

ВВЕДЕНИЕ *PERSEA AMERICANA* В КУЛЬТУРУ КЛЕТОК И ЕЁ АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА

А.Е. Савич

*Белорусский государственный университет,
arturnic777@gmail.com;
науч. рук.- А.О. Логвина, канд. биол. наук, доц.*

Целью работы было введение авокадо (*Perseaamericana*) в культуру клеток *invitro* и изучение антиоксидантного потенциала нативных растений и каллусных тканей различного происхождения. Из асептически выращенных растений авокадо были получены каллусные культуры трёх линий (листового, стеблевого и корневого происхождения), изучены особенности фитогормональной регуляции процесса каллусогенеза. Общее содержание фенольных соединений в листьях и стеблях растений авокадо статистически не различается и составляет 30 мг/г сух. м. Уровень накопления фенольных соединений в каллусных культурах определялся фитогормональным составом среды. Среди каллусных культур трёх типов наиболее высокие значения показателя (28 мг/г сух. м.) отмечены у каллусов стеблей на питательных средах, включающих 0,5 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты и 0,5 мг/л кинетина, а также 0,5 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты и 1,0 мг/л кинетина. Определение антиоксидантного потенциала экстрактов каллусов, выращенных на всех вариантах среды, показало, что их антирадикальная активность была достоверно более высокой, чем у экстрактов органов нативного растения. Восстановительная активность экстрактов каллусов, выращенных на всех протестированных вариантах среды, оказалась ниже, чем у экстрактов, полученных из органов нативного растения авокадо.

Ключевые слова: авокадо; персея американская; *Perseaamericana*; каллус; фитогормоны; содержание фенольных соединений; антиоксидантная активность.

Авокадо, или персея американская – вечнозелёное плодовое растение, произрастающее в тропиках и субтропиках Америки, Восточной и Юго-Восточной Азии, Африки. В биохимическом плане надземная масса и плоды авокадо имеет большую ценность, т.к. содержит огромное количество самых разнообразных соединений. Применяется в пищевой промышленности, в медицине, фармацевтике и косметологии.

Впервые клеточные культуры авокадо были получены в 70-80-х гг. 20 века [1]. Однако относительных успехов тогда добились только в микрклональном размножении. Кроме этого, в русскоязычной литературе отсутствуют упоминания о введении авокадо в культуру клеток.

В этой связи значительный интерес представляет получение культуры клеток авокадо, как с точки зрения рассмотрения в качестве альтернативного источника ценных веществ, так и с точки зрения пополнения отечественных коллекций клеточных культур.

Целью данной работы являлось введение авокадо в культуру клеток *invitro* и изучение антиоксидантного потенциала нативных растений и каллусных тканей разного происхождения.

В работе была использована основная питательная среда Мурасиге и Скуга (МС). При получении асептически выращенных растений авокадо применяли безгормональную среду МС. В ходе изучения гормональной регуляции эффективности каллусогенеза, дальнейшего их культивирования и определения биохимических характеристик в основную питательную среду МС вносили фитогормоны: ауксин – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д), цитокинин – кинетин. Концентрации указанных фитогормонов составляли 0,5 и 1,0 мг/л. Было протестировано 4 их комбинации. На протяжении инициации каллусной ткани экспланты находились в условиях микробиологического термостата при температуре 24°C в темноте. В тех же условиях выращивались полученные каллусные культуры. Растения авокадо получали из семян. Выращивали в грунте в условиях фитостата (14 ч света/10 ч темнота) при комнатной температуре и интенсивности света 3000 люкс. Для определения биохимических характеристик готовили 70 %-ные водно-спиртовые экстракты (соотношение сырья и экстрагента 1 : 100) путем настаивания смеси в течение 24 ч при непрерывном помешивании при комнатной температуре с последующим нагреванием на водяной бане в течение 1 ч при 70°C. В ходе количественного анализа фенолов в растительных объектах использовали метод Фолина-Чокальтеу с небольшими модификациями [2]. Содержание фенольных соединений в пробах выражали в мг/г сухой массы в эквиваленте галловой кислоты. Для определения антирадикальной активности экстрактов использовали метод DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил) [3]. Общую антиоксидантную (восстановительную) активность экстрактов оценивали фосфомолибденовым методом [4]. Показатели антиоксидантной активности проб выражали в мг/г сухой массы в эквиваленте аскорбиновой кислоты.

Первым этапом работы было введение авокадо (*Persea americana*) в культуру *invitro*. Сперва был получен источник стерильных эксплантов – асептически выращенное растение авокадо. В ходе инициации и изучения гормональной регуляции эффективности каллусогенеза мы использовали 4 варианта питательной среды МС, содержащих фитогормоны ауксиновой и цитокининовой природы в разных концентрациях.

На стеблевых эксплантах каллус появился уже на 10 сут культивирования, на листовых и корневых эксплантах формирование каллуса было зарегистрировано на 20 сут (рис.1).

Эффективность каллусогенеза была довольно высокой и составила для стеблевых эксплантов 100%, для листовых – 60%, для корневых – 80%.

Причем эффективность каллусогенеза не зависела от содержания фитогормонов.

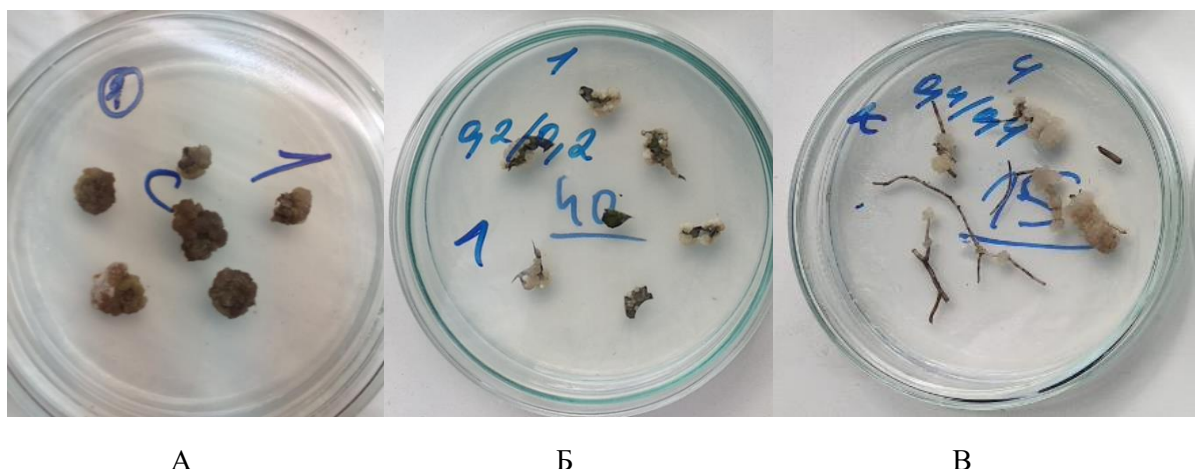


Рис.1 – Стеблевые (А), листовые (Б), корневые (В) экспланты персеи американской с образующимся кассусом на 20 сут культивирования на питательных средах с добавлением фитогормонов

Культивирование полученных каллусов продолжили на тех же 4 вариантах питательных сред.

Следующим этапом исследования было определение суммарного содержания фенольных соединения в листьях и стеблях нативных растений авокадо и полученных каллусных культур, а также изучение их антиоксидантного потенциала.

Было показано, что суммарное содержание фенолов в листьях и стеблях растений авокадо составляет около 30 мг/г сух. м. Содержание фенольных соединений также определяли во всех инициированных линиях каллусов, культивируемых на 4-х вариантах питательных сред, различающихся содержанием фитогормонов.

Наибольшие значения показателя, равные в среднем 28 мг/г сух. м., отмечены у каллусов стеблей на вариантах питательной среды, включающих 0,5 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетина, 2 – 0,5 мг/л 2,4-Д и 1,0 мг/л кинетина. У каллусов корней и листьев наивысшие значения показателя наблюдались в присутствии 0,5 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетина.

Можно отметить, что для всех вариантов питательной среды, суммарное содержание фенольных соединений уменьшается в следующем ряду: стеблевой каллус > корневой каллус > листовой каллус.

Для установления антиоксидантной активности экстрактов применяли несколько методов. Было обнаружено, что экстракты, полученные из листьев и стеблей, как и в случае уровня фенольных соединений, обладают практически равной способностью нейтрализовать свободные радикалы. Что касается экстрактов каллусов, выращенных на всех вариантах среды,

то их антирадикальная активность оказалась достоверно выше, чем у органов нативного растения. Полученные результаты можно объяснить тем, что в каллусах авокадо, вероятно, в большем количестве синтезируются соединения, дезактивирующие свободные радикалы. И это могут быть не только соединения фенольной природы.

У экстрактов листьев общая антиоксидантная активность была выше, чем у экстрактов стеблей. В отличие от результатов теста по определению радикал-ингибирующих свойств, значения показателя восстановительной активности для экстрактов каллусов оказались ниже, чем у нативного растения. Выявлено, что для сред, дополненных 0,5 мг/л 2,4-Д и кинетина, 0,5 мг/л 2,4-Д и 1,0 мг/л кинетина, 1,0 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетина обнаруживалась зависимость от типа эксплантов: более высокая восстановительная активность была у стеблевого и корневого каллусов. Кроме того, восстановительная активность экстрактов каллусов всех типов для данных вариантов сред коррелирует с содержанием фенолов.

Таким образом, в ходе проведенной работы из асептически выращенных растений авокадо были получены каллусные культуры трех линий (листового, стеблевого и корневого происхождения), изучены особенности фитогормональной регуляции процесса каллусогенеза, определено содержание фенольных соединений в органах нативных растений авокадо и инициированных клеточных культурах, оценены антиоксидантные свойства их экстрактов. Дальнейшая работа будет включать оптимизацию состава питательных сред для повышения показателей роста и биосинтетического потенциала каллусов авокадо.

Библиографические ссылки

1. Young M. J. Avocado callus and bud culture // Proceedings of the Florida State Horticultural Society. – 1983. Vol. 96. – P. 181–182.
2. Slinkard K., Singleton V. L. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods // American journal of enology and viticulture. – 1977. – Vol. 28. – P. 49–55.
3. Jastrzebski Z., [et al.]. In vitro studies of polyphenol compounds, total antioxidant capacity and other dietary indices in a mixture of plants (Prolipid) // International Journal of Food Sciences and Nutrition. – 2007. – Vol. 58, Iss. 7. – P. 531–541.
4. Prieto P., Pineda M., Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E // Analytical Biochemistry. – 1999. – Vol. 269. – P. 337–341.