

РЕГУЛЯЦИЯ РОСТА КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР ПАЖИТНИКА ГРЕЧЕСКОГО ОЗИМОГО И ЯРОВОГО СОРТОВ

А. О. Логвина

В настоящее время в связи с остротой экологических проблем и, как следствие, сокращением ареала произрастания ценных лекарственных растений актуальной задачей становится внедрение в фармакологическое производство новых подходов получения их фитомассы, среди которых наиболее перспективным является применение биотехнологического приема культуры клеток и тканей растений.

Эта технология обеспечивает круглогодичное получение растительного сырья в условиях *in vitro*, что позволяет выделять из него чистые биологически активные вещества без примесей и загрязнений, а также регулировать их синтез, варьируя условия выращивания клеточных культур [1].

Пажитник греческий (*Trigonella foenum-graecum* L.) – это одно из древнейших лекарственных растений [2], семена и надземная масса которого являются богатым источником сапонинов, алкалоидов и фенольных соединений [3; 4]. По этой причине инициация и исследование клеточных культур пажитника, как альтернативного источника данных вторичных метаболитов, представляет значительный практический интерес.

Для того чтобы составить конкуренцию традиционно используемому растительному сырью культуры клеток и тканей должны иметь значительный биосинтетический потенциал, который во многом определяется происхождением культур *in vitro*, в частности типом эксплантов и сортом растения, служащего их источником. Также они должны характеризоваться высокими скоростями прироста биомассы, что регулируется многими факторами, среди которых на первое место выступают состав питательной среды и условия освещения [1].

В связи с этим целью настоящей работы явилось изучение влияния концентрации фитогормонов и сахарозы в питательной среде, а также условий освещения на ростовые показатели листовых и стеблевых каллусов пажитника греческого озимого и ярового сортов.

В ходе изучения гормональной регуляции ростовых процессов клеточных культур *Trigonella foenum-graecum* было использовано 4 варианта сред Мурасиге и Скуга (МС) [5], различающихся соотношением регуляторов роста – ауксинов и цитокининов. В качестве цитокинина в состав сред входил кинетин в концентрациях 1,0 мг/л и 2,0 мг/л, в качестве ауксина – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д) в тех же концен-

трациях, в следующих комбинациях: 1,0 мг/л 2,4-Д и кинетина; 1,0 мг/л 2,4-Д и 2,0 мг/л кинетина; 2,0 мг/л 2,4-Д и 1,0 мг/л кинетина; 2,0 мг/л 2,4-Д и кинетина. Также во все опытные варианты сред вносили 2,0 мг/л индолил-3-уксусной кислоты (ИУК), с целью получения каллуса рыхлого типа еще на первых этапах культивирования. Так, в ходе оптимизации ростовых процессов листовой каллусной культуры пажитника ярового сорта было показано, что ИУК в вышеуказанной концентрации не оказывает влияния на рост каллуса, но индуцирует заметное изменение его консистенции, способствуя значительному разрыхлению клеточной массы [6]. В качестве углевода питательные среды содержали сахарозу в концентрации 30 г/л [7]. Культивирование каллусов осуществлялось в темноте в условиях микробиологического термостата при температуре 24,5 °С.

Влияние уровня сахарозы в питательной среде на прирост биомассы клеточных культур пажитника было изучено на питательных средах с наиболее оптимальным соотношением фитогормонов и включало тестирование 2 вариантов сред, в которых концентрация сахарозы составляла 40 и 50 г/л. Контролем служила среда МС, содержащая 30 г/л сахарозы.

С целью изучения влияния освещения на рост клеточных культур они культивировались на свету в условиях фитостата (14 ч свет/10 ч темноты) при комнатной температуре и интенсивности освещения 3000 лк на питательных средах, оптимизированных для их выращивания в условиях темноты. В качестве контроля использовались каллусы, культивируемые в темноте на тех же вариантах сред МС.

Для оценки ростовых процессов каллусов определяли удельную скорость роста (V , сут⁻¹) и время удвоения биомассы (T , сут) [8].

Исследование влияния состава питательной среды и условий освещения на рост клеточных культур осуществляли на протяжении 3-4 пассажей в 3 повторностях для каждого опытного варианта. Все результаты обработаны статистически. Данные в таблицах представлены в виде средних значений со стандартными ошибками средних [9].

В ходе изучения гормональной регуляции роста клеточных культур было показано, что листовой каллус *Trigonella foenum-graecum* озимого сорта демонстрировал наиболее высокие значения ростовых показателей ($V = 0,066$ сут⁻¹, $T = 11,2$ сут) при его культивировании в присутствии 1,0 мг/л 2,4-Д и 2,0 мг/л кинетина. Для стеблевого каллуса пажитника того же сорта, наиболее оптимальной оказалась среда, содержащая 2,4-Д и кинетин в концентрации 2,0 мг/л. Удельная скорость роста данной культуры *in vitro* составила 0,060 сут⁻¹, а время удвоения биомассы – 13,0 сут.

Каллус листового происхождения пажитника греческого ярового сорта наиболее высокие значения ростовых показателей имел при использовании среды, включающей 2,4-Д и кинетин в концентрации 2,0 мг/л, тогда как каллус стеблевого происхождения пажитника ярового сорта было целесообразно культивировать в присутствии 1,0 мг/л 2,4-Д и кинетина. В первом случае удельная скорость роста и время удвоения биомассы составили 0,045 сут⁻¹ и 15,9 сут соответственно, во втором – 0,062 сут⁻¹ и 11,7 сут соответственно.

На следующем этапе исследования, включающем изучение влияния содержания сахарозы в среде на прирост биомассы каллусов *Trigonella foenum-graecum* было установлено, что повышение ее концентрации до 40 г/л оказывало значительный стимулирующий эффект на рост листового и стеблевого каллусов пажитника греческого озимого сорта и стеблевого каллуса пажитника ярового сорта (табл. 1). Удельная скорость роста при этом была более чем в 2 раза выше относительно контроля. Дальнейшее повышение содержание сахарозы в среде до 50 г/л не приводило к столь значимому положительному эффекту. Каллус листового происхождения пажитника ярового сорта культивируемый в присутствии 40 и 50 г/л сахарозы демонстрировал в обоих случаях в 1,5 раза более высокую ростовую активность по сравнению с контролем. Таким образом, представленные результаты свидетельствуют о том, что для выращивания клеточных культур пажитника греческого целесообразно добавлять в питательную среду 40 г/л сахарозы.

Табл. 1

Влияние концентрации сахарозы на удельную скорость роста (V) каллусов пажитника греческого

Концентрация сахарозы, г/л	V, сут ⁻¹			
	каллус пажитника греческого озимого сорта		каллус пажитника греческого ярового сорта	
	листового происхождения	стеблевого происхождения	листового происхождения	стеблевого происхождения
30	0,066±0,005	0,060±0,007	0,045±0,003	0,062±0,007
40	0,141±0,022	0,144±0,013	0,070±0,005	0,146±0,027
50	0,098±0,009	0,085±0,006	0,070±0,006	0,051±0,006

В ходе исследования влияния условий освещения на показатели роста изучаемых клеточных культур было показано, что каллус стеблевого происхождения пажитника ярового сорта и листовой и стеблевой каллусы пажитника греческого озимого сорта, культивируемые на свету, демонстрировали более чем в 2 раза меньшую ростовую активность по сравнению с темновыми культурами *in vitro* (табл. 2). В то же время освещение не оказывало достоверного влияния на величины удельной ско-

рости роста и времени удвоения биомассы листового каллуса пажитника ярового сорта относительно контрольных значений.

Табл. 2

Влияние освещения на удельную скорость роста (V) каллусов пажитника греческого

Условия освещения	V, сут ⁻¹			
	каллус пажитника греческого озимого сорта		каллус пажитника греческого ярового сорта	
	листового происхождения	стеблевого происхождения	листового происхождения	стеблевого происхождения
темнота	0,141±0,022	0,144±0,013	0,070±0,005	0,146±0,027
свет	0,070±0,007	0,061±0,005	0,075±0,017	0,063±0,007

Таким образом, результаты, полученные в данном исследовании, позволяют заключить, что ростовые параметры всех инициированных клеточных культур пажитника греческого в значительной степени определяются концентрацией фитогормонов и сахарозы в среде культивирования, а также, для 3-х из 4-х каллусов, зависят от условий освещения. При этом не было выявлено зависимости скорости прироста биомассы клеточных культур при варьировании условий выращивания от их происхождения.

Представленные данные позволили оптимизировать состав питательных сред для культивирования темновых каллусов *Trigonella foenum-graecum*.

Литература

1. Street H. E. Plant tissue and cell culture. Oxford, 1977.
2. Rajagopalan M. S. Fenugreek, what this herb can offer? // Naturally. 1998. Vol. 1. P. 1–4.
3. Dawidar A. M., Saleh A. A., El-Motei S. L. Steroid sapogenin constituents of fenugreek seeds // Planta Medica. 1973. Vol. 24. P. 367-370.
4. Chatterjee A., Pakrashi S. C. The Treatise on Indian Medicinal Plants // Publications and Information Directorate. 1999. P. 125-126.
5. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1968. Vol. 15. №13. P. 473-497.
6. Юрин В. М., Макаш Ш., Решетников В. Н. и др. Получение каллусной культуры пажитника греческого и оптимизация условий ее роста // Труды Белорусского государственного университета. Сер. «Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем». 2009. Т. 4. Ч. 1. С. 219-225.
7. Шевелуха В. С., Калашикова Е. А., Дегтярев С. В. и др. Сельскохозяйственная биотехнология: учеб. М., 1998.
8. Загребельный С. Н. Биотехнология. Культивирование продуцентов и очистка продуктов. Новосибирск, 2000.
9. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. М., 1978.