



УДК 581.143.6.04

© 1993 Т. П. Бычкова, Е. В. Наненина,  
В. Б. Берзин, А. И. Мирошников

### ВЛИЯНИЕ ЖАСМОНОВОЙ КИСЛОТЫ И 12-ОКСО-ФИТОДИЕНОВОЙ КИСЛОТЫ НА БИОСИНТЕЗ ШИКОНИНА В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК *Arnebia euchroma*

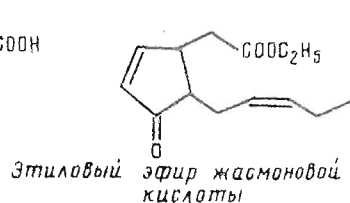
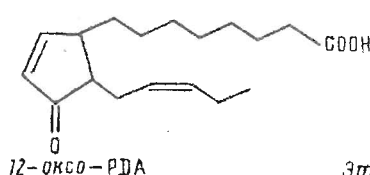
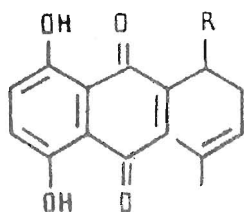
Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

Изучено влияние жасмоновой и 12-оксо-фитодиеновой кислот на биосинтез шиконина в культуре клеток *Arnebia euchroma*. Показано, что при концентрации жасмоновой кислоты 0,1 мМ количество шиконина увеличивается в 12 раз, а при концентрации 12-оксо-PDA 0,01 мМ — в 8 раз по отношению к контролю.

Метаболические изменения растений, вызванные поражающими факторами, приводят к образованию фитоалексинов [1, 2]. Накоплению фитоалексинов предшествует активация ферментов вторичного метаболизма [3, 4]. Исследования показывают, что эти ферменты образуются *de novo* в результате активации генов после восприятия определенных межклеточных сигналов [4, 5]. В последние годы выявлены вещества, получившие название элиситоров, которые обладают такими сигнальными свойствами. Полагают, что жасмоновая кислота [6] и ее биосинтетический предшественник 12-оксо-PDA [7], имеющие структурное сходство с простагландинами млекопитающих [8], представляют собой универсальные сигнальные вещества для клеточных культур ряда растений.

Целью настоящей работы является изучение влияния жасмоновой кислоты и 12-оксо-PDA на биосинтез шиконина — ацильного производного 5,8-дигидрокси-2-(1-гидрокси-4-метил-3-пентенил)-1,4-нафтохинона, вторичного метаболита, широко используемого в качестве пищевого красителя и косметического средства. Интересно было выяснить, с одной стороны, является ли шиконин фитоалексином для растений семейства Boraginaceae, а с другой — может ли жасмоновая кислота иметь практическое значение при промышленном культивировании клеток растений, синтезирующих шиконин. Ранее было показано, что наряду с культурой клеток *Lithospermum erythrorhizon*, промышленное культивирование которых известно, источником шиконина может быть каллусная культура *Arnebia euchroma*, также интенсивно синтезирующая ацильные производные шиконина [9].

Для получения предшественника жасмоновой кислоты — 12-оксо-PDA — мы



Сокращения: 12-оксо-PDA — 12-оксо-фитодиеновая кислота.

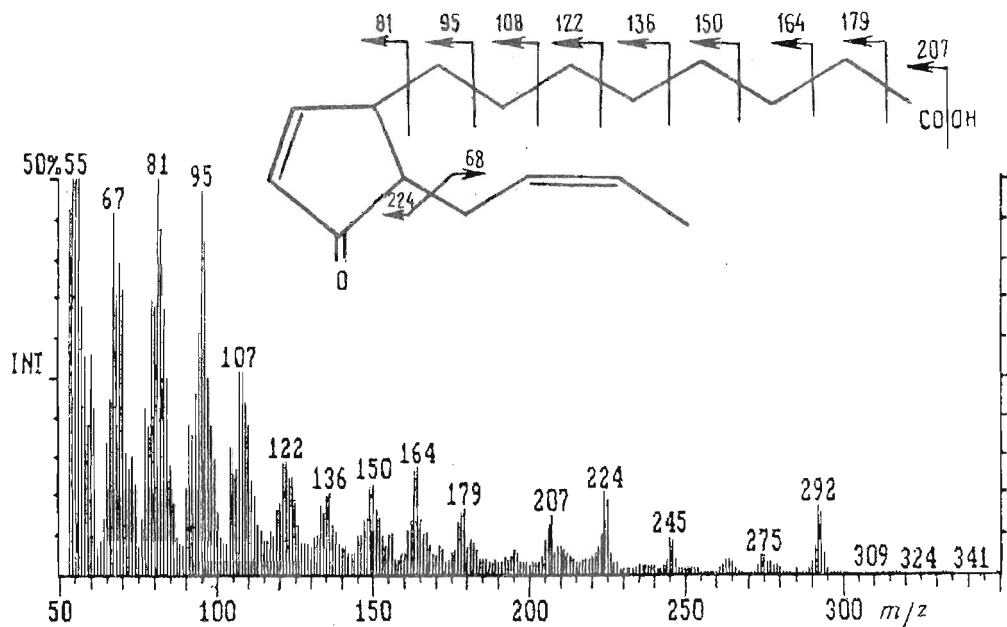


Рис. 1. Масс-спектр 12-оксо-PDA

воспользовались методикой окисления линоленовой кислоты липоксигеназой из семени льна [10]. При обработке линоленовой кислоты ацетоновым порошком из семени льна была получена смесь продуктов окисления, которую разделяли с помощью препаративной ТСХ на силикагеле. Идентификацию продуктов проводили с помощью масс-спектрометрии. В масс-спектре 12-оксо-PDA присутствуют пики молекулярного иона ( $m/z$  292) и фрагментов, обусловленных отщеплением гидроксильной группы ( $m/z$  275) или алкильного заместителя при C13 (распад по карбонильной группе) с миграцией протона к заряженной частице ( $m/z$  224). Образование ряда последующих ионов ( $m/z$  207, 179, 95, 81) обусловлено расщеплением карбоксилсодержащего фрагмента замещенного циклопентанона (рис. 1), причем такое расщепление по  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ -связям алкильной цепи ( $m/z$  164, 150, 136, 122, 108) сопровождается миграцией протона к карбоксильной группе. В спектре также присутствует характерный для циклических кетонов максимальный по интенсивности пик иона с  $m/z$  55 и пик с  $m/z$  67, соответствующий депротонированному пентадиеновому фрагменту, образующемуся при распаде алкенильной цепи C13—C18 молекулы кислоты.

При хроматографическом разделении продуктов биотрансформации линоленовой кислоты липоксигеназой из семени льна выделен еще ряд соединений, структура которых устанавливается с параллельным исследованием этих соединений на элиситорную активность.

В отличие от корней интактного растения, где преимущественно накапливается изобутил- и диметилакрилшиконин, культура клеток *A. euchroma* синтезирует в основном ацетилшиконин, а также производные бензохинона (эхинофуран II). В настоящей работе основное внимание уделено накоплению производных шиконина, так как только их концентрация определялась после щелочного омыления хлороформных экстрактов.

Введение спиртового раствора жасмоновой кислоты в концентрациях от  $10^{-2}$  до  $10^2$  мкМ в суспензионную культуру клеток *A. euchroma* вызывало резкое увеличение биосинтеза шиконина, определяемого спектрофотометрически после омыления ацильных производных 0,1 н. раствором NaOH (рис. 2).

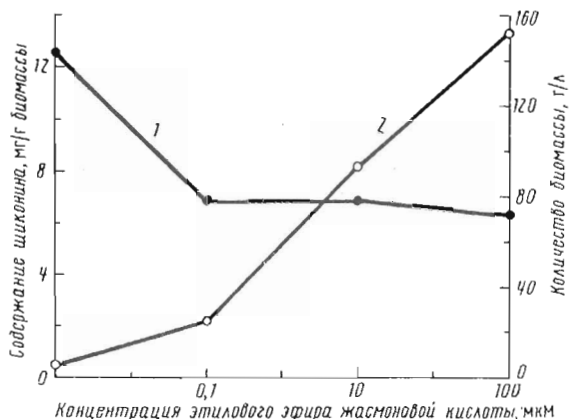


Рис. 2. Зависимость роста культуры (1) и содержания шиконина в клетках (2) от концентрации в среде этилового эфира жасмоновой кислоты. Время инкубации 132 ч

Как уже было отмечено, жасмоновая кислота ингибирует рост корней некоторых видов растений [11]. Мы исследовали ее влияние на рост культуры клеток *A. eichroma* в период времени с 60 до 132 ч после обработки элиситором. Ингибирующий эффект наблюдается уже при концентрации этилового эфира жасмоновой кислоты 10 мкМ. Увеличение биосинтеза шиконина происходило и при использовании в качестве элиситора предшественника жасмоновой кислоты — 12-оксо-PDA. Эффекты, полученные при обработке культуры этиловым эфиром жасмоновой кислоты и 12-оксо-PDA в достаточно низких концентрациях ( $10^{-1}$ — $10^2$  мкМ), соизмеримы и для концентрации 10 мкМ соответствуют примерно 10-кратному увеличению биосинтеза шиконина (рис. 3). Можно предполагать, что в культуре клеток 12-оксо-PDA превращается в жасмоновую кислоту, которая и обуславливает активацию генов.

Ингибирование роста клеток 12-оксо-PDA по сравнению с жасмоновой кислотой той же концентрации выражено слабее. Таким образом, в культуре клеток арнебии, как и в ряде других культур, жасмоновая кислота или 12-оксо-PDA стимулируют биосинтез вторичных метаболитов, в данном случае шиконина. Как уже было показано ранее на ряде культур, накопление в клетке жасмоновой кислоты при действии различного типа элиситоров или же ее эндогенное внесение в культуру клеток раувольфии, петрушки и других растений [6] непосредственно влияет на активность ферментов фенилпропанового метаболизма, в том числе и на активность фенилаланил-аммоний-лиазы (FAL). Этот фермент — один из определяющих в биосинтезе шиконина и его производных, протекающем по шикиматному пути [12]. Полученные результаты согласуются с установленной прежде корреляцией между скоростью синтеза шиконина культурой клеток *Lithospermum eritorizon* и активностью FAL [13]. Проводимые исследования могут найти широкое применение в крупномасштабном производстве шиконина.

### Экспериментальная часть

**12-Оксо-фитодиеновая кислота.** Измельченные в порошок семена льна обрабатывали 30 мин ацетоном при  $-10^{\circ}\text{C}$ . Высушенный порошок (2 г) экстрагировали 45 мин 20 мл 0,05 М калий-фосфатного буфера, pH 7,0, при  $4^{\circ}\text{C}$ . Экстракт центрифугировали 15 мин при 12 000 об/мин. 10 мл полученного экстракта и 20 мл 8 мМ раствора линоленовой кислоты, приготовленного по известному методу [14], прибавляли к 400 мл 0,05 М калий-фосфатного буфера, pH 7,0. После перемешивания в течение 90 мин при  $25^{\circ}\text{C}$  в реакционную смесь прибавляли 300 мл  $\text{CHCl}_3$  — MeOH (2 : 1) и доводили 1 М лимонной кислотой до pH 3,0. Реакцию проводили 30 мин в атмосфере азота. По окончании реакции

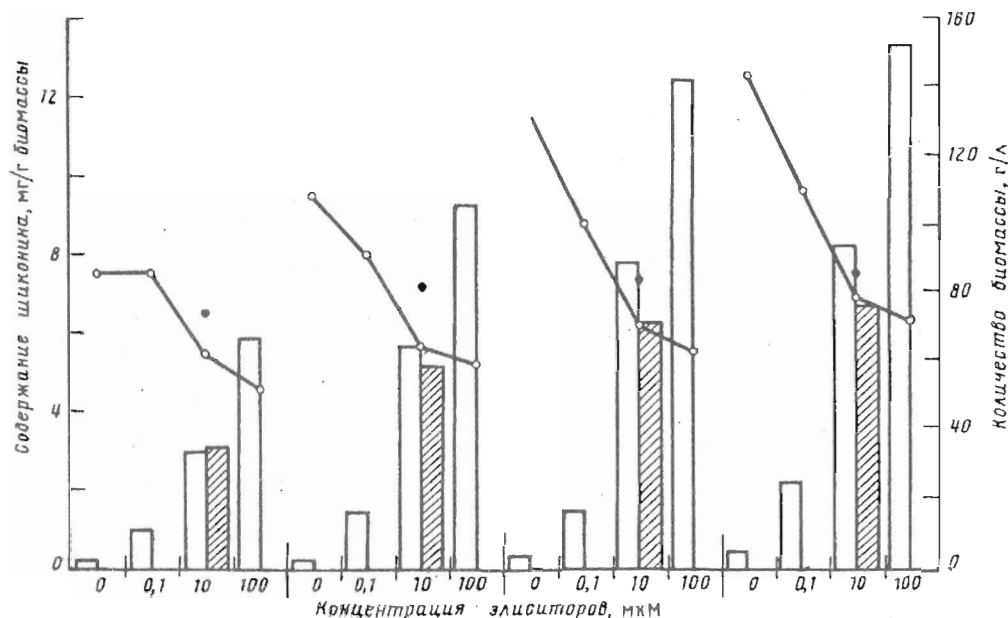


Рис. 3. Зависимость роста культуры (столбцы) и содержания шиконина (точки) в клетках от наличия в среде 10 мкМ 12-оксо-PDA (заштрихованные столбцы, черные точки) или этилового эфира жасмоновой кислоты в концентрации 0—100 мкМ (светлые столбцы, светлые точки). Приведенные данные получены через 60 (а), 84 (б), 108 (в), 132 ч (г) культивирования

в колбу приливали 200 мл хлороформа, через 1,5 ч органическую фазу декантировали и сушили, пропуская через колонку с безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Растворитель упаривали при  $40^\circ\text{C}$ , остаток растворяли в 2 мл эфира и разделяли с помощью ТСХ на силикагеле (Merck) в системе растворителей хлороформ — уксусная кислота (50 : 1). Элюированная диэтиловым эфиром 12-оксо-PDA ( $R_f$ , 0,66) идентифицирована на масс-спектрометре МАТ-44 (Finnigan, Германия). Вид ионизации — электронный удар с энергией 70 эВ.

Культуру клеток получали из меристем спящих почек в 1987 г. [9]. Выращивание проводили на модифицированной среде Мурасиге и Скуга [15], содержащей  $10^{-5}$  М кинетин и  $10^{-6}$  М индолилуксусную кислоту. Суспензию культивировали в темноте на качалке (90 об/мин) при  $25^\circ\text{C}$  в плоскодонных колбах емкостью 250 мл, содержащих 50 мл питательной среды.

**Обработка культуры этиловым эфиром жасмоновой кислоты или 12-оксо-PDA.** К каждой порции, содержащей по 50 мл 6-дневной суспензионной культуры *A. eichroma* с равным количеством посевного инокулята, прибавляли по 100 мкл спиртовых растворов этилового эфира жасмоновой кислоты (Serva) в концентрациях  $10^{-2}$ ,  $10^{-1}$ , 1, 10,  $10^2$  мкМ или 12-оксо-PDA в концентрации 10 мкМ. Контрольные клетки обрабатывали равным количеством (100 мкл) этанола. В период инкубации с 60 по 132 ч каждые 24 ч отбирали пробы культуры для анализа на содержание шиконина. Обработку результатов проводили по трем независимым опытам.

**Количественное определение шиконина в суспензионной культуре тканей *A. eichroma*.** К 5 г отфильтрованной культуры ткани с влажностью 95 % приливали 100 мл этанола, смесь подкисляли до pH 2,0 раствором  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Экстракцию проводили 2 ч при перемешивании. К отфильтрованному супернатанту прибавляли последовательно по 100 мл хлороформа и воды. Смесь интенсивно перемешивали 5 мин. Хлороформный слой отделяли и экстрагировали 20 мл 0,1 н. раствора КОН при перемешивании. Водный слой отделяли, а хлороформный вновь экстрагировали 15 мл 0,1 н. КОН. Объем объединенных водных растворов доводили

до 500 мл 0,1 н. раствором КОН, пробу анализировали в стеклянной кювете толщиной 10 мм на спектрофотометре Shimadzu UV-160 при длине волны 614 нм. В качестве стандарта применяли раствор шиконина с известной концентрацией. Кювету сравнения заполняли 0,1 н. раствором КОН. Шиконин и его производные идентифицировали ВЭЖХ [16]. Все производные шиконина суммировали как шиконин.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Muller K. O., Borger H.//Arb. Biol. Abt. 1941. V. 23. P. 189—231.
2. Ingham J. L.//Botan. Rev. 1972. V. 38. P. 343—424.
3. Dixon R. A.//Biol. Rev. 1986. V. 61. P. 239—291.
4. Ebel J.//Annu. Rev. Phytopathol. 1986. V. 24. P. 235—264.
5. Ward E. W. B.//Biology and Molecular Biology of Plant-Pathogen Interactions/Eds Bailey J. A. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1986. P. 107—131.
6. Gundlach H., Muller M. J., Kutchan T. M., Zenk M. H.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1992. V. 89. P. 2389—2393.
7. Dittrich H., Kutchan T. M., Zenk M. H.//FEBS Lett. 1992. V. 309. № 1. P. 33—36.
8. Needleman P., Turk J., Jakschik B. A., Marrison A. R., Lefkowitz J. B.//Annu. Rev. Biochem. 1986. V. 55. P. 69—102.
9. Давыденков В. Н., Патудин А. В., Попов Ю. Г., Рабинович С. А., Мирошников А. И.//Хим.-фарм. журн. 1991. № 1. С. 53—56.
10. Vick B. A., Zimmerman D. C.//Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1983. V. 111. P. 470—477.
11. Corbineau F., Rudnicki R. M., Come D.//Plant Growth Regul. 1988. V. 7. P. 157—169.
12. Inouye H., Ueda S., Inoue K., Matsumura H.//Phytochemistry. 1979. V. 18. P. 1301—1308.
13. Srinivasan V., Ryu D. D. Y.//Biotech. and Bioeng. 1992. V. 40. № 1. P. 69—74.
14. Surrey K.//Plant Physiol. 1964. V. 39. P. 65—70.
15. Murashige T., Skoog F.//Physiol. Plant. 1962. V. 15. P. 473—497.
16. Fujita Y., Maeda Y., Suga C., Morimoto T.//Plant Cell Rep. 1983. V. 2. P. 192—193.

Поступила в редакцию  
5.IV.1993

*T. P. Bychkova, E. V. Nanenina, V. B. Bersin,  
A. I. Miroshnikov*

#### INFLUENCE OF JASMONIC ACID AND 12-OXO-PHYTODIENOIC ACID ON THE BIOSYNTHESIS OF SHIKONIN IN THE *Arnebia euchroma* CELL CULTURE

*M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,  
Russian Academy of Sciences, Moscow*

Ethyl jasmonate and the pentacyclic biosynthetic precursor of jasmonic acid, 12-oxo-phytodienoic acid, were found to induce synthesis of shikonin in the cell culture of *Arnebia euchroma*. Twelve- and 8-fold increases in the shikonin level occurred upon addition of  $10^2$   $\mu$ M methyl jasmonate or 10  $\mu$ M 12-oxo-phytodienoic acid, respectively.