

ОСОБЕННОСТИ РОСТА И НАКОПЛЕНИЯ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В КАЛЛУСЕ СИРЕНИ ПРИ РАЗЛИЧНОМ УРОВНЕ МИНЕРАЛЬНОГО ПИТАНИЯ И ОСВЕЩЕНИЯ

ЛЮБАКОВСКАЯ Л.А.* , ЯКОВЛЕВА О.А.* , РЕШЕТНИКОВ В.Н.** ,
БРЕЛЬ Н.Г.**

УО «Витебский государственный ордена дружбы народов медицинский университет», Центральный ботанический сад НАН Беларуси***

Резюме. В работе представлены результаты изучения ростовых характеристик и способности к накоплению фенольных соединений каллусной культурой листового происхождения сирени (*Syringa vulgaris* (L.)), сорта «М. Шолохов» при различном содержании и составе минеральных веществ в среде культивирования. Наиболее эффективной для накопления биомассы была среда Мурасиге и Скуга, содержащая половинную норму азота нитратного (KNO_3 - 950 мг/л) и аммонийного (NH_4NO_3 - 412,5 мг/л). Максимальное накопление фенольных соединений наблюдали на среде, содержащей половинную норму азота и половинную норму фосфора (KH_2PO_4 - 85 мг/л). Накопление биомассы и фенольных соединений наиболее эффективно происходило на свету, чем в темноте.

Ключевые слова: сирень, фенольные соединения, каллус.

Abstract. In the work, the research results of the growth characteristics and accumulative ability of phenolic compounds by kallus culture of the leaf origin of a lilac (*Syringa vulgaris* (L.)), sort "M.Sholokhov" in the various contents and the structure of mineral substances in the cultivation environment are given. The most effective for the biomass accumulation was medium Murashige and Skoog containing 1/2 of nitrate nitrogen norm (KNO_3 -950 mg /l) and ammonium nitrogen (NH_4NO_3 -412,5 mg /l). The maximal accumulation of phenolic compound, was observed in the medium, containing 1/2 of nitrogen norm and 1/2 of phosphorus (KH_2PO_4 -85 mg /l). Biomass and phenolic compounds accumulation was more effective in the light than in the darkness. It is established, that biomass and phenolic compound accumulation in kallus culture of the leaf origin lilac took place at low concentrations of mineral elements.

Key words: *Syringa*, phenolic compounds, kallus

Адрес для корреспонденции: 210023, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27, Витебский государственный медицинский университет, каф. Фармакогнозии и ботаники. - Яковлева О.А.

Рост и развитие растительного организма видоспецифичны. Исследовать эти свойства позволяют культуры клеток и тканей высших растений, выращиваемые в строго контролируемых условиях на искусственных питательных средах. На рост биомассы и накопление вторичных метаболитов в культуре клеток значительное влияние оказывает химический состав питательной среды. Функционирование клеток *in vitro* обеспечивается рядом химических элементов (основных или макроэлементов) - азота и его солей, калия, фосфора и др., определяющих процессы жизнедеятельности клеток.

Однако влияние этих элементов на процессы роста и метаболизма культивируемых клеток неоднозначны. Показано, что высокое содержание нитратов, ионов аммония, калия, фосфата способствует быстрому росту клеток, а истощение среды значительно снижает рост и процессы вторичного метаболизма [1]. Вместе с тем у большинства культивируемых клеток растений образование и накопление вторичных метаболитов идут при пониженных концентрациях минеральных элементов [2]. Так изначально низкое содержание фосфатов в питательной среде приводило к увеличению содержания фенольных соединений (1,6 раза) каллуса солодки голой на среде с половинной концентрацией азота и фосфора по сравнению с каллусами, растущими на полной среде [3].

Было показано, что дефицит азота и фосфора в среде культивирования приводит к более высокому накоплению фенольных соединений у культуры клеток чайного растения, барвинка розового [4,5]. Дополнительное введение в среду культивирования этих компонентов стимулирует рост растения и подавляет процессы образования фенольных соединений для *Phytolacca americana* (L.) и *Prunus yedoensis*(D.) [6,7].

Как известно, свет является одним из факторов, стимулирующих биосинтез фенольных соединений в культуре *in vitro*. Считается, что свет активизирует работу ферментов, участвующих в синтезе полифенолов [8].

В работе изучали влияние света и минеральной части среды на рост каллусной культуры сирени (*Syringa vulgaris* (L.)) с целью оптимизации её выращивания *in vitro* и повышения содержания фенольных соединений.

Методы

Объектом исследования явилась стабильная каллусная культура сирени (*Syringa vulgaris* (L.)) листового происхождения, сорта «М. Шолохов». Для выращивания каллуса использовали 4 варианта сред, основу которых составила среда Мурасиге и Скуга (MS) с добавлением сахарозы, агара, витаминов по Стаба, рН среды 5,6 (до автоклавирования) [9].

Среда №1 - контрольная (оптимальная для поддержания роста при длительном культивировании каллуса сирени): среда MS с добавлением 2,4-дихлорфеноксисульфоновой кислоты и 6-бензиламинопурина, в концентрации 0,5 мг/л;

Среда №2 - среда MS с половинной нормой общего азота: нитратного (KNO_3 - 950 мг/л) и аммонийного (NH_4NO_3 - 412,5 мг/л);

Среда №3 - среда МС с половинной нормой фосфора ($\text{KН}_2\text{PО}_4$ - 85 мг/л);
 Среда №4 - среда МС с половинными нормами азота и фосфора.

При изучении влияния условий освещения, культуру клеток сирени выращивали на свету (освещенность 3000 лк) и в темноте (термостат) при температуре $26 \pm 1^\circ\text{C}$. Время культивирования - 60 дней, анализируемые отрезки: 10,30,50 дней. В это время каллус характеризовали следующими ростовыми параметрами: прирост сырой биомассы относительно исходного веса (П); накопление сырой биомассы (Х); экономический коэффициент по сырой и сухой биомассе (ЭК); продуктивность по сырой биомассе (Р) [10].

Фенольные соединения извлекали из лиофильно высушенного сырья горячим 96% этанолом. Содержание суммы фенольных соединений определяли спектрофотометрически после реакции с реактивом Фолина – Чекольтеу (поглощение при 720 нм) [10]. Калибровочный график строили по галловой кислоте.

Статистическое различие групп подтверждали непараметрическим анализом методом Манна - Уитни с использованием пакета Statistica 6,0.

Результаты и обсуждение

При длительном культивировании клеток растений, могут, как известно, происходить изменения в росте, морфологии и биохимических показателях. В результате проведённых исследований установлено, что при культивировании каллуса на различных средах, отличающихся минеральным составом наибольший прирост сырой биомассы наблюдали на 50 день ростового цикла на среде № 2 (1/2 норма азота) (на свету), который был равен 70,45 г (рисунок 1).

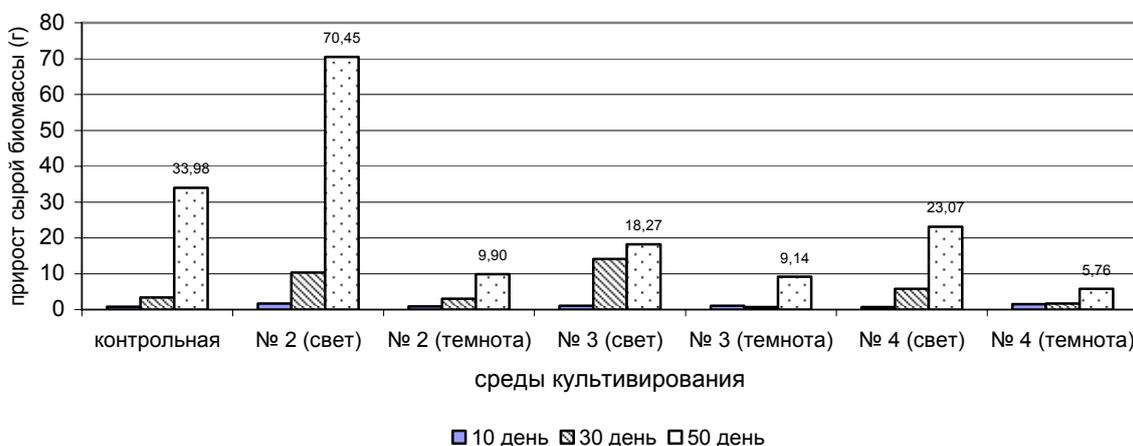


Рис. 1. Прирост сырой биомассы в каллусной культуре клеток сирени листового происхождения.

Причём, на этой же среде, но при культивировании в темноте прирост сырой биомассы был на 86% ниже ($p < 0,05$). На средах №3 и № 4, (сочетание половинных норм азота и фосфора) данные по приросту сырой биомассы достоверно были ниже ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной средой и со средой №2 (рисунок 2).

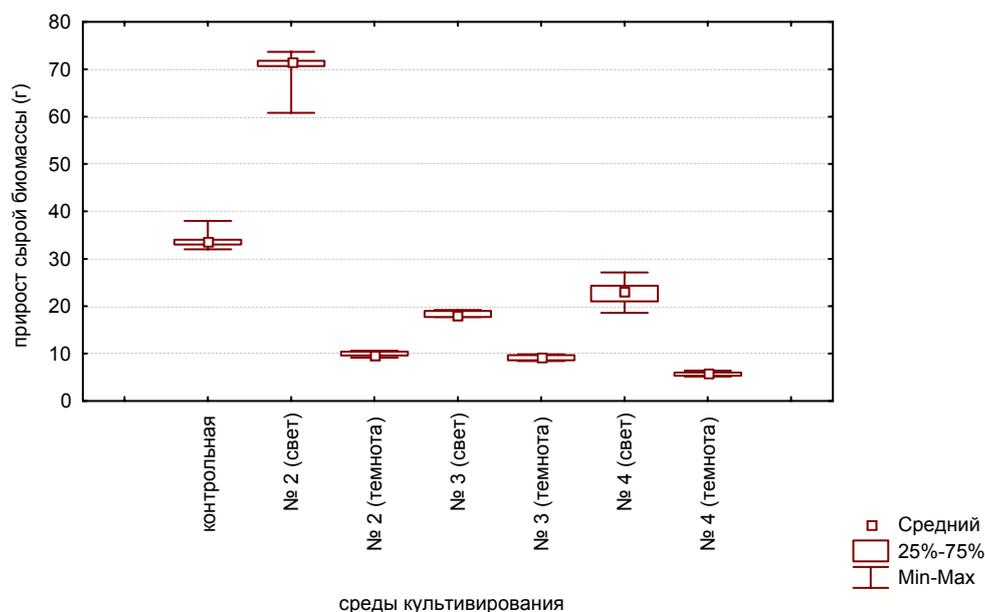


Рис. 2. Прирост сырой биомассы на 50 день культивирования в культуре клеток сирени.

Значение экономического коэффициента на среде № 2 (на свету) составило $4,26 \pm 0,89$ г сырой биомассы на 1 г потребленной сахарозы, что является доказательством эффективного использования субстрата и следовательно пролиферации клеток культуры и, что в итоге, приводит к накоплению биомассы.

На среде № 2 (свет) максимальное накопление сырой биомассы и продуктивность по сырой биомассе были наивысшими на 50 день культивирования и составили $127,85 \pm 26,6$ г/л и $2,1 \pm 0,44$ г/л в сутки, соответственно. Значения этих параметров для каллуса, выращенного в темноте, были достоверно ниже ($p < 0,05$) на всех средах культивирования по сравнению с культивированием на свету (таблица).

Таблица

Аналитические параметры каллуса листового происхождения сирени *S.vulgaris* (L.) (50 день культивирования): накопление сырой биомассы (X); экономический коэффициент по сырой и сухой биомассе (ЭК); продуктивность по сырой биомассе (P)

Среды культивирования	X (г/л)	ЭК (1г сырой биомассы на 1 г потребленной сахарозы)	P (г/л в сутки)
контрольная	$66,5 \pm 8,34$	$2,21 \pm 0,27$	$1,11 \pm 0,14$
№ 2 (свет)	$127,85 \pm 26,6$	$4,26 \pm 0,89$	$2,1 \pm 0,44$
№ 2 (темнота)	$33,7 \pm 13,3$	$1,12 \pm 0,44$	$0,56 \pm 0,22$
№ 3 (свет)	$49,95 \pm 17,9$	$1,67 \pm 0,6$	$0,83 \pm 0,3$

Среды культивирования	X (г/л)	ЭК (1г сырой биомассы на 1 г потребленной сахарозы)	P (г/л в сутки)
№ 3 (темнота)	34±15,02	1,13±0,5	0,57±0,25
№ 4 (свет)	55,25±25,09	1,84±0,84	0,92±0,42
№ 4 (темнота)	14±5,6	0,47±0,19	0,23±0,09

Сходные данные получены для суспензионной культуры чайного растения [4]. Известны и противоположные результаты. Так, для культуры клеток табака показано, что при увеличении содержания азота в среде наблюдали увеличение скорости роста и накопление биомассы [11].

Во всех вариантах сред с модифицированной минеральной частью, в культивируемых на свету каллусах, наблюдали увеличение накопления фенольных соединений по сравнению с контрольной средой (рисунок 3).

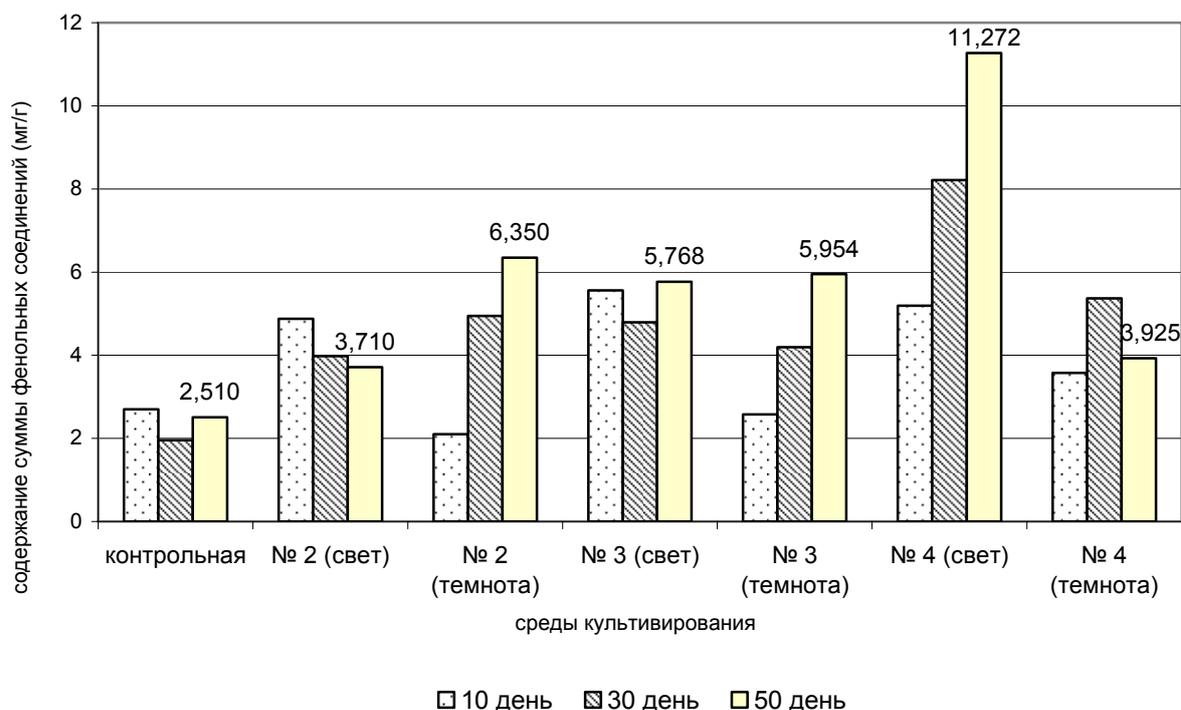


Рис. 3. Накопление суммы фенольных соединений в каллусной культуре сирени.

Наибольшую способность к накоплению фенольных соединений проявляли клетки каллусной культуры на свету, на среде №4 (сочетание половинных норм азота и фосфора) на 50 день культивирования (рисунок 3). Содержание суммы фенольных соединений в каллусе, выращенном на этом варианте среды, было достоверно выше на 77,7%, чем в каллусе на контрольной среде и на 67,1; 43,7; 48,8; 47,1; 65,4 % выше, чем на средах № 2 (свет и темнота), № 3 (свет и темнота), № 4 (темнота) соответственно ($p < 0,05$) (рисунок 4).

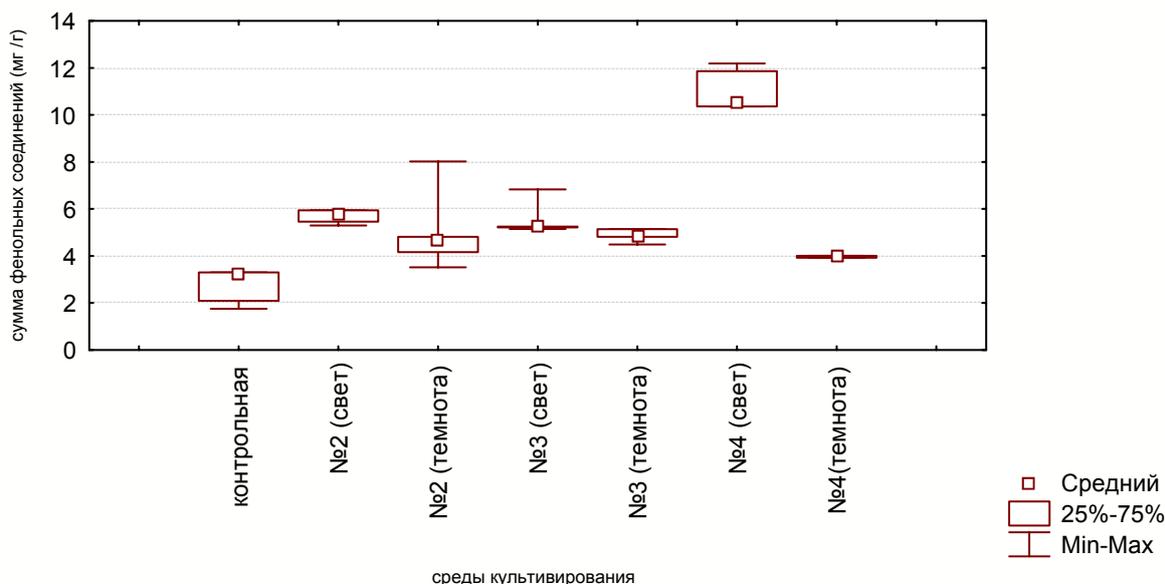


Рис. 4. Содержание суммы фенольных соединений на 50 день культивирования в культуре клеток сирени.

Аналогичные данные получены при культивировании клеток розы. Повышенное содержание органического азота в среде культивирования клеток розы подавляло синтез и накопление фенольных соединений и их синтез начинался после того, как из среды израсходовалось 80% нитратов [12]. Хотя, противоположно, в каллусной ткани софоры, в культуре клеток солодки, в культуре тканей чайного растения присутствие в среде дрожжевого экстракта приводило к увеличению синтеза флавононов, эхинатина, катехинов, соответственно [13]. Фосфор, наряду с азотом, так же является необходимым элементом во вторичном биосинтезе. Недостаток фосфора в среде, больше чем другие элементы, стимулирует вторичный биосинтез. Использование фосфатов в качестве лимитирующего фактора среды дало возможность контролировать накопление антоциана в суспензионной культуре моркови [14]. Сходные результаты были получены при биосинтезе антрахинона в культуре клеток *Galium molugo* [15]. При малых дозах фосфатов увеличивалось содержание антоцианидинов в культуре клеток *Primus uedoensis* [7].

Заключение

Таким образом, на основании полученных данных можно заключить, что максимальное накопление сырой биомассы в культуре клеток сирени (*Syringa vulgaris* (L.)) листового происхождения, сорта «М. Шолохов» происходило на среде, содержащей половинную норму азота (нитратного и аммонийного), в то время как максимальное накопление фенольных соединений наблюдали на среде с половинной нормой азота и фосфора. Накопление биомассы и фенольных соединений наиболее эффективно происходило на свету, чем в темноте. Значение этих параметров достигало максимума на 50 день культивирования, что соответствует стационарной фазе ростового цикла при культивировании на свету.

Литература

1. Носов А.М. Регуляция синтеза вторичных соединений в культуре клеток растений // Биология культивируемых клеток и биотехнология растений. М. - Наука - 1991. - С. 5 - 20.
2. Мэнтелл С.Г., Смит Г. Факторы культивирования, влияющие на накопление вторичных метаболитов в культурах клеток и тканей растений // Биотехнология сельскохозяйственных растений. М. - Агропромиздат. -1987.-С. 75-104.
3. Цыренов В.Ж. Основы биотехнологии: Культивирование изолированных клеток и тканей растений: Учебно-методическое пособие. - Улан-Удэ: ВСГТУ, 2003. - с.1-52
4. Багратишвили Д.Г. , Запрометов М.Н., Бутенко Р.Г. Образование фенольных соединений в суспензионной культуре клеток чайного растения и влияние на него уровня нитрата и гормональных эффекторов в питательной среде // Физиология растений. - 1980. - Т.27. - вып.2. - С. 404 - 412.
5. Knobloch K.H., Berlin J. Influence of phosphate on the formation of the indole alkaloids and phenolic compounds in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* // Plant cell, tissue and organ cultures. - 1983. - V.2. - № 4. - P. 333-340.
6. Sakuta H., Takagi T., Komamine A. Effect of nitrogen source on beta-cyanin accumulation and growth in suspension cultures of *Phytolacca americana* // *Physiol. plant.* - 1987. - V.71. - № 4. - P. 459 - 463.
7. Ishikura M., Watanabe Y., Teramoto S. The formation of flavonoids in cell suspension cultures of *Prunus yedoensis* Matsum // *Bot. Mag. Tokyo.* -1989.-№ 1068.-P. 547-560.
8. Запрометов М.Н. Фенольные соединения: распространение, метаболизм и функции в растениях. М. - Наука - 1993. - 272 с.
9. Murashige, T.A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog, // *Physiol. Plant.* - 1962. -V.15. № 3. -P.473-497.
10. Любаковская, Л.А. Ростовые и биосинтетические характеристики *Syringa vulgaris* L. Сорты «М. Шолохов» стеблевого происхождения в культуре *in vitro* / Л.А. Любаковская, О.А. Яковлева, Н.Г. Брель // *Вестник ВГМУ.* - 2007. - том 6, №1. - С.105 – 113.
11. Noguchi M., Matsumoto T., Hirata Y., Yamamoto K., Katsuyama A., Kabo A., Kato K. Improvement of growth rates of plant cells cultures // *Plant tissue culture and its biotechnological application*, ed. W. Barz, E. Reinhard, M. H. Zenk. Berlin, Heidelberg and New - York : Springer - Verlag. - 1977. - P. 85 - 94.
12. Kurz W.E.W., Constabel F. Plant cell cultures, a potential source of pharmaceuticals // *Advances in Applied Microbiology.* - 1979. - V.25. - P. 209 -240.
13. Yamamoto Y., Ichimura M., Inoue K. Stimulation of prenylated flavonone production by mannaus and acidic polysaccharides in callus culture of *Sophora flavescens* // *Phytochem.* - 1995. - V.40. - №1. - P. 77 - 81.

14. Dougall D.K., Weyrauch K. Growth and anthocyanin production by carrot suspension cultures grown under chemostat conditions with phosphate as the limiting nutrient // Biotech, and bioeng. - 1980. - V.92. - P. 337 - 352.

15. Wilson C. Continuous culture of plant cells using the chemostat principle // Advances in biochemical engineering. — Plant cell cultures. Ed. By A. Fiechter. Berlin.: Springer - Verlag. - 1980. - V.16. - P. 1 - 25.