

ДИНАМИКА РОСТА БИОМАССЫ И НАКОПЛЕНИЯ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЕ СИРЕНИ ОБЫКНОВЕННОЙ (SYRINGA VULGARIS (L.))

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

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

Резюме. Исследовали ростовые и биосинтетические параметры каллусной культуры цветкового происхождения *Syringa vulgaris* (L.), сорта «М. Шолохов», культивируемой на двух средах: контрольной (оптимальной для поддержания роста, при длительном культивировании каллуса сирени) и модифицированной (продуктивной для накопления фенольных соединений). Длительность культивирования, как на контрольной, так и на модифицированной среде составила 60 дней. Рост каллуса охарактеризован следующими параметрами: сырой и сухой вес, удельная скорость роста биомассы, индекс скорости роста, максимальное накопление и продуктивность по сырой и сухой биомассе, время удвоения клеточной популяции, экономический коэффициент. Максимальное накопление суммы фенольных соединений и прироста биомассы наблюдали на 50 день культивирования, в стационарную фазу роста, на обеих средах. Модифицированная среда определена как наиболее продуктивна для накопления биомассы и суммы фенольных соединений.

Ключевые слова: сирень обыкновенная, фенольные соединения, рост, in vitro.

Abstract. Growth and biosynthesis parameters of callus cultures of floral origin *Syringa vulgaris* (L.) of “M. Sholokhov” grade, cultivated on two media: control (optimal for maintenance growth, at long period of cultivation of callus *Syringa vulgaris* lilacs) and modified (productive for accumulation of phenolic compounds) were investigated. Maximal accumulation and productivity of the sum of phenolic compounds and the accretion of a biomass have been observed on the 50 day of cultivation, in a stationary growth phase, on both media. The modified medium has been determined as the most productive for accumulation of the sum of phenolic compounds.

Key words: *S. vulgaris*, phenolic compounds, growth, in vitro

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

Культура клеток *in vitro*, выращиваемая на искусственных питательных средах, в строго контролируемых условиях, позволяет исследовать ростовые и метаболические характеристики растительного организма.

Продолжительность ростового цикла и длительность его фаз зависят от условий культивирования, вида растения, его жизненной формы, эпигенетики экспланта и других факторов [1]. По имеющимся в литературе данным травянистые формы растений имеют более короткий ростовой цикл по сравнению с древесными формами. Кроме того, культивируемые клетки сохраняют способность к синтезу вторичных веществ, свойственных тому виду растения, из которых они получены.

Фенольные соединения образуются практически во всех растительных организмах. Характер их накопления видо-, сорто- и органоспецифичен. Так, способность к синтезу фенольных соединений обычно выше у древесных растений по сравнению с травянистыми [2].

Накопление вторичных метаболитов и скорость роста культуры *in vitro*, по имеющимся в литературе данным, как правило, находятся в обратной зависимости. Для большинства культур характерно двухэтапное культивирование, при котором на первом этапе происходит накопление биомассы культуры *in vitro*, а на втором этапе - максимальное накопление веществ вторичного метаболизма. Поэтому, разработка условий культивирования, при которых и рост биомассы, и накопление вторичных метаболитов происходит в течение одного культурального цикла является весьма актуальной проблемой.

S. vulgaris (L.) – древесное растение, характеризующееся широким спектром веществ фенольной природы, которые представлены производными фенилэтилового спирта, фенилпропаноидами, флавоноидами, кумаринами и др. [3].

Цель настоящей работы состоит в исследовании ростовых параметров и накопления фенольных соединений в каллусной культуре цветкового происхождения сирени обыкновенной (*Syringa vulgaris* (L.)).

Методы

Объектом исследования явилась стабильная каллусная культура цветкового происхождения сирени обыкновенной, сорта «М. Шолохов», поддерживаемая в культуре с 1991 г. в лаборатории Центрального ботанического сада НАН Беларуси.

Каллус выращивали поверхностным способом на двух средах. Первая среда - контрольная (оптимальная для поддержания роста при длительном культивировании каллуса сирени), среда Мурасиге и Скуга с половинным содержанием NH_4NO_3 , KH_2PO_4 , витаминов по прописи Стаба, агара и ростовых гормонов: 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты и 6-бензиламинопурина, в концентрации 0,5 мг/л. Вторая среда – модифицированная, которая ранее нами была определена, как продуктивная для накопления фенольных соединений в культуре цветкового происхождения [4]. Модифицированная среда отличалась от контрольной гормональным составом - содержала 6-бензиламинопурина и α -нафтилуксусную кислоту, в концентрации 0,1 мг/л. В среду для

культивирования каллуса добавляли сахарозу в концентрации 30 г/л, рН среды 5,6-5,8 до автоклавирования.

Культура *in vitro* выращивалась в культуральных помещениях при искусственном освещении люминесцентными лампами ЛБ-40 (освещенность 3000 лк), 12-часовом световом и темновом периодах, температуре $26 \pm 1^\circ\text{C}$, влажности 70%. Продолжительность культивирования - 60 суток. Контрольными отрезками для анализа каллусной культуры были: 5,10,20,30,40,50,60 дни культивирования.

В течение ростового цикла определяли следующие параметры: сырой и сухой вес, удельную скорость роста биомассы, индекс скорости роста, максимальное накопление и продуктивность по сырой и сухой биомассе, время удвоения клеточной популяции, экономический коэффициент [5].

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) [5]. Калибровочный график строили по галловой кислоте.

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

Результаты

В результате проведенных исследований были определены следующие ростовые параметры каллуса: масса сырого и сухого вещества, индекс скорости роста, удельная скорость роста по сырой биомассе каллуса, время удвоения биомассы, максимальное накопление сырой и сухой биомассы, экономический коэффициент, продуктивность по сырой биомассе.

При анализе ростовой кривой установлено, что она имеет S-образную форму (рис.1).

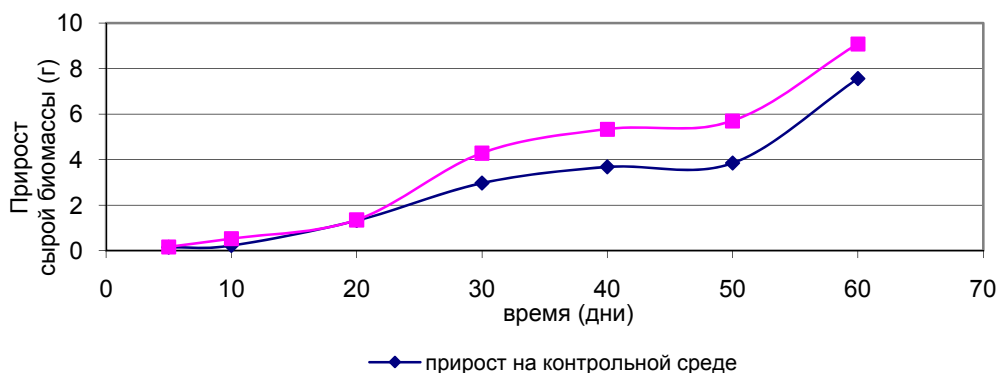


Рис. 1. Динамика прироста сырой биомассы каллуса сирени цветкового происхождения на контрольной и модифицированной средах.

В культуре ткани цветкового происхождения, за время культивирования на контрольной питательной среде, масса сырого вещества увеличилась в 8,6 раз, а на модифицированной –10 раз (индекс скорости роста) (табл. 2).

На контрольной среде до 10 дня культивирования прирост сырой биомассы был незначителен, что соответствует латентной фазе ростового

цикла, тогда как на модифицированной среде в этот промежуток времени биомасса увеличивалась в 3,2 раза (табл. 1). Следовательно, длительность лаг - фазы на модифицированной среде была короче и длилась до 5 дня культивирования.

Таблица 1

Характеристика роста сырой биомассы каллуса сирени при культивировании на различных средах

время (дни)	максимальное накопление сырой биомассы (г/л)		прирост сырой биомассы (г)	
	контр.	модиф.	контр.	модиф.
5	4,00±0,75	5,833±0,25	0,148±0,028	0,167±0,05
10	3,444±0,527	6,5±1,837	0,225±0,143	0,530±0,158
20	3,222±1,093	5,667±0,791	1,322±0,655	1,352±0,176
30	8,183±0,775	10,833±1	2,968±1,202	4,289±0,549
40	12,5±2,25	16,333±8,422	3,679±2,304	5,339±1,059
50	12,183±3,475	28,889±10,362	3,846±0,019	5,700±1,570
60	13,222±7,379	40,333±8,265	7,556±1,845	9,083±2,066

Таблица 2

Ростовые параметры каллуса сирени при культивировании на контрольной и модифицированной средах

время (дни)	удельная скорость роста (сут ⁻¹)		время удвоения сырой биомассы (сут)		индекс скорости роста	
	контр.	модиф.	контр.	модиф.	контр.	модиф.
5	0,0138±0,002	0,031±0,009	51,895±10,409	25,511±8,98	1,148±0,028	1,167±0,05
10	0,040±0,021	0,042±0,011	20,027±5,816	17,796±5,928	1,225±1,143	1,530±0,158
20	0,041±0,013	0,043±0,004	18,558±5,107	16,370±1,475	2,322±0,655	2,352±0,176
30	0,044±0,011	0,055±0,004	16,851±5,38	12,564±0,810	3,968±1,102	5,289±0,549
40	0,036±0,011	0,046±0,004	20,650±5,335	15,218±1,35	4,679±2,304	6,339±1,059
50	0,032±0,001	0,038±0,004	21,957±0,054	18,615±1,903	4,846±0,019	6,700±1,57
60	0,035±0,004	0,038±0,004	19,730±1,942	18,318±1,883	8,556±1,845	10,083±2,066

Начиная с 10 дня как на контрольной среде, так и на модифицированной средах наблюдаются достоверное увеличение прироста сырой биомассы, с 0,225 ± 0,143 до 3,679 ± 2,304 (на контрольной среде) (p<0,05) и с 0,530 ± 0,158 до 5,339 ± 1,059 (на модифицированной среде) (p<0,05), что соответствует экспоненциальной стадии роста, которая длилась до 40 дня культивирования (табл. 1, рис. 1). Причём прирост по сырой биомассе на модифицированной среде на 40 день был в 1,5 раза выше, чем на контрольной (p<0,05).

Удельная скорость роста каллуса на обеих средах была максимальна на 30 день культивирования и составила 0,044 ± 0,011 сут⁻¹ (на контрольной среде) и 0,055 ± 0,004 сут⁻¹ (на модифицированной среде). Причём, на модифицированной среде этот показатель был в 1,25 раз выше, чем на контрольной (p<0,05) (табл. 2).

Минимальное время удвоения биомассы наблюдали на 30 день ростового цикла, которое на контрольной среде составило $16,851 \pm 5,38$ суток, а на модифицированной - $12,564 \pm 0,810$ суток. На модифицированной среде этот показатель был ниже в 1,3 раза, чем на контрольной ($p < 0,05$) (табл. 2).

С 40 по 50 день прирост биомассы был незначителен, наблюдали уменьшение удельной скорости роста, что соответствует стационарной фазе роста (табл. 1,2). Прирост сырой биомассы в стационарную фазу на модифицированной среде был на 32% выше, чем на контрольной. Различие групп контрольной и модифицированной на 50 день культивирования статистически значимо ($p = 0,000349$) (рис. 3). Экономический коэффициент по сырой биомассе на 50 день культивирования составил $0,406 \pm 0,116$ г (на контрольной среде) и $0,963 \pm 0,345$ г (на модифицированной среде) на 1 г потребленной сахарозы (табл. 3).

Таблица 3

Показатели динамики роста каллусной культуры сирени на контрольной и модифицированной средах

время (дни)	максимальное накопление сухой биомассы (г/л)		экономический коэффициент по сырой биомассе (г биомассы на 1г потребленной сахарозы)		продуктивность по сырой биомассе (г/л в сутки)	
	контр.	модиф.	контр.	модиф.	контр.	модиф.
5	$0,244 \pm 0,019$	$0,623 \pm 0,085$	$0,133 \pm 0,025$	$0,194 \pm 0,008$	$0,4 \pm 0,075$	$1,167 \pm 0,05$
10	$0,308 \pm 0,022$	$0,469 \pm 0,082$	$0,115 \pm 0,018$	$0,217 \pm 0,061$	$0,689 \pm 0,105$	$0,65 \pm 0,184$
20	$0,255 \pm 0,047$	$0,397 \pm 0,026$	$0,107 \pm 0,036$	$0,189 \pm 0,026$	$0,161 \pm 0,055$	$0,283 \pm 0,04$
30	$0,576 \pm 0,056$	$0,738 \pm 0,057$	$0,273 \pm 0,026$	$0,361 \pm 0,033$	$0,273 \pm 0,026$	$0,361 \pm 0,033$
40	$0,832 \pm 0,137$	$0,844 \pm 0,55$	$0,417 \pm 0,075$	$0,544 \pm 0,281$	$0,313 \pm 0,056$	$0,408 \pm 0,211$
50	$0,903 \pm 0,280$	$2,067 \pm 0,718$	$0,406 \pm 0,116$	$0,963 \pm 0,345$	$0,244 \pm 0,070$	$0,578 \pm 0,207$
60	$0,995 \pm 0,427$	$3,495 \pm 0,872$	$0,441 \pm 0,246$	$1,344 \pm 0,276$	$0,220 \pm 0,123$	$0,672 \pm 0,138$

Максимальное накопление сырой и сухой биомассы наблюдали на 50 день культивирования, в этот период максимальной была также продуктивность по сырой биомассе (табл. 1,3).

Накопление суммы фенольных соединений при культивировании на контрольной и модифицированной средах происходило различно.

На контрольной среде на 5 день культивирования содержание фенольных

соединений в 3,6 раз больше, чем на модифицированной. С 5 по 20 день (контрольная среда) содержание суммы фенольных соединений уменьшилось в 1,4 раза. На модифицированной среде этот показатель увеличился в 2,9 раз по сравнению с 5 днём культивирования. На 20 день культивирования содержание фенольных соединений как на модифицированной, так и на контрольной средах было практически равным и составило $2,06 \pm 0,016$ и $2,357 \pm 0,032$, соответственно ($p < 0,05$). На 30 день наблюдали общую тенденцию к снижению содержания фенольных соединений на обеих средах (рис. 2).

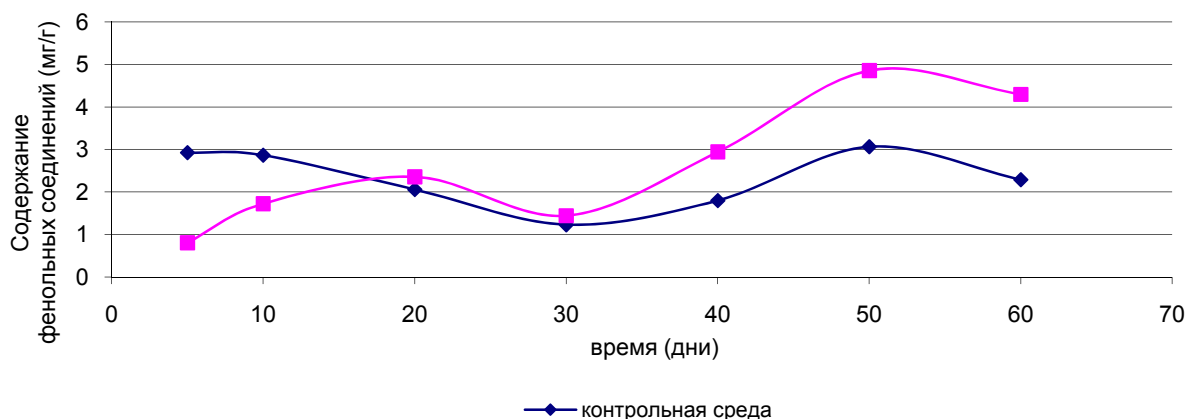


Рис. 2. Динамика накопления фенольных соединений в каллусе цветкового происхождения на контрольной и модифицированной средах.

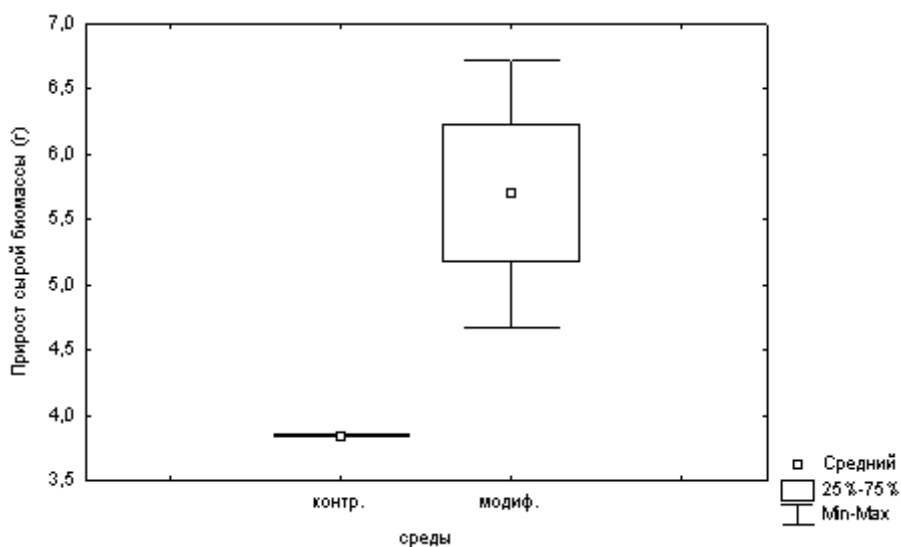


Рис. 3. Прирост сырой биомассы, относительно исходного веса на 50 день культивирования.

С 30 по 40 день (экспоненциальная фаза роста) наблюдали увеличение содержания фенольных соединений на обеих средах. Однако, на модифицированной среде количество суммы фенольных соединений было на 39% выше, чем на контрольной.

С 40 по 50 день, в стационарной фазе роста, сумма фенольных соединений продолжала увеличиваться. 50 день характеризуется максимумом

накопления суммы фенольных соединений и на контрольной, и на модифицированной средах. Содержание фенольных соединений было на 63% больше на модифицированной среде, чем на контрольной. Различие групп статистически значимо ($p=0,000349$) (рис. 4).

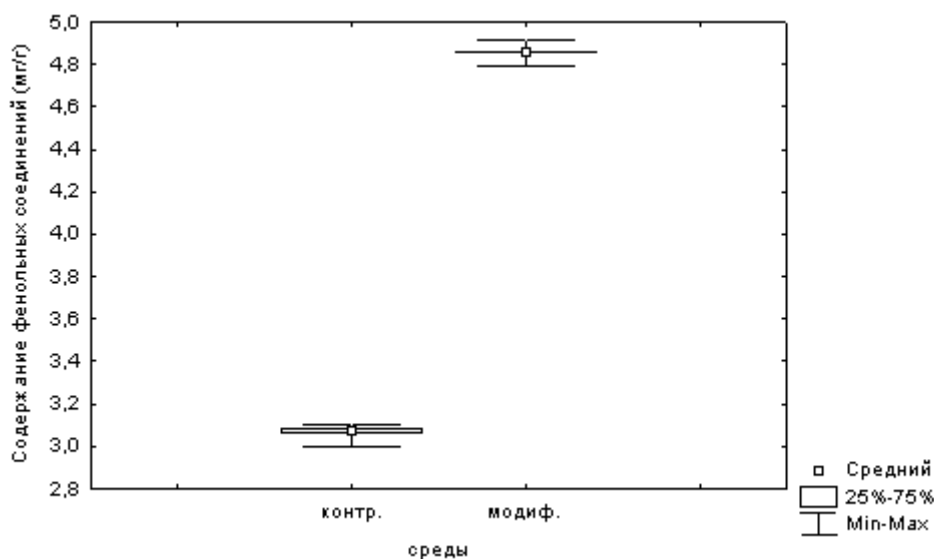


Рис. 4. Содержание фенольных соединений на 50 день культивирования

После 50 дня содержание фенольных соединений уменьшилось на обеих средах. Следовательно, исследование ростовых параметров и накопления фенольных соединений в течение дальнейшего времени культивирования было нецелесообразно, ввиду разобщённости процессов роста и накопления фенольных соединений.

Обсуждение

Для каллусной культуры цветкового происхождения сирени лаг-фаза длилась до 10 дня на контрольной среде и до 5 дня – на модифицированной. В то же время нами ранее установлено, что для каллусной культуры стеблевого происхождения сирени продолжительность лаг - фазы составила 30 дней – на контрольной и 20 дней - на модифицированной средах [5]. По имеющимся в литературе данным, продолжительность лаг-фазы для травянистых растений: лаванды, герани, кориандра, марены красильной, серпухи венценосной составила 3, 4, 6, 7 и 20 суток, соответственно [6,7,8], а для культуры клеток многолетнего, вечнозелёного кустарника - раувольфии змеевидной (*Rauwolfia serpentina* Venth.) -7 суток [9].

Экспоненциальная фаза длилась с 10 по 40 день для каллусной культуры сирени цветкового происхождения культивируемой на контрольной среде, и с 5 по 40 – на модифицированной. Тогда, как для каллусной культуры стебля сирени экспоненциальная фаза длилась с 30 по 50 и с 20 по 60 дни (на контрольной и модифицированной среде соответственно) [5]. Для раувольфии змеевидной экспоненциальная фаза длилась до 40 дня культивирования [9].

С 40 по 50 день культивирования наблюдали стационарную фазу роста как на контрольной, так и на модифицированной средах. Для каллуса сирени

обыкновенной, сорта «М.Шолохов» стеблевого происхождения, выращенного на контрольной среде, стационарная фаза роста длилась с 50 по 70 день культивирования, на модифицированной среде с 60 по 70 день [5]. Стационарная фаза наступала для некоторых травянистых растений: лаванды, герани, кориандра и серпухи венценосной наступала на 26, 40, 35, 70-е сутки цикла выращивания соответственно [6-8]. Для раувольфии змеевидной стационарная фаза длилась до 70-75 суток, каллусные клетки розы в стационарную фазу переходили на 40-45-е сутки культивирования [8, 9].

Заключение

Таким образом, на основании полученных данных и данных литературы, можно заключить, что длительность ростового цикла сирени (древесная форма) более продолжительна по сравнению с травянистыми формами растений [6-12].

Накопление вторичных метаболитов и скорость роста культуры *in vitro*, по имеющимся в литературе данным, как правило, находятся в обратной зависимости. В нашем эксперименте эта зависимость чётко прослеживается (на 30 день наблюдается максимальная удельная скорость роста и снижение накопления синтеза суммы фенольных соединений) (табл. 2, рис. 2). Для культуры сирени цветкового происхождения максимальное содержание суммы фенольных соединений наблюдается на 50 день культивирования. В это время происходило снижение удельной скорости роста на контрольной среде и на модифицированной среде (табл. 2), что согласуется с имеющимися в литературе данными. Возможно, это можно объяснить тем, что механизмы и условия, блокирующие клеточную пролиферацию и активный рост, являются одновременно механизмами активации, обеспечивающими синтез ферментов вторичного метаболизма.

Повышение ростовых параметров с 50 по 60 день, по – видимому, связано с тем, что после 50 дня фенольные соединения выделяются в среду культивирования и таким образом, освободившись от избытка веществ вторичного метаболизма, каллус возобновляет свой рост.

Таким образом, в результате проведенных исследований было установлено, что модифицированная среда более продуктивна как для накопления биомассы, так и для накопления фенольных соединений в каллусе сирени цветкового происхождения.

Литература

1. Цыренов, В. Ж. Основы биотехнологии: Культивирование изолированных клеток и тканей растений: учебно-методическое пособие / В. Ж. Цыренов. – Улан-Удэ: ВСГТУ, 2003. – С. 1-52.
2. Способность различных сортов пшеницы (*Triticum aestivum* L.) к образованию фенольных соединений / Н. В. Загоскина [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2005. – Т. 41. – № 1. – С. 113-116.
3. Куркин, В. А. Фармакогнозия: учебник для студентов фармацевтических вузов (факультетов) / В. А. Куркин [и др.]. – Самара: ООО «Офорт», ГОУВПО «СамГМУП», 2004. – С. 665- 670.
4. Любаковская, Л. А. Синтез фенольных веществ в каллусе листового

и цветкового происхождения сирени сорта “Михаил Шолохов” / Л. А. Любаковская [и др.] // Вестник фармации. – 2003. – № 4. – С. 14-17.

5. Любаковская, Л. А. Ростовые и биосинтетические характеристики *Syringa vulgaris* L. Сорта «М. Шолохов» стеблевого происхождения в культуре *in vitro* / Л. А. Любаковская, О. А. Яковлева, Н. Г. Брель // Вестник ВГМУ. – 2007. – Т. 6, № 1. – С. 105 – 113.

6. Shcherbakova, E. N. Physiological characteristic of anthraquinone producing callus culture of *Rubia tinctorum* L. / E. N. Shcherbakova, M. K. Mkrtoumyan, Y. G. Popov // II Intern. Symp. on plant biotechnol: abstr. – Kyiv, 1998. – P. 112.

7. Карначук, Р. А. Клеточная культура серпухи венценосной как перспективный продуцент фитоэкдистероидов / Р. А. Карначук [и др.] // Биология культивируемых клеток и биотехнология растений. – М.: Наука, 1991. – С. 39-41.

8. Егорова, Н. А. Цитофизиологическая характеристика каллюсных культур некоторых эфиромасличных растений / Н. А. Егорова // Физиология и биохимия культ. растений. – 2001. – Т.33, № 2. – С. 159-164.

9. Каухова, И. Е. Особенности процессов питания и дыхания культуры клеток *Rauwolfia serpentina* (Aporcynaceae) в ходе роста и развития / И. Е. Каухова // Растительные ресурсы. – 2005. – Вып. 4. – С. 31-39.

10. Рабинович, С. А. Действие стрессовых факторов на биосинтез бензофенантридиновых алкалоидов в культуре клеток мака прицветникового / С. А. Рабинович, И. Н. Кузовкина // Биология культивируемых клеток и биотехнология растений. – М.: Наука, 1991. – С. 20-25.

11. Батыгина, Е. Н. Культура ткани *Panax quinquefolius* L. как объект для изучения процессов роста и метаболизма *in vitro*: автореф....дис. канд.биол. наук / Е. Н. Батыгина. – Л., 1990. – 17 с.

12. Фролова, Л. В. Кинетика клеточной популяции *Vinca faba in vitro*: автореф ... дис. канд. биол. наук / Л. В. Фролова. – Л., 1979. – 35 с.