозяйственного назначения фиксируется дефицит селена [4]. Этот дефицит увеличивается по мере внесения в почву серосодержащих удобрений. С целью получения органических форм селена разработаны технологии обогащения биомассы микроводорослей (спирулины) и дрожжей селеном. Однако для этих микроорганизмов селен в больших концентрациях является токсикантом, угнетающим рост биомассы [5, 6]. Кроме того, значительная часть селена накапливается микроорганизмами в процессе физической адсорбции селенидов полисахаридами клеточной стенки [7].

Из растений-концентраторов селена первое место занимают виды рода *Astragalus*, к которому относится *Astragalus dasiantus* Pall., внесенный в государственную Фармакопею как официальное лекарственное растение [8].

Экологически чистые ареалы произрастания астрагала шерстистоцветкового расположены в заповедных территориях Забайкалья. На фармацевтическом рынке присутствуют только препараты российского и американского производства (Фитоселен, драже Селеновый дар и др.), полученные на основе экстракции из дикорастущего астрагала селеносодержащих органических форм. Однако в Украине этот вид находится под угрозой уничтожения и занесен в Красную книгу Украины [9]. В связи с этим актуальным является получение клеточной биомассы астрагала в качестве источника биологически доступных форм органического селена.

Целью настоящей работы было исследование закономерностей концентрирования селена длительно пассируемыми каллусными культурами астрагала шерстистоцветкового.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служили каллусные культуры астрагала шерстистоцветкового *Astragalus dasyanthus* Pall. III-IV пассажа. При выполнении работы использовали методы, общепринятые в исследованиях по культуре изолированных тканей растений [10]. Каллусные культуры IV пассажа выращивали в течение 13 недель на модифицированной агаризованной питательной среде Мурасиге и Скуга, дополненной фитогормонами (2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой – 2,0 мг/дм<sup>3</sup>, 6-бензиламинопурин – 0,5 мг/дм<sup>3</sup>, кинетином – 0,5 мг/дм<sup>3</sup> [11,12]) и селеном. Наименее токсичной и наиболее предпочитаемой растениями и микроорганизмами формой селена являются селениты щелочных металлов (IV) [13]. Поэтому источником селена в питательных средах служил селенит натрия (Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>) «ч.д.а.» в концентрациях 5-20 мг Se/дм<sup>3</sup>. Схема эксперимента приведена на Рис. 1.

В первой серии каллусные культуры III пассажа пассировали на питательную среду, содержащую селен в тех же концентрациях, что и в III пассаже: контроль (без селена), 5, 10 и 15 мг Se/дм<sup>3</sup>; во второй – использован метод последовательного повышения устойчивости от низких концентраций токсичных веществ до более высоких. В этой серии каллусные культуры астрагала пассировали на питательную среду, содержащую на 5 мг Se/дм<sup>3</sup> больше, чем в предыдущем пассаже: 5 мг Se/дм<sup>3</sup> => 10 мг Se/дм<sup>3</sup>, 10 мг Se/ дм<sup>3</sup> => 15 мг Se/дм<sup>3</sup>, 15 мг Se/дм<sup>3</sup> => 20 мг Se/дм<sup>3</sup>.

Каллус культивировали в условиях термостатируемого помещения (25 °С) при относительной влажности воздуха 65-70 %, освещенности 2-3 тыс. люкс и 16-часовом фотопериоде [14].

Ростовой индекс определяли морфометрическим методом по отношению среднего объема полученного каллуса к объему транспланта на 1-ю, 4-ю, 7-ю, 10-ю и 13-ю недели культивирования.

Содержание селена в каллусной биомассе, высушенной до абсолютно сухого веса (а.с.в.), определяли в конце эксперимента (13-я неделя культивирования) на атомно-абсорбционном спектрометре фирмы Perkin-Ermler.

Полученные данные обработаны статистически с использованием стандартного пакета статистики в Microsoft Office.

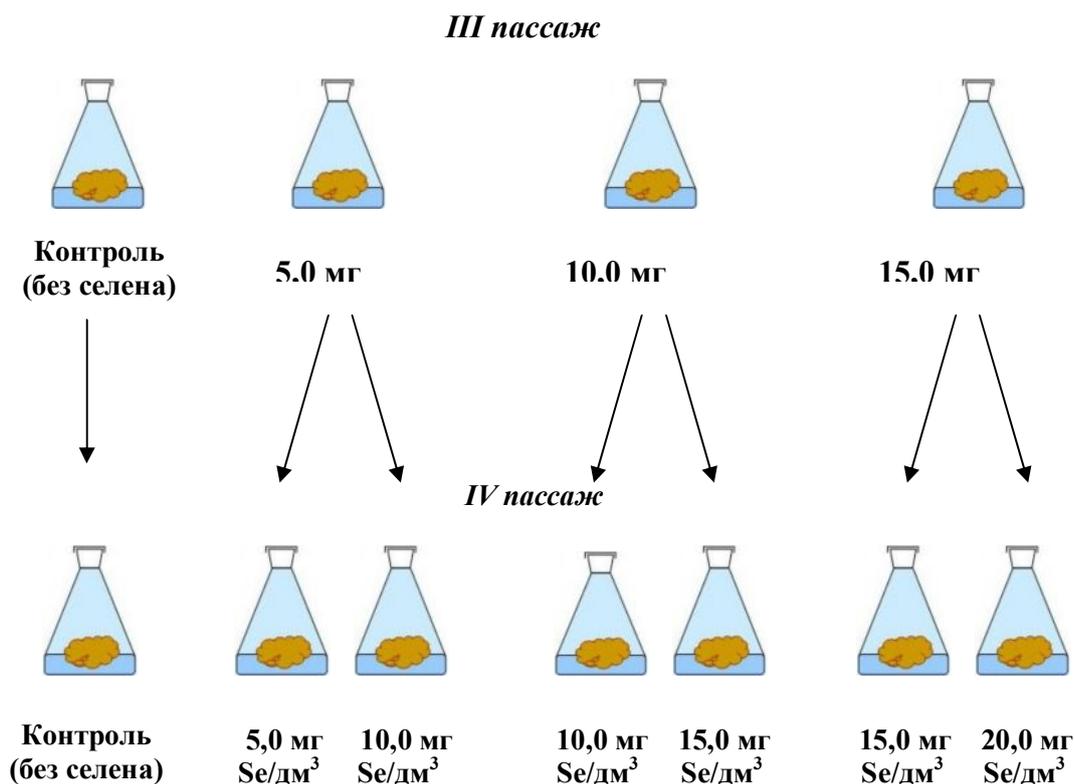


Рис. 1. Схема исследования влияния условий внесения селена в питательную среду на ростовые характеристики и концентрирование селена каллусными культурами астрагала шерстистоцветкового.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование закономерностей роста каллусных культур астрагала шерстистоцветкового в зависимости от условий внесения в питательную среду селена показало, что при пассировании каллуса на питательные среды с постоянной концентрацией селена снижение ростового индекса наблюдалось только при концентрации селена 15,0 мг/дм<sup>3</sup> (рис. 2, крива 4) до 10-й недели культивирования. К 13-й недели значение ростового индекса в варианте 15,0 мг Se/дм<sup>3</sup> превысило контрольное (рис. 2, кривые 1 и 4).

Максимальный прирост биомассы отмечался во второй серии при ступенчатом увеличении концентрации селена с 10,0 до 15,0 мг/дм<sup>3</sup> (рис. 2, кривая 6).

Как видно из приведенных результатов, устойчивость каллусных культур астрагала шерстистоцветкового к высоким концентрациям селена (15,0 – 20,0 мг/дм<sup>3</sup>) резко повышалась начиная с 7-й недели культивирования (рис. 2, кривые 3-6).

Тормозящее воздействие селена на рост наблюдалось лишь при пассировании каллуса на среду, содержащую 20,0 мг Se/дм<sup>3</sup>, к концу 13-й недели эксперимента (рис. 2, кривая 7).

Закономерности, полученные при исследовании влияния условий внесения селена в питательные среды, хорошо согласуются с результатами концентрирования селена каллусной биомассой астрагала шерстистоцветкового (рис. 3).

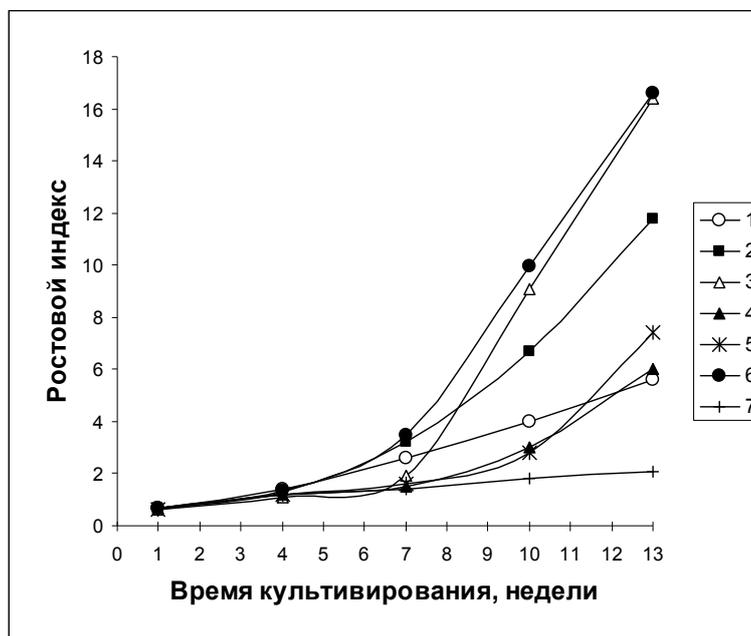


Рис. 2. Динамика роста каллусных культур астрагала шерстистоцветкового в зависимости от условий внесения селена в питательную среду:

1 – контроль (без Se); 2 – 5,0 мг Se/дм<sup>3</sup>; 3 – 10,0 мг Se/дм<sup>3</sup>; 4 – 15,0 мг Se/дм<sup>3</sup>; 5 – 10,0 мг Se/дм<sup>3</sup> (в предыдущем пассаже – 5,0 мг Se/дм<sup>3</sup>); 6 – 15,0 мг Se/дм<sup>3</sup> (в предыдущем пассаже – 10,0 мг Se/дм<sup>3</sup>); 7 – 20 мг Se/дм<sup>3</sup> (в предыдущем пассаже – 15,0 мг Se/дм<sup>3</sup>).

Как видно из приведенных на Рис. 3 данных, увеличение концентрации селена в питательной среде приводило к увеличению концентрирования селена каллусной биомассой как в первой, так и во второй сериях. Однако при ступенчатом увеличении концентрации селена этот эффект был наиболее выражен, особенно в варианте 20 мг Se/дм<sup>3</sup>. В этом случае содержание селена в биомассе каллуса увеличилась в 74 раза по сравнению с контролем (небольшое количество селена в контроле объясняется его присутствием в качестве примесей в солях, используемых для приготовления питательной среды). Накопление селена в каллусных культурах при его концентрации в питательной среде 15-20 мг Se/дм<sup>3</sup> достигало 321,7-348,3 мг Se/кг а.с.в., что значительно выше концентрирования селена микроводорослью *Spirulina platensis* и хлебопекарными дрожжами [5, 6].

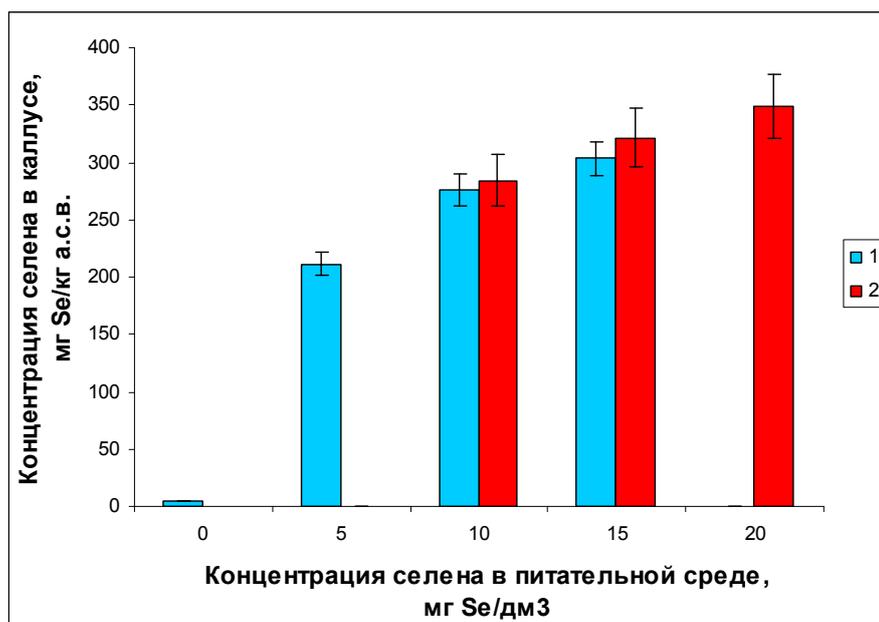


Рис. 3. Концентрирование селена каллусными культурами астрагала шерстистоцветкового в зависимости от условий внесения селена в питательную среду: 1 – каллусные культуры, пассированные на питательную среду, содержащую селен в тех же концентрациях, что и в предыдущем пассаже;

2 – каллусные культуры, пассированные на питательную среду, содержащую на 5 мг Se/дм<sup>3</sup> больше, чем в предыдущем пассаже (5 мг Se/дм<sup>3</sup> => 10 мг Se/дм<sup>3</sup>, 10 мг Se/дм<sup>3</sup> => 15 мг Se/дм<sup>3</sup>, 15 мг Se/дм<sup>3</sup> => 20 мг Se/дм<sup>3</sup>).

### ВЫВОДЫ

В результате проведенных исследований показано, что каллусные культуры астрагала шерстистоцветкового способны многократно концентрировать селен из питательной среды, содержащей до 20,0 мг Se/дм<sup>3</sup> (IV), при одновременном повышении ростовой активности.

### Список литературы

1. Микроэлементозы человека: этиология, классификация, органопатология / [Авцын А.П., Жаворонков А.А., Риш М.А. и др]. – М., 1991. – 258 с.
2. Ермаков В.В. Биологическое значение селена / В.В. Ермаков, В.А. Ковальский. – М., 1974. – 189 с.
3. Давидова О.Є. Фізіолого-біохімічні та стреспротекторні функції селену в рослинах / О.Є Давидова., В.А Вещицкий, П.П. Яворівський // Физиология и биохимия культурных растений. – 2009. – Т.41, № 2. – С. 109–122.
4. Серегина И.И. Биологическая роль селена в растениях / И.И. Серегина, Н.Т. Ниловская // Агрехимия. – 2002. – № 10. – С. 76–85.

5. Влияние селена на рост микроводоросли *Spirulina platensis* (Nords.) в накопительной и квазинепрерывной культурах / Г.С. Минюк, Р.П. Тренкеншу, А.В. Алисиевич [и др.] // Экология моря. – 2000. – Вып. 54. – С. 42–49.
6. Физиологические и биохимические особенности культивирования хлебопекарных дрожжей на средах, содержащих минеральный селен / К.И. Жакова, С.Л. Романов, Л.Ф. Коваленко [и др.] // Весті Національної академії наук Білорусі. Серія аграрних наук. – 2005. – № 4. – С. 120–123.
7. Oyamada N. Methylation of inorganic selenium compounds by freshwater green algae *Ankistrodesmus sp.*, *Chlorella vulgaris* and *Selenastrum sp.* / N. Oyamada, G. Takahashi, M. Ishizaki // Eisei Kagaku. – 1991. – V. 37, № 2. – P. 83–88.
8. Государственная фармакопея Украины. – Харьков, 2008. – 617 с.
9. Акімов І.К. Червона книжка України. / Акімов І.К. – Глобалконсалтинг, 2009. – 1536 с.
10. Калинин Ф.Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф.Л. Калинин, В.В. Сарнацкая, В.Е. Полищук. – Киев.: Наук. думка, 1986. – С. 34–36.
11. Пат. № 36368 Украина, МПК6 С 12 N 5/04. Спосіб культивування калусної тканини астрагала шерстистоквіткового (*Astragalus dasyanthus* Pall.) / Бугара І.О., Юркова І.М., Бугара О.М.; заявитель и патентообладатель Таврический нац. ун-т. – № 200805928; заявл. 07.05.08; опубл. 27.10.08. Бюл. № 20.
12. Бугара И.А. Получение и цитологический анализ калусных культур астрагала шерстистоцветкового (*Astragalus dasyanthus* Pall.) / И.А. Бугара, И.Н. Юркова, А.М. Бугара // Ученые записки Таврич. нац. ун-та. Серия «Биология, химия». – 2008. – Т. 21(60), № 2. – С. 9–14.
13. Zhou Z. Study on the accumulation of selenium and its binding to the proteins, polysaccharides and lipids from *Spirulina maxima*, *S. platensis* and *S. subsalsa* / Z. Zhou, P. Li, Z. Liu // Oceanol. Limnol. Sin. Haiyang Yu Huzhao. – 1997. – V. 28, № 4. – P. 363–370.
14. Высоккий В.А. Клональное микроразмножение растений / В.А. Высоккий // Культура клеток растений и биотехнология. – М.: Наука, 1986. – С. 34–36.

**Юркова І.М. Концентрація селену калусними культурами *Astragalus dasianthus* (Pall.) / І.М. Юркова, В.П. Тайкова, І.О. Бугара, Л.М. Теплицька // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2010. – Т. 23 (62), № 4. – С. 239-244.**

Досліджено закономірності накопичення селену у калусних культурах *Astragalus dasyanthus* в залежності від концентрації селену в живильному середовищі. Показано, що при ступінчастому збільшенні концентрації селену в живильному середовищі значно підвищується ступінь концентрування селену і ростова активність. Максимальний вміст селену в калусній біомасі збільшився в 74 рази в порівнянні з контролем.

**Ключові слова:** астрагал шерстистоквітковий, калусні культури, концентрування селену.

**Yurkova I. The selenium concentration in callus culture of *Astragalus dasianthus* (Pall.) / I. Yurkova, V. Taikova, I. Bugara, L. Teplitskaya // Scientific Notes OF Taurida V. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2010. – Vol. 23 (62), No 4. – P. 239-244.**

The regularities of selenium accumulations in callus cultures of *Astragalus dasyanthus* of selenium concentration in culture medium was depending. The stepped increase of selenium concentration in culture medium significantly increased the degree of concentration of selenium and the growth activity was shown. The maximum selenium content in callus biomass increased of 74 degree compared with the control.

**Keywords:** callus culture, *Astragalus dasyanthus*, selenium, concentration.

Поступила в редакцію 13.11.2010 г.