

УДК 581.1

МЕЛАТОНИН И СЕЛЕН РЕГУЛИРУЮТ РОСТ
И ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТАТУС КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР
Saussurea orgaadayi IN VITRO, ПОЛУЧЕННЫХ ОТ РАЗНЫХ ЭКСПЛАНТОВ

© 2020 г. И. Ф. Головацкая^а, *, Е. В. Бойко^а, А. Е. Резниченко^а, И. Н. Плюснин^а

^аФедеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

*e-mail: golovatskaya.irina@mail.ru

Поступила в редакцию 26.11.2019 г.

После доработки 23.01.2020 г.

Принята к публикации 03.02.2020 г.

Проведено комплексное исследование влияния 0.1 пМ мелатонина, 1.0 нМ селенита натрия (SeO_3^{2-}) и их смеси на морфогенез и метаболизм у двух линий клеточной культуры *Saussurea orgaadayi* (Khanm.) Krasnob. Показаны фенотипические различия культур, полученных от разных эксплантов: гипокотилей и семядолей. Гипокотильная линия клеточной культуры (ГКК) характеризовалась большим числом и большими размерами крупных клеток по сравнению с семядольной линией (СКК). Установлено, что ростовые процессы у каллусных культур связаны с особенностями их метаболизма. Активно растущая ГКК отличалась большим содержанием пролина (2.5-кратно) и экидистерон-подобного соединения (2.3-кратно), повышенной интенсивностью перекисного окисления липидов (ПОЛ) (2-кратно) и меньшим содержанием флавоноидов (Фл). В то время как у СКК отмечали 3-кратно больший уровень Фл и меньший уровень других соединений. Экзогенный мелатонин увеличивал ростовой индекс по сырой массе (РИ) у обеих культур до 20 суток, тогда как SeO_3^{2-} повышал РИ у СКК на 20–25 сутки и не менял его у ГКК по сравнению с контролем. Совместное действие факторов повышало РИ, начиная с 15 суток больше у ГКК, чем у СКК. Мелатонин и SeO_3^{2-} регулировали функционирование антиоксидантной системы в клетке. Мелатонин понижал интенсивность ПОЛ и повышал содержание пролина у обеих линий. Влияние SeO_3^{2-} было менее эффективным, чем влияние мелатонина. Совместное действие факторов на интенсивность ПОЛ снижалось, а на содержание пролина повышалось относительно действия мелатонина у СКК, тогда как у ГКК эффективность действия комбинации факторов совпадала с эффективностью мелатонина. Высказано предположение о дифференцированном изменении дыхания клеточной культуры, как источника АФК, под действием мелатонина и SeO_3^{2-} .

Ключевые слова: *Saussurea orgaadayi*, каллусная культура клеток, рост, мелатонин, селенит натрия, перекисное окисление липидов, пролин

DOI: 10.31857/S001533032005005X

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время известно о широком распространении мелатонина (N-ацетил-5-метокситриптамина) в царствах животных, растений и грибов [1]. И если функции этого индоламина у животных и человека исследованы достаточно подробно, то его роль в растениях остается открытой.

Сокращения: ГКК – гипокотильная линия клеточной культуры; МДА – малоновый диальдегид; ПОЛ – перекисное окисление липидов; РИ – ростовой индекс; СКК – семядольная линия клеточной культуры; Фл – флавоноиды; APX – аскорбатпероксидаза; SeO_3^{2-} – селенит натрия; SOD – супероксиддисмутаза.

Несмотря на общего предшественника (L-триптофана) и сходство по строению с индолил-3-уксусной кислотой (основополагающим фитогормоном), мелатонин характеризуется особыми свойствами. Возможно, являясь амфипатической молекулой, он может воздействовать на свободные радикалы, как в гидрофильной, так и в липофильной среде [2]. Он может напрямую влиять на внутриклеточные процессы, при этом изменяя окислительный статус клетки. В тоже время он может связываться с рецепторными молекулами, запуская каскад вторичных мессенджеров [3]. Мелатонин выступает в качестве двойного анти-

оксиданта, поскольку может сам удалять разные виды активных форм кислорода (АФК), а также увеличивать активность антиоксидантной системы клетки, состоящей из неферментативных и ферментативных компонентов. Показано влияние мелатонина на разных этапах онтогенеза растений (прорастание семян, развитие корней, старение листьев, цветение, формирование семян и созревание плодов) [1]. Установлена способность мелатонина регулировать ИУК-зависимые ростовые реакции coleoptилей пшеницы и проростков *Arabidopsis* в темноте и на селективном свете [4]. Мелатонин является важным модулятором экспрессии генов, контролирующих разные аспекты клеточной активности: формирование гормонального статуса, клеточной стенки, фотосинтетического потенциала и т.д. [5]. Он также участвует в формировании защитных механизмов при действии абиотических стрессоров [6]. Эффективность действия мелатонина на фотосинтетические процессы зависит от его концентрации. С увеличением концентрации экзогенного мелатонина от 0.1 пМ до 1.0 мкМ, используемого для корневой обработки, уменьшалось время последствия для активации фотосинтеза, транспирации и устьичной проводимости листа огурца [7].

Сложность определения всех функций индоламина в растении заключается в том, что растения часто содержат его большие количества, чем животные. Можно было объяснить этот факт его синтезом в хлоропластах наравне с митохондриями, но видоспецифичность в содержании мелатонина усложняет однозначную интерпретацию [8, 9]. Кроме того, большинство моделей, с помощью которых изучаются функции мелатонина, представлены интактными проростками и растениями, получающими мелатонин через корень или лист и имеющими комплексное строение. Это усложняет установление действующих концентраций веществ, поскольку известно о буферной емкости корней и структур побега. В ходе транспорта веществ они подвергаются компартментализации или модификации, что имеет значение для обмена веществ и его регуляции.

Удобной моделью для выяснения механизмов регулирования роста клеток растения разнообразными экзогенными факторами являются культуры клеток *in vitro*. Перспективными для практики служат растения, содержащие биологически активные вещества, среди которых можно выделить виды рода *Saussurea* DC. Соссюрея оргаадай (горькуша оргаадай) – травянистое многолетнее растение из семейства Сложноцветные (Asteraceae), эндемик Юго-Восточного Алтая, Юго-Западной Тувы и Северо-Западной Монголии [10]. Она является редким видом, имеющим статус – уязвимый вид, и внесена в Красные книги Республики Тыва и Республики Алтай. Статус редкости связан с уменьшением численности особей популяций вследствие

чрезмерного использования или изменений среды обитания. В настоящее время ограничены сведения о химическом составе видов рода *Saussurea* DC. Известно, что во всех описанных видах соссурей содержатся фенольные соединения (флавоноиды, кумарин, фенолкарбоновые кислоты, дубильные вещества). В ряде видов обнаружен сесквитерпеновый лактон, относящийся к гваянолидам – цинаропикрин [11]. Ранее нами показано присутствие в культуре клеток *S. orgaadayi* терпеноидных сапонинов [12].

Ограничены сведения о влиянии мелатонина на рост отдельных клеток. Вызывает интерес совместное действие мелатонина с другим веществом с антиоксидантной активностью – селеном [13]. Согласно нашим данным, селен регулирует морфогенез и метаболизм однодольных и двудольных растений *in vivo* и каллусной клеточной культуры *S. orgaadayi in vitro* [14, 15, 12].

В связи с этим целью нашей работы явилось изучение роли мелатонина, селенита натрия и их смеси в регуляции роста и окислительного статуса гипокотильной и семядольной линий каллусной клеточной культуры *Saussurea orgaadayi* (Khanm.) Krasnob.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили две линии клеточной культуры *Saussurea orgaadayi* (Khanm.) Krasnob. Впервые клеточная культура *S. orgaadayi* получена на кафедре физиологии растений и биотехнологии Томского государственного университета под руководством проф. Р.А. Карначук на среде Мурасиге-Скуга, содержащей 0.8 мг/л 2,4-Д и 0.5 мг/л 6-БАП [16].

В качестве эксплантов для получения культур использовали семядоли и гипокотили проростков, соответственно этому линии названы семядольная и гипокотильная (рис. 1а, б). Для характеристики клеточных культур двух линий изучали особенности их роста и метаболизма (содержание суммы флавоноидов и экдистерона).

Каллусную культуру клеток *S. orgaadayi* выращивали на твердой питательной среде Мурасиге-Скуга (МС-среда), содержащей сахарозу и витамины (контроль), или МС-среда + 0.1 пМ мелатонин, или МС-среда + 1.0 нМ SeO_3^{2-} и МС-среда + 0.1 пМ мелатонин + 1.0 нМ SeO_3^{2-} (опыт). Выбор низких концентраций экзогенных веществ обусловлен самим объектом исследований – культурой растительных клеток. Она легко поглощает экзогенные вещества и не имеет хорошо развитых буферных систем тканевого (организованный апопласт) или органного (сосуды, запасующие ткани и др.) уровней нативного растения. Растительную культуру

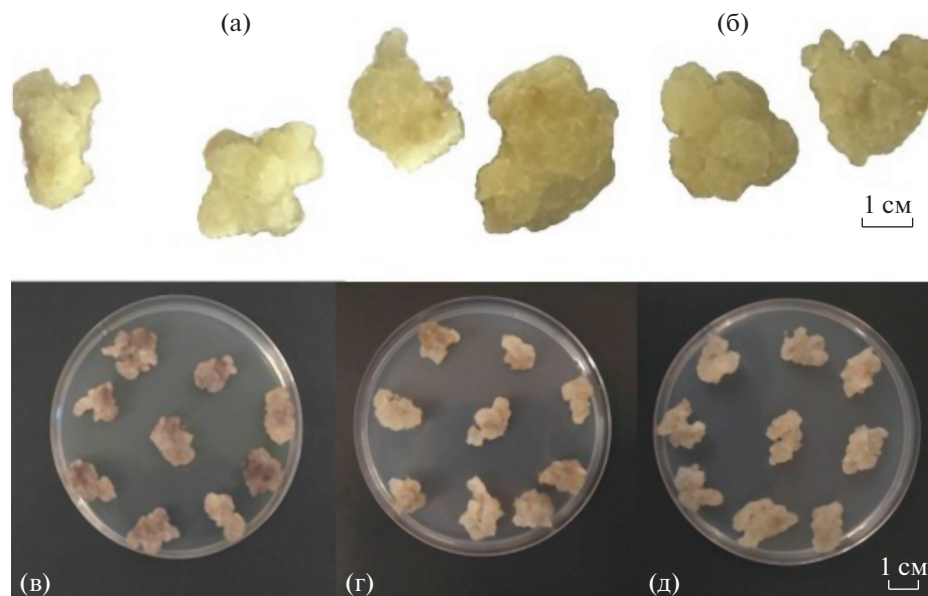


Рис. 1. Морфология и цвет каллуса клеточной культуры *S. orgaadayi* семядольной (а) и гипокотильной (б) линий на стадии активного роста, семядольной линии (в, г, д) на питательной среде без (в) и с мелатонином в концентрации 0.001 пМ (г) и 0.1 пМ (д) на 25 сутки культивирования.

туру культивировали в темноте при влажности 60–70% и температуре воздуха 20–23°C.

В ходе исследований изучали влияние экзогенных мелатонина и селенита натрия по отдельности и в смеси на рост и морфологию (форму, линейные размеры и объем клеток, ростовой индекс по сырой массе) и биохимические параметры (интенсивность перекисного окисления липидов, содержание пролина) клеточной культуры *S. orgaadayi* двух линий. Данные, касающиеся кинетики роста, собирали через 5 суток в течение 25 суток. Интенсивность перекисного окисления липидов и содержание пролина измеряли на 25 сутки культивирования для двух линий *S. orgaadayi*, что позволило оценить окислительный статус изучаемых культур в фазу активного роста.

Метод определения размеров клеток. Для определения размеров клеток использовали световую микроскопию и видеокамеру с программой “Motiscam 2300” (Испания). Перед цитологическим анализом проводили фиксацию клеточной культуры с помощью фиксатора Кларка в течение 2 суток, затем клеточный материал дважды промывали 70% раствором этилового спирта, и оставляли в новой порции этого раствора для долговременного хранения. Микропрепараты готовили из предварительно отмацерированных каллусных тканей. Мацерацию проводили в 3 N растворе соляной кислоты при встряхивании, время мацерации зависело от времени субкультивирования от 8 до 24 ч, так более молодые культуры требовали меньше времени мацерации. Измеряли длину (L) и ширину (D) кле-

ток. Объем клеток (V) высчитывали по формулам, предложенным Ю. А. Цельникер (1978) [17].

При $L/D \leq 2.5$ рассчитывали V по формуле эллипсоида вращения:

$$V = 4/3\pi L/2(D/2)^2. \quad (1)$$

При отношении $L/D > 5$ рассчитывали V по формуле цилиндра:

$$V = \pi \times 1/4 D^2 L. \quad (2)$$

При $L/D > 2.5$, но $L/D < 5$ рассчитывали V по формуле цилиндра с использованием коэффициентов k , зависящих от L/D (3), например, при $L/D = 2.6$ $k = 0.69$; при $L/D = 3.4$ $k = 0.78$; при $L/D = 4.2$ $k = 0.89$ и т.д.:

$$V = \pi \times 1/4 D^2 L k. \quad (3)$$

Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) установили спектрофотометрическим методом по накоплению малонового диальдегида (МДА). Метод основан на способности МДА реагировать с тиобарбитуровой кислотой при нагревании и образовывать окрашенный комплекс, количество которого оценивали по оптической плотности раствора при длине волны 532 нм, согласно ранее описанной методике [7].

Определение содержания пролина в клеточной культуре проводили в свежем растительном материале с помощью метода Bates с соавт. (1973), основанного на реакции с нингидрином в кислой среде, которая идет с образованием окрашенного

Таблица 1. Содержание вторичных метаболитов у разных линий клеточной культуры *S. orgaadayi* на 25 сутки субкультивирования.

Линия	Содержание суммы флавоноидов, % к сухой массе	Содержание экдистерона, % к сухой массе
СКК	0.026 ± 0.006 ^a	0.0124 ± 0.0006 ^b
ГКК	0.008 ± 0.002 ^b	0.0287 ± 0.0046 ^a

Различия между средними значениями, отмеченные разными буквами, статистически значимы при $P \leq 0.05$

продукта, имеющего максимум поглощения при длине волны 520 нм, согласно ранее описанной методике [7].

Количественное определение суммы флавоноидов в клеточной культуре в пересчете на рутин в

$$X\% = (C_{st} D_x V_1 V_3 \times 100 \times 100) / (D_{st} V_2 a \times (100 - h) \times 1000) \quad (4)$$

где D_x – оптическая плотность исследуемого раствора; D_{st} – оптическая плотность раствора стандартного образца; C_{st} – концентрация раствора стандартного образца, мг/мл; V_1 – объем элюата, мл; V_2 – объем исследуемого раствора, нанесенного на хроматограмму, мл; V_3 – объем экстрагента, мл; a – навеска, г; h – содержание влаги в растительном материале, %.

Для сравнения независимых выборок, подчиняющихся закону нормального распределения, использовали параметрический критерий Стьюдента. Значения t-критерия находили для 95% уровня значимости ($P \leq 0.05$). В статье использовано 3 биологических повторности (чашки Петри) по 9 каллусов, то есть по 27 каллусов на вариант. На рисунках представлены средние арифметические (M) биохимических параметров ($n = 9$) с двухсторонними доверительными интервалами ($M \pm 1.96 SEM$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристика клеточных культур, полученных на основе разных эксплантов

Клеточные культуры *S. orgaadayi*, полученные на основе разных эксплантов – семядолей и гипокотилей проростков, характеризовались разными темпами роста и имели разный уровень вторичных метаболитов. Ростовый индекс по сырой массе (РИ) семядольной линии клеточной культуры (СКК) колебался от 0.091 до 1.015 соответственно в течение периода от 5 до 25 суток субкультивирования. Максимальный прирост биомассы приходился на 10 сутки. РИ гипокотильной линии клеточной культуры (ГКК) изменялся от 0.271 до 2.420 в этот

исследуемом экстракте проводили согласно ранее описанной методике [15]. Метод основан на реакции комплексообразования с хлоридом алюминия в уксуснокислой среде с использованием спектрофотометрии (Genesys 10S UV–Vis, “ThermoScientific”, США) при длине волны 414 нм.

Количественное определение экдистерона в клеточной культуре. Навеску сухой массы клеточной культуры *S. orgaadayi* (10 г) экстрагировали в течение 12 ч при температуре 60°C 70% этиловым спиртом в соотношении 1 : 10 (м/л) с модификацией по Якубовой с соавт. [18]. Отфильтрованный экстракт упаривали до минимального объема. Разделение фракций осуществляли тонкослойной хроматографией на пластинках “Sorbfil UV-254”. После центрифугирования экстрактов сорбента измеряли оптическую плотность при длине волны 242 нм на фоне элюата холостого опыта (контроль). Расчет осуществляли по формуле:

же период культивирования. Максимальный прирост биомассы приходился на 20–25 сутки.

Исследование уровня вторичных метаболитов показало трехкратное превышение суммы флавоноидов у СКК по сравнению с ГКК, что соответствовало 0.026 ± 0.006 и 0.008 ± 0.002% к сухой массе (табл. 1). Определение экдистерон-подобных соединений установило, что у СКК их содержание составило 0.012 ± 0.001% от сухой массы, тогда как в ГКК отмечено двукратное увеличение уровня соединения этого типа – 0.029 ± 0.005% от сухой массы.

Влияние мелатонина и селена на рост клеточной культуры

СКК характеризовалась менее интенсивным приростом сырой массы в первые 5 суток субкультивирования (рис. 2а, 1), чем ГКК (рис. 2б, 1). В связи с этим РИ ГКК трехкратно превышал таковой у СКК. Затем темпы прироста сырой массы культур сохранялись приблизительно на одном уровне, но начиная с 20 суток, РИ ГКК увеличился в 2 раза.

Мелатонин оказывал 2.5-кратное увеличение РИ СКК на 10 сутки субкультивирования и поддерживал высокий уровень скорости роста на протяжении всего периода роста относительно контроля (рис. 2а, 2). При этом на 20 сутки, в период стационарной фазы роста контрольного варианта СКК (рис. 2а, 1), мелатонин 3-кратно увеличивал РИ. Стимулирующее действие мелатонина на РИ ГКК также проявлялось, начиная с 10 суток и поддерживалось на уровне 50, 30 и 50% соответственно на 10, 15 и 20 сутки относительно контроля. На 25 сутки мелатонин снижал интен-

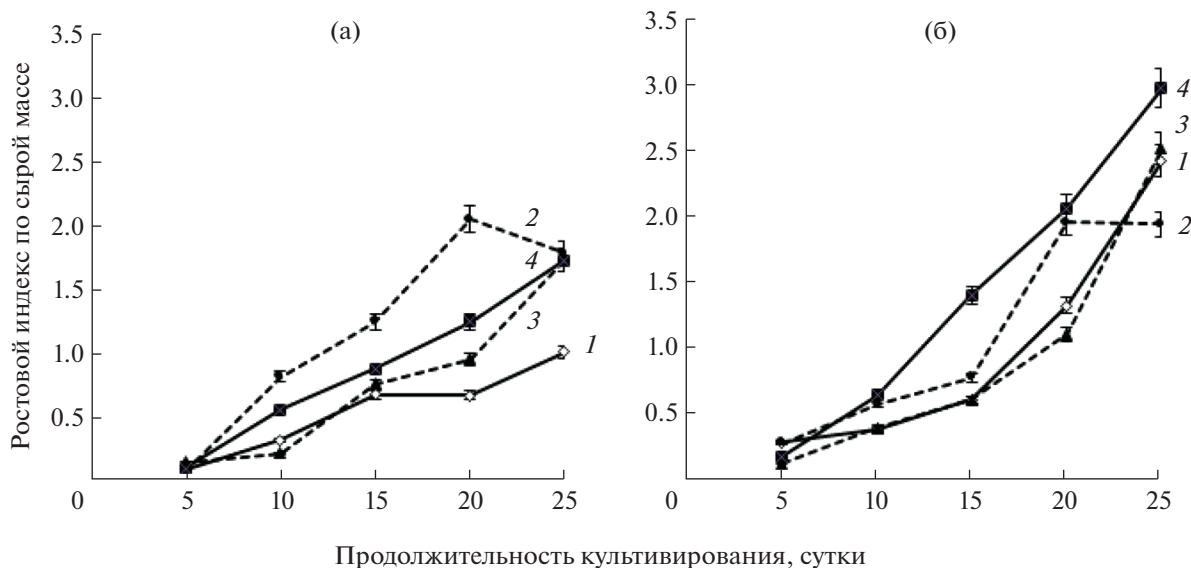


Рис. 2. Динамика ростового индекса по сырой массе каллусной культуры *S. orgaadayi* семейной (а) и гипокотильной (б) линий в зависимости от мелатонина (Мел), селенита натрия (SeO_3^{2-}) и их смеси: 1 – контроль, 2 – 0.1 пМ Мел, 3 – 1.0 нМ SeO_3^{2-} , 4 – 1.0 нМ SeO_3^{2-} + 0.1 пМ Мел.

сивность роста на 20% по сравнению с контролем (рис. 2б, 2).

Действие SeO_3^{2-} было эффективно в первые 5 суток и последние 20–25 суток субкультивирования СКК и соответственно составило 70% и 40–70% по сравнению с контролем (рис. 2а, 3). В то время как у ГКК на начальном этапе субкультивирования (5 сутки) отмечено 2-кратное торможение роста, а в последующем одинаковая с контролем динамика РИ (рис. 2б, 3).

Совместное действие мелатонина и SeO_3^{2-} увеличивало прирост РИ СКК в среднем в 1.7–2.0 раз относительно контроля (рис. 2а, 4), что было меньше эффективности мелатонина на 50% (10 и 15 сутки) и 100% (20 сутки). В то же время эффективность двух факторов у ГКК составила от 1.24 до 2.36 раз по сравнению с контролем, что было выше результативности действия мелатонина на РИ на 10% (10 и 20 сутки), 45% (25 сутки) и 112% (15 сутки) (рис. 2б, 4).

Цитологический анализ показал, что прирост биомассы клеточной культуры в процессе субкультивирования был обусловлен размерами клеток и их долей к общему количеству измеренных клеток. В общей массе отмацерированных клеток выделяли мелкие, средние и крупные клетки. К разряду “мелких” клеток относили клетки с меньшим объемом в пределах от 1 до 10 тыс. мкм^3 , к “средним” – клетки с объемом от 11 до 90 тыс. мкм^3 , и “крупным” – остальные клетки от 91 тыс. мкм^3 (например, до 600 тыс. мкм^3 на 20 сутки у ГКК).

В контрольном варианте СКК на 5 сутки отмечено максимальное число средних клеток (рис. 3в, С) и много мелких. На 10 сутки увеличивалась доля средних паренхимных клеток и размеры крупных клеток, на 20–25 сутки происходило увеличение доли крупных клеток и их размеров и отсутствие мелких клеток, что свидетельствовало о преимущественном растяжении (рис. 3а, 3в). Мелатонин увеличивал клеточное деление на 5 и 20 сутки по сравнению с контролем, поскольку возрастала доля мелких клеток. На 10–15 сутки увеличивался объем крупных клеток. SeO_3^{2-} увеличивал долю средних и крупных клеток на 5 сутки по сравнению с контролем, с последующим снижением доли средних и увеличением доли крупных клеток до 15 суток, однако на 25 сутки доля мелких клеток вновь увеличивалась. Совместное действие мелатонина и SeO_3^{2-} уменьшило долю мелких клеток в начальной стадии субкультивирования, но увеличило с 15 по 25 сутки, что отражалось на биомассе в этот период.

Прирост РИ ГКК, вероятно, был обусловлен увеличением размеров крупных клеток, начиная с 5 суток, при этом увеличивалась доля крупных клеток, по сравнению с СКК (рис. 3б, 3г). Существенный прирост РИ на 20 сутки был обусловлен увеличением размеров и доли крупных клеток. Мелатонин увеличивал долю средних клеток на 10–15 сутки, а в дальнейшем и крупных. SeO_3^{2-} увеличивал долю средних клеток и уменьшал объем клеток на 5 и 20 сутки, что обуславливало в эти сутки снижение прироста биомассы относительно

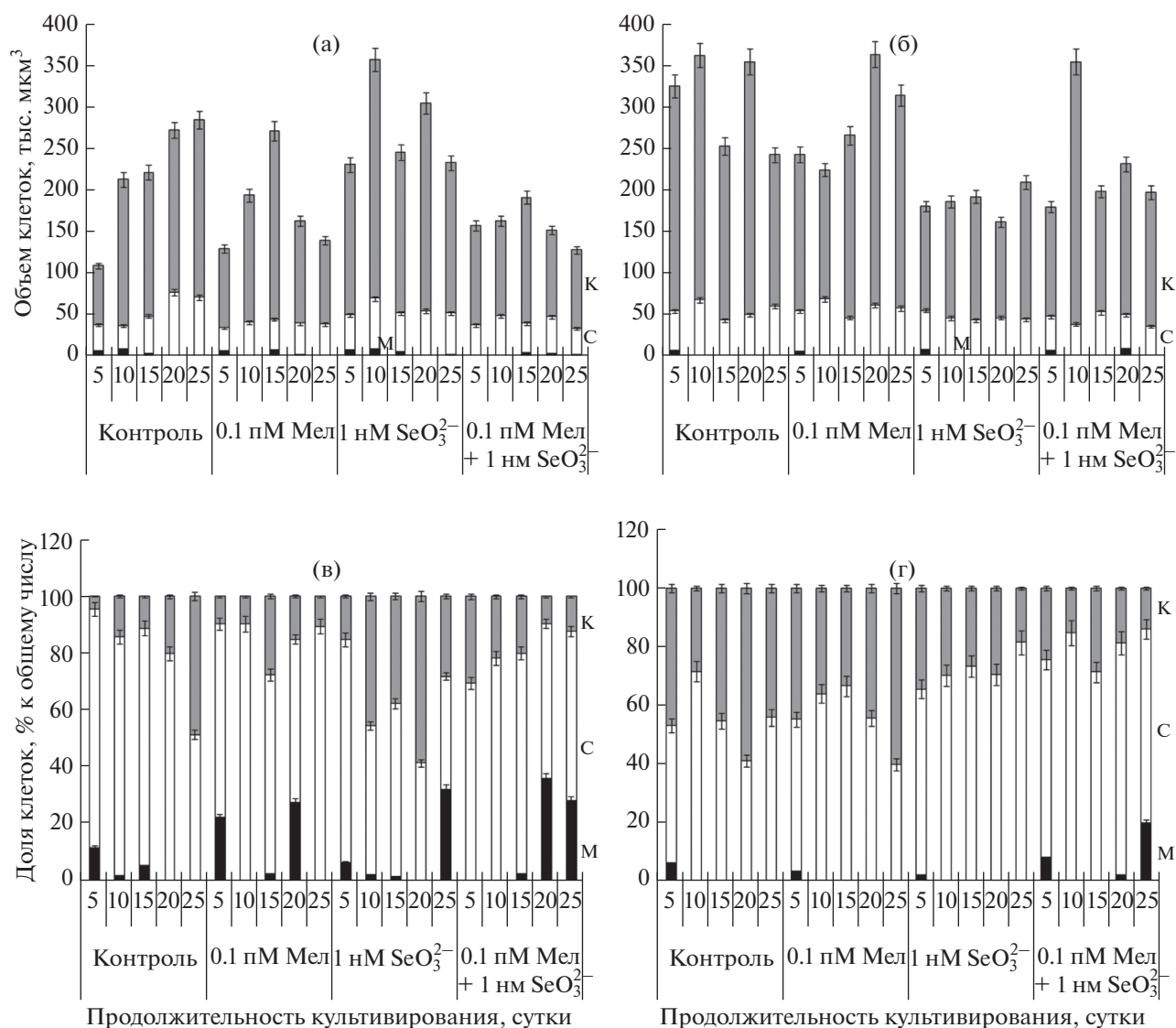


Рис. 3. Динамика размеров (а, б) и частоты встречаемости (в, г) клеток каллусной культуры *Saussurea orgaadayi* семядольной (а, в) и гипокотильной (б, г) линий в зависимости от мелатонина (Мел), селенита натрия (SeO₃²⁻) и их смеси: К – крупные клетки, М – мелкие клетки, С – средние клетки.

контроля. Совместное действие экзогенных факторов увеличивало долю мелких клеток на 5 сутки и индуцировало их образование на 20–25 сутки. Связано ли это с делением клеток или торможением их роста еще предстоит установить.

Влияние мелатонина и селенита натрия на интенсивность перекисного окисления липидов

Оценка окислительного статуса двух линий каллусных культур контрольного варианта показала накопление МДА в количестве 0.010 ± 0.002 и 0.023 ± 0.003 мкмоль/г сырой массы соответственно у СКК и ГКК линий, что свидетельствовало о разной интенсивности ПОЛ (рис. 4а). Дей-

ствие экзогенных факторов на культуру изменяло интенсивность ПОЛ. При обработке мелатонином данный показатель уменьшался на 64% у СКК и 30% у ГКК. В то же время SeO₃²⁻ был менее эффективным, чем мелатонин, удаление АФК составило 9% у первой культуры, и 17.4% – у второй (рис 4а). Совместное действие веществ обуславливало снижение интенсивности ПОЛ на 45% у СКК и 26% у ГКК.

Влияние мелатонина и селенита натрия на аккумуляцию пролина в клеточной культуре

Отмечена специфичность линий по содержанию пролина у контрольных вариантов. Наибольшее со-

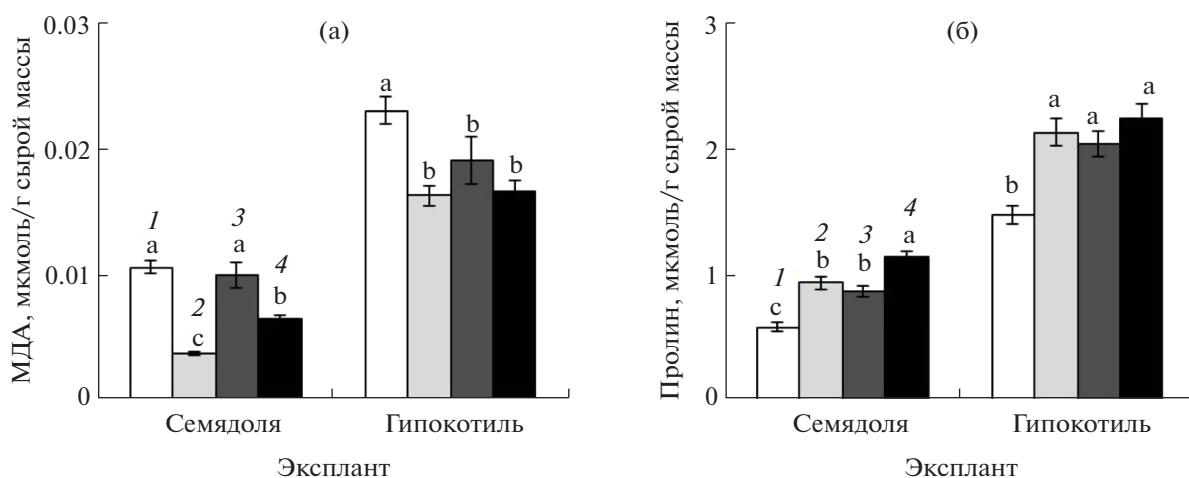


Рис. 4. Влияние мелатонина, селенита натрия и их смеси на содержание малонового диальдегида (а, МДА) и пролина (б) у калусной клеточной культуры двух линий на 25 сутки субкультивирования: 1 – контроль, 2 – 0.1 пМ мелатонин, 3 – 1.0 нМ SeO₃²⁻, 4 – 1.0 нМ SeO₃²⁻ + 0.1 пМ мелатонин. Различия между средними значениями, отмеченные разными буквами, статистически значимы при $P \leq 0.05$.

держание пролина (1.48 ± 0.06 мкмоль/г сырой массы) отмечено у ГКК по сравнению с СКК ($0.59 \pm \pm 0.02$ мкмоль/г сырой массы).

Действие экзогенных веществ повышало уровень пролина в клеточных культурах (рис. 4б). Мелатонин увеличивал пролин на 59% у СКК и 45% у ГКК. Эффективность SeO₃²⁻ была ниже и составила соответственно 49 и 39%. Совместное действие мелатонина и SeO₃²⁻ повышало уровень антиоксиданта. У СКК увеличение составило 93%, тогда как у ГКК – 52% относительно соответствующего контрольного варианта.

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате наших исследований установлено, что клеточные культуры *S. orgaadayi*, полученные на основе разных эксплантов (гипокотили, семядоли), имели разные скорости роста и биохимические параметры. Так, ГКК отличалась большими размерами клеток и большей скоростью роста РИ, по сравнению с СКК. Активно растущая ГКК характеризовалась на 25 сутки субкультивирования большим содержанием пролина (2.5-кратно) и экдистерон-подобных соединений (2.3-кратно), большей интенсивностью ПОЛ (2-кратно) и меньшим содержанием суммы флавоноидов (Фл). В то же время СКК, имеющая 3-кратно большее содержание Фл, характеризовалась меньшей интенсивностью ПОЛ (табл. 1), что согласовалось с известной антиоксидантной функцией Фл [19].

Концентрации экзогенного мелатонина, применяемые в представленном эксперименте, были выбраны на основе обнаруженной нами ранее до-

зо-зависимой эффективности индоламина при растяжении клеток coleoptiles пшеницы в присутствии экзогенной ИУК [4]. Было изучено действие экзогенных гормонов в диапазоне от 0.0001 до 1000 нМ. При комплексном влиянии мелатонин (Мел) оказал большее рост-стимулирующее действие в концентрации 0.1 пМ, чем в концентрации 1.0 мкМ. Увеличение концентрации мелатонина в смеси с ИУК (ИУК + 1.0 мкМ Мел) снижало их совместный эффект на 40 и 20% по сравнению с ИУК + 0.1 пМ Мел соответственно при концентрациях 0.1 и 1.0 мкМ ИУК. Кроме того, при выборе концентрации экзогенного мелатонина для регуляции роста клеточной культуры исходили из положения, что для жизнедеятельности меристематических клеток, которыми являются большинство клеток каллуса в начале субкультивирования, требуются низкие концентрации веществ. В связи с этим было опробовано действие мелатонина в сверхнизких концентрациях 0.001 и 0.1 пМ. Клеточные культуры, выращиваемые на МС-среде с мелатонином, на протяжении всего времени субкультивирования оставались однородного светло-желтого цвета, что свидетельствовало об отсутствии некротических явлений (рис. 1г, д). Наиболее эффективной была среда с 0.1 пМ мелатонином (рис. 1д), что определило ее дальнейшее использование в ходе эксперимента.

Длительное сохранение жизнедеятельности клеток могло быть обусловлено антиоксидантными свойствами мелатонина, удаляющего свободные радикалы (гидроксильный радикал, оксид азота, пероксинитрит) [2], тем самым, поддерживая функционирование структурных компонентов клеток и задерживая старение [20]. В работе Zhao с

соавт. [20] установлено, что предварительная обработка каллусов *Rhodiola crenulata* мелатонином перед криоконсервацией улучшает выживаемость каллусов и защищает их ткани от окислительного повреждения.

Анализ динамики ростового индекса двух культур горькуши контрольных вариантов показал, что ГКК отличалась от СКК более продолжительным и активным ростом, кривая РИ к 25 суткам не выходила на плато. Действие мелатонина повышало темпы роста клеточных культур. Особенно наглядно показана активация роста РИ у СКК на 20 сутки (рис. 2а, 2), что совпадало по времени с периодом стационарной фазы в кинетике РИ у контрольного варианта СКК (рис. 2а, 1).

Выход на плато кривой РИ СКК и замедление прироста биомассы под влиянием мелатонина с 20 по 25 сутки (рис. 2а, 2) зависели от изменения роста клеток, прежде всего преобладающего растяжения более мелких клеток (рис. 3в, М), при котором увеличивалась доля средних клеток за счет уменьшения доли мелких клеток (рис. 3в, С, М), таким образом, несмотря на растяжение клеток, они оказывали меньший вклад в общую биомассу культуры. У ГКК стабильный прирост РИ с 20 по 25 сутки (рис. 2б, 2) под влиянием мелатонина сопровождался увеличением доли крупных клеток (рис. 3г, К) за счет уменьшения доли клеток среднего класса (рис. 3г, С) и уменьшения среднего объема крупной клетки (рис. 3б, К).

Клеточные культуры отличались по чувствительности к SeO_3^{2-} . Культура с большим ростовым потенциалом (ГКК), которая в норме (контроле) формировала более крупные клетки, уменьшала размеры крупных клеток под действием SeO_3^{2-} . В то же время СКК с меньшим объемом крупных клеток в присутствии SeO_3^{2-} увеличивала размеры клеток этой группы.

Для растений пролин является метаболитом, обладающим осмопротекторными и антиоксидантными свойствами [21, 22]. Экзогенные мелатонин и селенит натрия увеличивали уровень пролина в клеточных культурах, который мог обуславливать снижение их окислительного статуса, поскольку наблюдали отрицательную связь между уровнем пролина (рис. 4б) и уровнем интенсивности ПОЛ (рис. 4а). Другими авторами показано, что увеличение внутриклеточной концентрации пролина изменяло редокс-баланс и активность супероксиддисмутазы (SOD) и аскорбатпероксидазы (APX) у клеток суспензионной культуры *Thellungiella salsuginea* [22]. В условиях окислительного стресса, вызванного действием H_2O_2 , в культуре клеток *Th. salsuginea* экзогенный пролин способствовал снижению уровня ПОЛ и повышению количества живых клеток. Экзогенный пролин в присутствии H_2O_2 повышал актив-

ность APX и общую активность SOD в клеточной культуре. По аналогии с данными других авторов [22] повышение уровня пролина в клеточной культуре горькуши можно рассматривать как один из механизмов проявления антиоксидантных свойств экзогенных факторов. Но поскольку уровень пролина повышался приблизительно одинаково, то отличия по интенсивности ПОЛ могли быть обусловлены другими свойствами молекул мелатонина и SeO_3^{2-} . Например, известно, что мелатонин сам обладает высокой антиоксидантной активностью, поскольку и он и его продукты окисления являются антиоксидантами [23]. Они действуют как естественные доноры электронов. Мелатонин, генерируя каскад радикалов — продуктов окисления, таких как β -гидрокси-мелатонин, циклический β -гидрокси-мелатонин или циклический мелатонин и *N1*-ацетил-*N2*-формил-5-метоксикинурамин, вносит свой вклад в дальнейшую ликвидацию АФК. В связи с этим, подобная способность делает мелатонин эффективным в защите клетки от окислительного стресса даже в малых дозах. Кроме того, мелатонин увеличивает активность SOD и гваякол-пероксидазы [7]. Селен в низких концентрациях увеличивает активность SOD, каталазы, APX и глутатион-редуктазы, содержание аскорбата [13, 14, 24]. Антиоксидантные свойства SeO_3^{2-} могут проявляться также через его способность регулировать вторичный метаболизм растений, увеличивая уровень антиоксидантов Фл [14].

Проявление осмопротекторной роли пролина наблюдалось у СКК и ГКК при увеличении РИ (рис. 2а, б) в процессе их культивирования. Большему уровню пролина в контрольном варианте ГКК соответствовал и больший прирост биомассы по сравнению с СКК. О важной роли пролина в увеличении биомассы каллуса и суспензионной культуры (свежей и сухой массы) отмечали и другие авторы [21].

Особенности роста клеток каллусных культур могли быть связаны с динамикой метаболизма пролина, поскольку известно, что он играет важную роль в регуляции общего синтеза белка и клеточного цикла растительной клетки [25]. У мутанта *pro1* кукурузы с нарушенным ферментом Pro1 (P5CS2), катализирующим синтез пролина из глутамата в цитозоле, отмечают дефицит пролина, снижение экспрессии генов циклинов и других генов, связанных с клеточным циклом, остановку клеточного цикла при переходе от фазы G1 к S и подавление пролиферации клеток. Из этого следует, что наибольший прирост биомассы ГКК по сравнению с СКК в нашем эксперименте, вероятно, был обусловлен большим уровнем пролина, который мог выступать источником азота и энергии, поскольку в митохондриях происходит

его разложение до глутамата с высвобождением энергии в форме $FADH_2$ и $NAD(P)H$.

Эффективность действия мелатонина на уровень МДА (снижение интенсивности ПОЛ) у СКК составила 64%, что в 2 раза выше, чем у ГКК (рис. 4а, 2). Это могло быть связано с повышением других антиоксидантов, например, Фл, как это показано для культуры клеток *Fagonia indica* [26].

В тоже время SeO_3^{2-} оказывал существенно меньший эффект в регуляции интенсивности ПОЛ у СКК по сравнению с мелатонином. Торможение интенсивности ПОЛ у ГКК под действием SeO_3^{2-} составило 17.5%, что в 2 раза эффективнее, чем у СКК. Совместное действие экзогенных факторов уменьшало интенсивность ПОЛ, но с меньшей эффективностью, чем отдельно действующий мелатонин, у СКК и равной эффективностью мелатонину у ГКК. Следует ожидать, что подобные эффекты SeO_3^{2-} и смеси веществ связаны с активацией метаболических процессов, вызывающих увеличение продукции АФК.

В клеточной культуре *S. orgaadayi*, выросшей в темноте, исключено образование АФК хлоропластами. Наиболее вероятными производителями АФК являются митохондрии, в которых основными местами для генерации O_2^- служат комплекс I, убихинон и комплекс III электрон-транспортной цепи [27]. В связи с этим интенсивность ростовых процессов клеток зависит от согласованности их с функционированием органелл и антиоксидантных защитных систем, среди которых называют SOD, полифенолы, аскарбат, глутатион, фураностаноловые гликозиды, удаляющих супероксид анион [2, 28]. Мелатонин может изменять интенсивность метаболических процессов, прежде всего дыхания, поскольку Wan с соавт. [29] обнаружили, что этот индоламин вызывает изменения в профилях экспрессии генов, связанных с гликолизом, циклом трикарбонных кислот, циклом глиоксиловой кислоты, метаболизмом первичного азота и катаболизмом нескольких ключевых аминокислот.

Различия в антиоксидантном действии мелатонина и SeO_3^{2-} могли быть связаны также с их влиянием на разные пути утилизации альдегидов. Волковой с соавт. [28] показана зависимость физиологического состояния клеток суспензионной культуры диоскореи дельтовидной от их антиоксидантного статуса. В процессе культивирования клеток альдегиддегидрогеназный путь с максимумом на 14 сутки преобладал над альдегидредуктазным.

Анализируя активность мелатонина и SeO_3^{2-} , необходимо также помнить, что при культивировании каллусной культуры в питательную среду добавляли экзогенные фитогормоны ауксин (3.6 мкМ 2,4 Д) и

цитокинин (2.2 мкМ 6-БАП). Действие дополнительных факторов накладывает отпечаток на их функционирование. Ранее нами показано взаимодействие мелатонина и ИУК в регулировании роста отмытых от фитогормонов этиолированных колеоптилей пшеницы [4]. Мелатонин усиливал эффективность действия экзогенной ИУК на растяжение клеток. Другими авторами также установлено, что комбинация мелатонина и ауксина (нафтилуксусной кислоты) увеличивала накопление биомассы в больших количествах, чем один мелатонин [30]. При этом совместное действие этих веществ повышало содержание общего белка и протеазную активность в культурах *Prunella vulgaris* L. (Selfheal). Взаимодействие мелатонина и ИУК в ходе регуляции ростовых процессов проявляется также через изменение экспрессии генов, контролируемых модификацию и рост клеточной стенки, транспорт и гомеостаз ИУК [5].

Наблюдения за ростом клеток разных линий клеточных культур *S. orgaadayi* показали, что мелатонин увеличивает объем клеток на начальных этапах субкультивирования (5, 15 сутки) у СКК и на последних этапах (20–25 сутки) – у ГКК. Действие мелатонина поддерживает на высоком уровне РИ, что свидетельствует об активности ростовых процессов клеточной культуры. Следовательно, если мелатонин может выполнять рост-регулирующие функции, то он может быть использован вместе с ИУК при культивировании клеток.

Таким образом, нами показано, что экзогенный мелатонин увеличивал РИ по сырой массе у обеих культур до 20 суток, тогда как SeO_3^{2-} повышал РИ у СКК на 20–25 сутки и не менял его у ГКК по сравнению с контролем. Совместное действие факторов повышало РИ, начиная с 15 суток больше у ГКК, чем у СКК. Мелатонин и селенит натрия регулировали функционирование антиоксидантной системы в клетке. Мелатонин понижал интенсивность ПОЛ и повышал содержание пролина у обеих линий. Действие SeO_3^{2-} было менее эффективным, чем мелатонина. Совместное действие факторов на интенсивность ПОЛ снижалось, а на содержание пролина повышалось относительно действия мелатонина у СКК, тогда как у ГКК эффективность действия комбинации факторов совпадала с эффективностью мелатонина. Высказано предположение о дифференцированном изменении дыхания клеточной культуры, как источника АФК, под действием мелатонина и SeO_3^{2-} .

Статья написана в рамках научного проекта, выполненного при поддержке Программы повышения конкурентоспособности ТГУ.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-

либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Arnao M.B., Hernandez-Ruiz J. Melatonin and its relationship to plant hormones // *Ann. Bot.* 2018. V. 121. P. 195.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcx114>
2. Arnao M., Hernández-Ruiz J. Melatonin and reactive oxygen and nitrogen species: a model for the plant redox network // *Melatonin Research.* 2019. V. 2 (3). P. 152.
<https://doi.org/10.32794/11250036>
3. Wei J., Li D.X., Zhang J.R., Shan C., Rengel Z., Song Z.B., Chen Q. Phyto-melatonin receptor PMTR1-mediated signaling regulates stomatal closure in *Arabidopsis thaliana* // *J. Pineal Res.* 2018. V. 65. e12500.
<https://doi.org/10.1111/jpi.12500>
4. Головацкая И.Ф., Бойко Е.В., Карначук Р.А. Роль мелатонина в регуляции ИУК-зависимых реакций растений в разных условиях освещения // *Вестн. Томск. гос. унив. Биол.* 2017. № 37. С. 144.
<https://doi.org/10.17223/19988591/37/8>
5. Weeda S., Zhang N., Zhao X., Ndip G., Guo Y., Buck G.A., Fu C., Ren S. *Arabidopsis* transcriptome analysis reveals key roles of melatonin in plant defense systems // *PLoS ONE.* 2014. V. 9. e93462.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093462>
6. Холодова В.П., Васильев С.В., Ефимова М.В., Воронин П.Ю., Рахманкулова З.Ф., Данилова Е.Ю., Кузнецов Вл.В. Экзогенный мелатонин защищает растения рапса от токсического действия избытка меди // *Физиология растений.* 2018. Т. 65. С. 463.
<https://doi.org/10.1134/S0015330318060088>
7. Бойко Е.В., Головацкая И.Ф., Бендер О.Г., Плюснин И.Н. Влияние кратковременной корневой обработки мелатонином на фотосинтез листьев огурца // *Физиология растений.* 2020. Т. 67. С. 196.
<https://doi.org/10.1134/S0015330320020037>
8. Zheng X., Tan D.X., Allan A.C., Zuo B., Zhao Y., Reiter R.J., Wang L., Wang Z., Guo Y., Zhou J., Shan D., Li Q., Han Z., Kong J. Chloroplastic biosynthesis of melatonin and its involvement in protection of plants from salt stress // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. 41236.
<https://doi.org/10.1038/srep41236>
9. Tan D.-X., Manchester L.C., Qin L., Reiter R.J. Melatonin: a mitochondrial targeting molecule involving mitochondrial protection and dynamics // *Int. J. Mol. Sci.* 2016. V. 17. P. 2124.
<https://doi.org/10.3390/ijms17122124>
10. Красная книга Республики Алтай. Растения. / Под ред. А.Г. Манеев (гл. редактор), А.А. Ачимова, Н.В. Седельникова, И.А. Горбунова – г. Горно-Алтайск: ООО Горно-Алтайская типография, 2017. 272 с.
11. Погодин И.С., Лукша Е.А., Предейн Н.А. Химический состав рода *Saussurea* DC., произрастающих на территории Сибири // *Химия растительного сырья.* 2014. № 3. С. 43.
<https://doi.org/10.14258/jcprm.1403043>
12. Головацкая И.Ф., Володина Н.А. Регуляция роста и вторичного метаболизма клеточной культуры *Saussurea orgaadayi* 28-гомобраассинолидом и селеном // *Известия Самарского научного центра РАН.* 2013. Т. 15. № 3 (5). С. 1591.
http://www.ssc.smr.ru/media/journals/izvestia/2013/2013_3_1591_1595.pdf
13. Djanaguiraman M., Devi D.D., Shanker A.K., Sheeba J.A., Bangarusamy U. Selenium – an antioxidative protectant in soybean during senescence // *J. Plant Soil.* 2005. V. 272. P. 77.
[https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(15\)61201-1](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(15)61201-1)
14. Головацкая И.Ф., Кулагина Ю.М., Павлова Д.Г., Карначук Р.А. Влияние селена на морфогенез и биохимические параметры растений *Triticum aestivum* L. в зависимости от селективного света // *Агробиология.* 2013. № 5. С. 58.
15. Головацкая И.Ф., Бойко Е.В., Видершпан А.Н., Лантев Н.И. Возрастные морфофизиологические и биохимические изменения у растений *Lactuca sativa* L. под влиянием селена и света разной интенсивности // *Сельскохозяйственная биология.* 2018. Т. 53. № 5. С. 1025.
<https://doi.org/10.15389/agrobiology.2018.5.1025rus>
16. Карначук Р.А., Лихачева А.В. Питательная среда для культивирования клеточной культуры *Saussurea orgaadayi* V. Khan. Et Krasnov. / Пат. 2428472 РФ; ГОУ ВПО ТГУ – № 2010118803; заявл. 05.11.2010; опубл. 09.10. 2011, Бюл. 25 – 6 с.
17. Целникер Ю.Л. Физиологические основы теневыносливости древесных растений. М.: Наука, 1978. 212 с.
18. Якубова М.Р., Генкина Г.Л., Шакиров Т.Т., Абубакиров Н.К. Хроматоспектрофотометрический метод определения экидистерона в растительном сырье // *Химия природных соединений.* 1978. № 6. С. 737.
19. Zhang N., Sun Q.Q., Li H.F., Li X.S., Cao Y.Y., Zhang H.J., Li S.T., Zhang L., Qi Y., Ren S.X., Zhao B., Guo Y.D. Melatonin improved anthocyanin accumulation by regulating gene expressions and resulted in high reactive oxygen species scavenging capacity in cabbage // *Front. Plant Sci.* 2016. V. 7. Art. 222.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00197>
20. Zhao Y., Qi L.W., Wang W.M., Saxena P.K., Liu C.Z. Melatonin improves the survival of cryopreserved callus of *Rhodiola crenulata* // *J. Pineal Res.* 2011. V. 50 (1). P. 83.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2010.00817.x>
21. Gupta P., Sharma S., Saxena S. Biomass yield and steviol glycoside production in callus and suspension culture of *Stevia rebaudiana* treated with proline and polyethylene glycol // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2015. V. 176 (3). P. 863.
<https://doi.org/10.1007/s12010-015-1616-0>
22. Сошинкова Т.Н., Радюкина Н.Л., Королькова Д.В., Носов А.В. Проллин и функционирование антиоксидантной системы растений и культивируемых клеток *Thellungiella salsuginea* при окислительном стрессе // *Физиология растений.* 2013. Т. 60. С. 47.
<https://doi.org/10.7868/S0015330313010090>
23. Salehi B., Sharopov F., Fokou P.V.T., Kobylinska A., de Jonge L., Tadio K., Sharifi-Rad J., Posmyk M.M., Martorell M., Martins N., Iriti M. Melatonin in medici-

- nal and food plants: occurrence, bioavailability, and health potential for humans // *Cells*. 2019. V. 8 (7). P. 681.
<https://doi.org/10.3390/cells8070681>
24. *Sharma S., Kaur N., Kaur S., Nayyar H.* Ascorbic acid reduces the phytotoxic effects of selenium on rice (*Oryza sativa* L.) by up-regulation of antioxidative and metal-tolerance mechanisms // *J. Plant Physiol. Pathol.* 2014. V. 2. P. 3.
<https://doi.org/10.4172/2329-955X.1000128>
25. *Wang G., Zhang J., Wang G., Fan X., Sun X., Qin H., Xu N., Zhong M., Qiao Z., Tang Y., Song R.* Proline responding1 plays a critical role in regulating general protein synthesis and the cell cycle in maize // *The Plant Cell*. 2014. V. 26 (6). P. 2582.
<https://doi.org/10.1105/tpc.114.125559>
26. *Khan T., Ullah M.A., Garros L., Hano C., Abbasi B.H.* Synergistic effects of melatonin and distinct spectral lights for enhanced production of anti-cancerous compounds in callus cultures of *Fagonia indica* // *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*. 2019. V. 190. P. 163.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.10.010>
27. *Gill S.S., Tuteja N.* Reactive oxygen species and anti-oxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants // *Plant Physiol. Biochem.* 2010. V. 48 (12). P. 909.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
28. *Волкова Л.А., Урманцева В.В., Бургутин А.Б., Носов А.М.* Чувствительность антиоксидантного статуса растительных клеток к действию фураностаноловых гликозидов // *Физиология растений*. 2016. Т. 63. С. 804.
<https://doi.org/10.7868/S0015330316060154>
29. *Wan J., Zhang P., Wang R., Sun L., Ju Q., Xu J.* Comparative physiological responses and transcriptome analysis reveal the roles of melatonin and serotonin in regulating growth and metabolism in *Arabidopsis* // *BMC Plant Biology*. 2018. V. 18. P. 362.
<https://doi.org/10.1186/s12870-018-1548-2>
30. *Fazal H., Abbasi B.H., Ahmad N., Ali M.* Exogenous melatonin trigger biomass accumulation and production of stress enzymes during callogenesis in medicinally important *Prunella vulgaris* L. (Selfheal) // *Physiol. Mol. Biol. Plants*. 2018. V. 24 (6). P. 1307.
<https://doi.org/10.1007/s12298-018-0567-7>