

ДИНАМИКА НАКОПЛЕНИЯ БИОМАССЫ И ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ТЕЧЕНИЕ РОСТОВОГО ЦИКЛА КАЛЛУСА СИРЕНИ ЛИСТОВОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

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

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

Резюме. Изучена продолжительность основных фаз ростового цикла каллуса листового происхождения сирени (*S. vulgaris* (L.)), сорта «М. Шолохов» на контрольной и модифицированной средах. Длительность ростового цикла на обеих средах составила 50 дней. На модифицированной среде раньше наступала экспоненциальная фаза роста (20 день), по сравнению с контрольной (30 день). Максимальное накопление сырой биомассы, максимальную удельную скорость роста и минимальное время удвоения биомассы наблюдали на 40 день ростового цикла, как на контрольной, так и на модифицированной средах. Показано, что в течение цикла культивирования происходило накопление фенольных соединений, как на контрольной, так и на модифицированной средах. На модифицированной среде накопление суммы фенольных соединений было на 36,6% выше, чем на контрольной. Модифицированная среда определена как оптимальная для накопления биомассы и фенольных соединений.

Ключевые слова: фенольные соединения, каллус, сирень, рост.

Abstract. Duration of the basic growth cycle phases of kallus of the leaf origin lilac (*S. vulgaris* (L.)), sort "M.Sholokhov" on the control and modified mediums. Growth cycle duration on both mediums made up 50 days. On the modified medium, the exponential phase began earlier (the 20th day) than on the controlled one (the 30th day). The maximal accumulation of a crude biomass, the maximal specific growth rate and minimal duration time of doubling of the biomass were observed on the 40th day of the growth cycle both on control and modified mediums. It is shown, that during the cultivation cycle, the accumulation of phenolic compound was observed both on the control and modified mediums. On the modified medium, accumulation of the phenolic compounds sum was 36,6% higher than on the control medium. Modified medium was determined as optimal for biomass and phenolic compound accumulation.

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

Клетки, культивируемые *in vitro*, устойчиво сохраняют видовую, органную и тканевую специфику, как ростовых процессов, так и процессов вторичного метаболизма, свойственных тому виду растения, из которых они получены [1,2]. При выращивании клеток *in vitro* процессы накопления биомассы и вторичных соединений в большинстве случаев идут несинхронно. Синхронизация процессов роста и вторичного метаболизма свидетельствует о необходимости продуктов вторичного обмена в процессах жизнедеятельности клеток. Поскольку рост культуры *in vitro* и накопление в ней фенольных соединений находятся в обратной зависимости, весьма актуальным является разработка условий культивирования, при которых накопление биомассы и вторичных метаболитов происходило бы в течение одного культурального цикла.

Цель исследования - изучение взаимосвязи между накоплением биомассы культивируемых клеток и их способностью к образованию фенольных соединений на примере каллусной культуры сирени (*S. vulgaris*(L.)) листового происхождения, длительно выращиваемой в условиях *in vitro*.

Методы

Объект исследования - каллусная культура сирени (*Syringa vulgaris* (L.)) листового происхождения, сорта «М. Шолохов».

Выращивание культуры ткани проводили поверхностным способом на питательной среде Мурасиге и Скуга [3] с половинным содержанием NH_4NO_3 , KH_2PO_4 , витаминов по Стаба, агара. Среда, обозначенная как контрольная содержала ростовые гормоны: 2,4-дихлорфеноксисукусную кислоту (2,4-Д) и 6-бензиламинопуридин (БАП), в концентрации 0,5 мг/л. Среда, обозначенная как модифицированная, в качестве гормональной части содержала БАП и α -нафтилуксусную кислоту (НУК) в концентрации 1 мг/л.

Культивирование каллусов проводили при искусственном освещении люминесцентными лампами ЛБ-40 (освещенность 3000 лк) при 12-часовом световом и темновом периодах, температуре $26 \pm 1^\circ\text{C}$, влажности 70%. Продолжительность культивирования - 60 суток. Ростовые характеристики и содержание суммы фенольных соединений в каллусной культуре анализировали на 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 дни культивирования.

В течение ростового цикла определяли следующие параметры: сырой и сухой вес, прирост биомассы во времени, удельную скорость роста биомассы, индекс скорости роста, максимальное накопление и продуктивность по сырой и сухой биомассе, время удвоения клеточной популяции, экономический коэффициент [4].

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 и обсуждение

При изучении ростового цикла каллуса сирени листового происхождения были выделены следующие фазы: латентная, экспоненциальная, стационарная.

На основании полученных данных было установлено, что лаг- фаза для каллуса, культивируемого на контрольной среде, длилась до 30 дня, а на модифицированной среде – до 20 дня (рисунок 1).

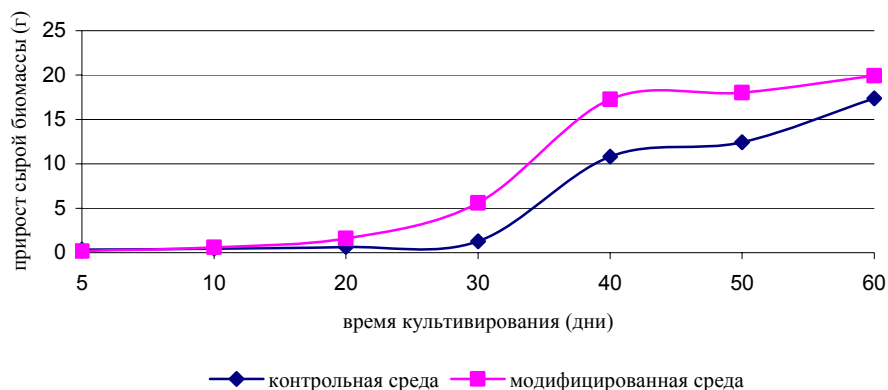


Рис. 1. Прирост сырой биомассы каллуса листового происхождения на контрольной и модифицированной среде в течение ростового цикла

Период времени с 30 по 40 (на контрольной среде) и с 20 по 40 (на модифицированной среде) соответствует экспоненциальной фазе роста, в течение которой происходило увеличение сырой биомассы (М) в 7,1 и в 15,2 раза, соответственно (таблица 1). Необходимо отметить, что на 40 день культивирования как прирост сырой биомассы во времени (Π_t), так и удельная скорость роста (μ) были максимальны и составили: Π_t - $0,271 \pm 0,016 \text{ сут}^{-1}$; μ - $0,062 \pm 0,001 \text{ сут}^{-1}$ (на контрольной среде) и $0,431 \pm 0,037 \text{ сут}^{-1}$ и $0,073 \pm 0,002 \text{ сут}^{-1}$ (на модифицированной среде), соответственно ($p < 0,05$).

Таблица 1

Ростовые параметры каллуса листового происхождения сирени при выращивании на контрольной и модифицированной средах: М -увеличение сырого веса; Π -прирост сырой биомассы относительно исходного веса; Π_t -прирост сырой биомассы с учётом фактора времени

Время (дни)	М (г)		Π (г)		Π_t (сут^{-1})	
	контр.	модиф.	контр.	модиф.	контр.	модиф.
5	0,014±0,007	0,017±0,014	0,347±0,450	0,195±0,141	0,069±0,09	0,039±0,028
10	0,026±0,007	0,037±0,018	0,462±0,120	0,603±0,246	0,0462±0,012	0,060±0,025
20	0,03±0,016	0,064±0,016	0,638±0,447	1,620±0,695	0,032±0,022	0,081±0,035
30	0,047±0,018	0,321±0,114	1,287±1,088	5,594±1,694	0,043±0,036	0,186±0,056
40	0,334±0,049	0,971±0,555	10,833±0,633	17,259±1,498	0,271±0,016	0,431±0,037
50	0,308±0,219	0,843±0,442	12,437±2,480	18,037±2,377	0,249±0,05	0,361±0,048
60	0,75±0,061	0,893±0,248	17,367±0,651	19,917±8,716	0,289±0,011	0,332±0,145

Таблица 2

Характеристика параметров роста (по сырой биомассе) каллуса листового происхождения сирени на контрольной и модифицированной средах: X - накопление биомассы; ЭК -экономический коэффициент; Р -продуктивность

Время (дни)	X (г/л)		ЭК (г сырой биомассы на 1 г потребленной сахарозы)		Р (г/л в сутки)	
	контр.	модиф.	контр.	модиф.	контр.	модиф.
5	4,056±1,21	5,011±1,076	0,135±0,04	0,167±0,036	0,811±0,242	1,002±0,215
10	4,178±1,043	5,05±1,294	0,139±0,035	0,168±0,043	0,418±0,104	0,505±0,129
20	4,222±1,034	5,389±1,054	0,141±0,034	0,180±0,035	0,211±0,052	0,269±0,053
30	5±0,829	19,167±6,614	0,167±0,028	0,639±0,220	0,167±0,028	0,639±0,220
40	18,278±2,751	51,333±29,273	0,609±0,282	1,711±0,976	0,457±0,069	1,283±0,732
50	16,611±11,573	44,611±23,444	0,546±0,412	1,487±0,781	0,332±0,218	0,892±0,469
60	39,667±3,307	47,3±12,807	1,322±0,11	1,577±0,427	0,661±0,055	0,788±0,213

Таблица 3

Аналитические параметры каллуса листового происхождения сирени (*S.vulgaris* (L.)) на контрольной и модифицированной средах: μ -удельная скорость роста; g -время удвоения биомассы; I -индекс скорости роста

Время (дни)	μ (сут ⁻¹)		g (сут)		I	
	контр.	модиф.	контр.	модиф.	контр.	модиф.
5	0,052±0,053	0,034±0,023	21,164±10,402	71,481±108,187	1,347±0,45	1,195±0,141
10	0,038±0,009	0,046±0,017	19,726±6,428	18,406±10,743	1,462±0,12	1,603±0,246
20	0,023±0,013	0,047±0,013	45,927±33,335	15,921±4,510	1,638±0,447	2,620±0,695
30	0,025±0,014	0,062±0,009	39,880±27,675	11,439±1,764	2,287±1,088	6,594±2,487
40	0,062±0,001	0,073±0,002	11,230±0,257	9,562±0,295	11,833±1,94	18,259±1,498
50	0,052±0,004	0,059±0,003	13,490±1,06	11,822±0,649	13,437±2,48	19,037±2,377
60	0,048±0,001	0,049±0,007	14,291±0,174	14,353±2,238	18,367±0,651	20,917±8,716

Таблица 4

Характеристика параметров роста (по сухому весу) каллуса листового происхождения сирени при культивировании на различных средах: Xсух - максимальное накопление биомассы; ЭКсух -экономический коэффициент; Рсух -продуктивность

Время (дни)	Xсух (г/л)		ЭКсух (г сухой биомассы на 1 г потребленной сахарозы)		Рсух (г/л в сутки)	
	контр.	модиф.	контр.	модиф.	контр.	модиф.
5	0,182±0,055	0,501±0,049	0,006±0,002	0,017±0,002	0,036±0,011	0,100±0,01
10	0,190±0,021	0,495±0,046	0,006±0,001	0,017±0,002	0,019±0,002	0,050±0,005
20	0,291±0,039	0,512±0,118	0,010±0,001	0,017±0,004	0,015±0,002	0,026±0,006
30	0,365±0,033	0,991±0,25	0,012±0,001	0,033±0,008	0,012±0,001	0,033±0,008
40	1,121±0,117	3,135±2,02	0,037±0,004	0,105±0,067	0,028±0,003	0,078±0,051
50	0,997±0,231	2,605±1,609	0,033±0,449	0,087±0,054	0,020±0,015	0,052±0,032
60	1,888±0,151	2,674±0,804	0,063±0,005	0,089±0,027	0,031±0,003	0,045±0,013

Причём на модифицированной среде удельная скорость роста была в 1,2 раза выше, чем на контрольной ($p < 0,05$) (таблица 1,3).

На 40 день культивирования минимальное время удвоения сырой биомассы составило: $11,23 \pm 0,257$ суток (на контрольной среде) и $9,562 \pm 0,295$ суток (на модифицированной среде) ($p < 0,05$), этот показатель на модифицированной среде был в 1,2 раза ниже, чем на контрольной среде (таблица 3). Все эти показатели свидетельствуют о максимальном росте каллуса в экспоненциальную фазу.

Экономический коэффициент, как по сырой, так и по сухой биомассе был максимален на 40 день культивирования и составил по сырой биомассе $0,609 \pm 0,282$ г сырой биомассы на 1 г потребленной сахарозы, а по сухой биомассе: $0,037 \pm 0,004$ г сухой биомассы на 1 г потребленной сахарозы (на контрольной среде), что в 2,8 раза меньше, чем на модифицированной ($p < 0,05$) (таблица 2,4).

По сухому весу ростовые показатели такие, как накопление биомассы и продуктивность на контрольной и модифицированной среде так же были максимальны на 40 день культивирования и составили: $X_{\text{сух}} - 1,121 \pm 0,117$ г/л и $3,135 \pm 2,02$ г/л; $R_{\text{сух}} - 0,028 \pm 0,003$ г/л в сутки и $0,078 \pm 0,051$ г/л в сутки соответственно (таблица 4). На модифицированной среде эти показатели были в 2,8 раза выше, чем на контрольной ($p < 0,05$).

С 40 по 50 день, как на контрольной, так и на модифицированной среде прирост сырой биомассы (Π) был незначителен (в 1,1 и 1,05 раз, соответственно ($p < 0,05$)), удельная скорость роста уменьшалась, время удвоения биомассы увеличивалось пропорционально в 1,2 раза на обеих средах (таблица 1,3). Все эти показатели говорят о вступлении каллуса в стационарную фазу роста.

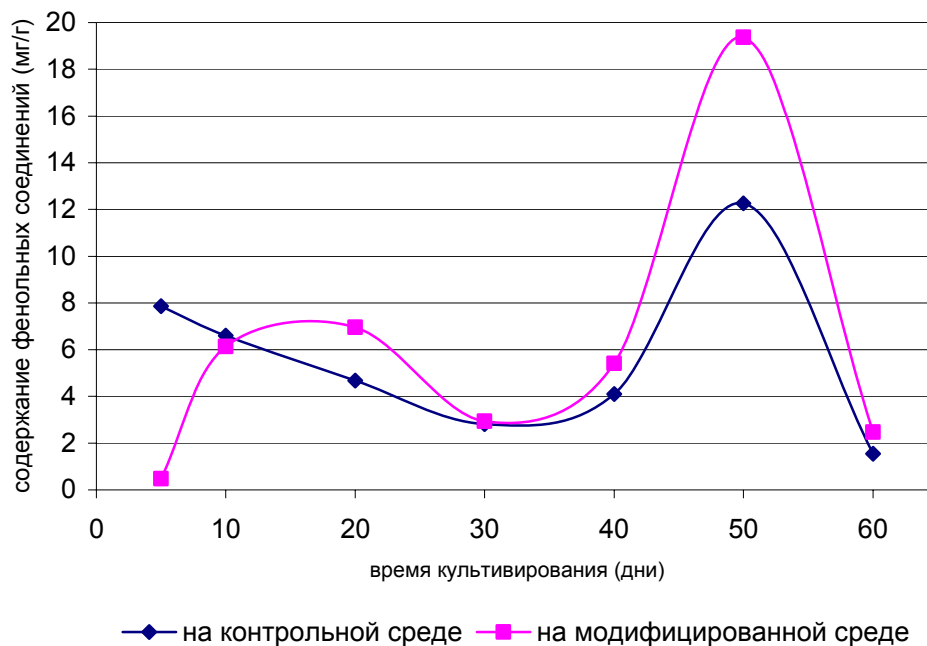


Рис. 2. Содержание суммы фенольных соединений каллуса листового происхождения на контрольной и модифицированной среде в течение ростового цикла.

В течение ростового цикла накопление суммы фенольных соединений в каллусе, культивируемом как на контрольной, так и на модифицированной среде было неодинаково (рисунок 2).

Основное отличие в содержании фенольных соединений наблюдалось в первую фазу ростового цикла. На 5 день культивирования содержание фенольных соединений на контрольной среде было в 16,2 раза выше ($p < 0,05$), чем на модифицированной. Затем, в каллусе, культивируемом на контрольной среде, содержание фенольных соединений уменьшалось в 2,8 раза, а на модифицированной среде – увеличивалось в 6,1 раз (с 5 по 30 день) и к 30 дню культивирования их содержание было практически одинаково (рисунок 2).

Поскольку контрольная среда является оптимальной для поддержания роста каллуса, следовательно, повышенное содержание фенольных соединений в каллусе во время лаг-фазы свидетельствует о активности роста каллуса. Снижение содержания фенольных соединений на контрольной и на модифицированной среде на стадии линейного роста (экспоненциальная фаза), по-видимому, связано с возрастанием в каллусной культуре внутриклеточных потребностей во время активного роста.

Максимальное накопление суммы фенольных соединений наблюдали на 50 день культивирования на обеих средах, что соответствовало стационарной фазе культивирования. Причём, на модифицированной среде этот показатель был в 1,6 раз выше, чем на контрольной ($p < 0,05$). На этой фазе ростового цикла, по-видимому, устанавливается равновесие концентраций фенольных соединений в клетке и питательной среде, которая становится своеобразным резервуаром. К этому времени с начала культивирования на контрольной среде сырая биомасса увеличилась в 13,4 раза, а на модифицированной среде в 19 раз (таблица 3).

С 50 по 60 день содержание фенольных соединений в ткани снижалось как на контрольной, так и на модифицированной среде.

Таким образом, результаты исследований показали, что накопление биомассы и фенольных соединений наиболее эффективно происходит на модифицированной среде, содержащее в качестве гормонов БАП и НУК, чем в присутствии 2,4 D и БАП.

Литература

1. Березнеговская Л.Н., Гусев И.Ф., Дмитрук С.Е. и др. Культура тканей и клеток алкалоидных растений. –Томск: Изд-во Том. Ун-та, 1975. -196с.
2. Косулина Л.Г., Лапикова В.П. Получение каллусной ткани из зрелых зародышей яровой пшеницы // Биол. Науки.-1986.-№4.-С.77-81
3. 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.
4. 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. - том 6, №1. - С.105 – 113.

5. Wrolstad, R.E., Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent / R.E. Wrolstad, V. L. Wiley, R. Orthofer, R. M. Lamuela-Raventos // *Methods in Enzymology*. – 1999. - V. 299. – P. 152-178.