

УДК 581.143

**ВЛИЯНИЕ САХАРОЗЫ И ГЛЮКОЗЫ НА ПОКАЗАТЕЛИ РОСТА
И СОДЕРЖАНИЕ УГЛЕВОДОВ В КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЕ
*CALLISIA FRAGRANS***

А.А. Булатова, М.П. Шапчиц, В.М. Юрин

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

Введение

В настоящее время достаточно остро стоит проблема укрепления отечественной лекарственной растительной базы. Особую значимость при решении этой проблемы приобретает вопрос рационального и комплексного использования как существующих официальных, так и поиск новых лекарственных растений – источников биологически активных веществ, способных расширить номенклатуру лекарственного сырья и лекарственных средств на их основе. Подобно нативным растениям клеточные культуры синтезируют широкий спектр углеводов и в перспективе могут иметь практическое значение для получения физиологически активных полисахаридов [1]. Клеточные культуры растений могут внести значительный вклад в разработку технологии получения биологически активных соединений.

В основе регулирования процессов синтеза биологически активных веществ лежит изучение влияния факторов культивирования на рост и метаболизм клеток. Большое значение имеют такие факторы культивирования, как регуляторы роста, минеральные вещества, витамины, сахара, свет, аэрация, температура, а также иммобилизация клеток, обработка элиситорами и др. [2].

Известно, что избыток или недостаток углерода вызывает различные реакции растительных клеток и оказывает значительное влияние на метаболизм, рост и развитие растения [3]. Культуры клеток могут расти на различных углеводах, но, как правило, лучший рост отмечается на двух источниках углерода: сахарозе и глюкозе [4]. Природа источника углерода оказывает влияние на биосинтез полисахаридов в культурах клеток растений, при этом может изменяться как количество, так и состав полисахаридов клеточных стенок [5].

В настоящее время большой интерес для исследования представляет растение *Callisia fragrans* (каллизия душистая или золотой ус), которое является уникальным источником биологически активных соединений. Согласно литературным данным [6] в *Callisia fragrans* содержатся 3 группы биологически активных веществ: стероиды (β-ситостерол), фенольные соединения (кверцетин, кемпферол) и полисахариды. В последние несколько лет появилось большое количество лекарственных препаратов на основе экстрактов *Callisia fragrans*. Между тем, углеводный состав *Callisia fragrans* практически не изучен [7].

Рост каллусной культуры и синтез метаболитов в ней определяется не только концентрацией и природой используемых углеводов, но зависит от вида и органа растения, из которого получена культура. В этой связи представлялось целесообразным исследовать влияние различных концентраций глюкозы и сахарозы в среде на рост каллусной культуры каллизии душистой и содержание в ней и в вегетативных органах растения углеводов.

Методы исследования

Каллусная культура *Callisia fragrans* стеблевого происхождения культивировалась на питательной среде Мурасиге и Скуга (МС) [8] с добавлением фитогормонов 2,4 D – 2 мг/л и кинетина – 0,2 мг/л, 8 г/л агара, в термостате в темноте при температуре 24±2°C.

Наиболее распространенным источником углерода для культур клеток является сахароза, однако достаточно часто используют глюкозу, фруктозу и галактозу [11]. В наших экспериментах использовались глюкоза и сахароза.

Исследование влияния уровня сахарозы и глюкозы в среде на прирост биомассы каллусной культуры каллизии душистой и накопление в ней углеводов включало тестирование 8 вариантов сред, в которых концентрация сахарозы составляла: 1%, 2%, 3% (контроль) и 4% и глюкозы: 1%, 2%, 3%, 4%.

В конце цикла культивирования (28-е сутки) определяли следующие ростовые параметры: индекс роста, удельная скорость роста, время удвоения биомассы. Индекс роста вычисляли по сырой массе по формуле: $I = (m_i - m_0)/m_0$, где m_0 и m_i (г) – исходная и конечная масса каллуса. Удельную скорость роста подсчитывали по формуле (μ , сут⁻¹): $\mu = ((m_i - m_0)/(m_0 t))$ где m_0 и m_i (г) – исходная и конечная масса каллуса (г). Время удвоения сухой биомассы (T, сут) определяли по формуле: $T = \ln 2 / \mu \cdot 10$ [9].

Результаты по динамике роста и накоплению углеводов в каллусных тканях каллизии душистой были статистически обработаны с использованием стандартного пакета программы Excel.

Содержание углеводов определяли *антроновым методом* в пересчете на глюкозу, позволяющим определять углеводы в малых концентрациях (до 0,2 мг в пробе). Экстракцию суммы углеводов (растворимых и крахмала) из каллусных тканей осуществляли серной кислотой и гидролизовали на кипящей водяной бане в течение 15 мин в колбе объемом 25 мл (при этом происходит гидролиз крахмала). Затем осветляли полученный раствор сернокислым цинком и желтой кровяной солью, доводили объём дистиллированной водой до 25 мл и фильтровали через бумажный фильтр. В другой колбе на 25 мл с навеской, предназначенной для определения растворимых углеводов, проводили извлечение их в течение 1 ч с 20 мл воды при периодическом взбалтывании. После этого экстракт так же осветляли, объём доводили до 25 мл и фильтровали. Для опыта брали по две пробирки для каждого экстракта и одну для контроля. К 1 мл полученного раствора добавляли 3 мл раствора антрона в концентрированной серной кислоте. Контролем служили пробирки с 3 мл антронового реактива, в которые прибавляли по 1 мл воды. Все пробирки быстро взбалтывали и помещали в кипящую водяную баню на 7 мин. После кипячения пробирки с растворами охлаждали до 20°C и затем определяли плотность на спектрофотометре Ultrospec 100 pro, при длине волны 610 нм в кювете с толщиной поглощающего слоя 10 мм [10].

Результаты и обсуждение

Углерод как компонент питательной среды, как отмечалось, играет важную роль в процессах роста и биосинтеза физиологически активных веществ в культурах клеток растений [11].

Из анализа результатов по индексу роста, удельной скорости роста и времени удвоения биомассы было выявлено, что культура каллизии отличалась лучшими показателями роста при выращивании на средах с глюкозой и сахарозой в концентрациях 2% и 3% по сравнению с содержанием те же углеводов 1% и 4%. Значения индекса роста культур на средах с 2% и 3% сахарозой составили 2,7 и 2,8, а с 2% и 3% глюкозой – 2,4 и 2,7, соответственно. Наименьшими показателями индекса роста характеризовались каллусные культуры, выращенные на среде с 1% содержанием сахарозы и глюкозы; показатели оказались равными и составили 1,3. Индексы роста для каллусных культур на средах с 4% содержанием сахарозы и глюкозы составили 1,9 и 2,1 соответственно (таблица).

С повышением уровня сахаров в среде до 4% наблюдается снижение ростовой активности, вероятно обусловленное повышенным осмотическим давлением. Действительно, для ряда клеточных культур показано, что низкие концентрации сахарозы (2%–4%) оптимальны для максимального роста и деления клеток, а высокие концентрации – 4% и выше уменьшают скорость роста за счет отрицательного водного и осмотического потенциала в среде, что является причиной снижения оптимального тургорного давления клеток [12].

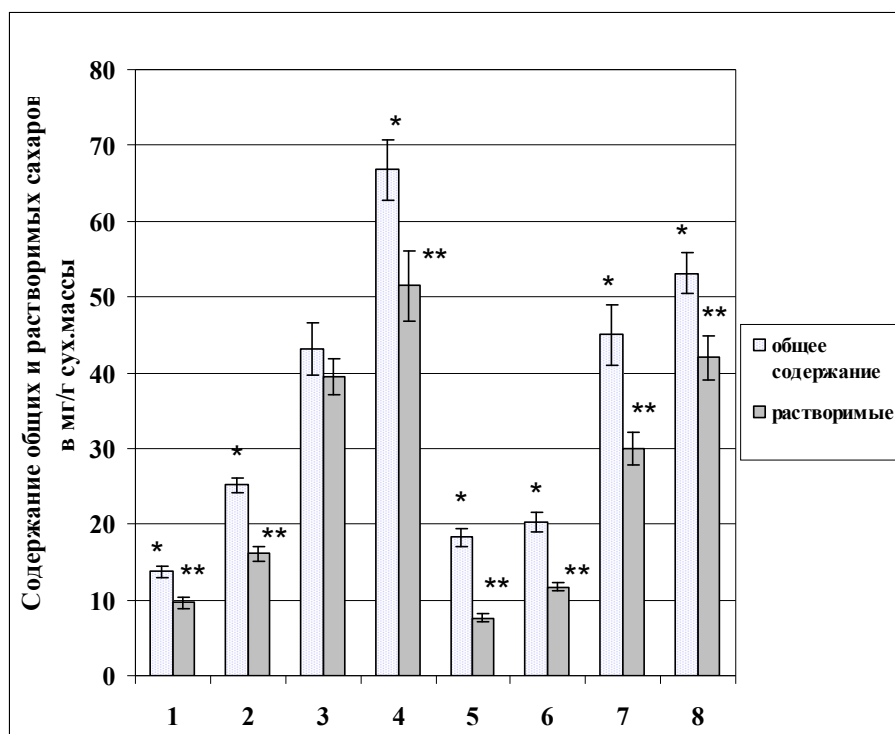
Таблица – Зависимость ростовых параметров клеточной культуры *Callisia fragrans* от концентрации сахарозы и глюкозы в среде

Состав среды Параметры роста	сахароза				глюкоза			
	1%	2%	3%	4%	1%	2%	3%	4%
Индекс роста	1,3 ±0,1	2,7 ±0,2	2,8 ±0,2	1,9 ±0,2	1,3 ±0,1	2,4 ±0,2	2,7 ±0,2	2,1 ±0,1
Удельная скорость роста, сут ⁻¹	0,05 ±0,01	0,1 ±0,01	0,1 ±0,01	0,07 ±0,01	0,05 ±0,01	0,09 ±0,01	0,1 ±0,01	0,08 ±0,01
Время удвоения биомассы, сут	13,8 ±1,4	6,9 ±0,6	6,9 ±0,6	9,9 ±0,8	13,8 ±1,4	7,7 ±0,5	6,9 ±0,4	8,6 ±0,8

Снижение концентрации сахарозы и глюкозы в среде до 1%, вызывает уменьшение индекса роста в 2 раза по сравнению с контролем. Как показано в работах других исследователей [13], снижение концентрации сахаров, либо их отсутствие, вызывает значительное замедление или полное прекращение роста клеток, быстрое потребление углеводов клетки и снижение скорости дыхания, деградацию липидов и протеинов, снижение активности ферментов. Очевидно, изменения в метаболизме включены в механизм адаптации растительных клеток в ответ на низкое содержание либо отсутствие углеводов.

Результаты по влиянию начальной концентрации сахарозы и глюкозы в среде на биосинтетические характеристики каллуса каллизии представлены на рисунке 1. Общее количество углеводов и содержание растворимых углеводов в каллусной культуре *Callisia fragrans* возрастало с увеличением концентрации сахарозы и глюкозы в среде. Большая часть углеводов в каллусной культуре каллизии была представлена растворимыми углеводами по отношению к общему содержанию. Клеточная культура каллизии, выращенная на средах со всеми исследуемыми концентрациями сахарозы (1%, 2%, 3% и 4%) содержала в 1,2–1,3 раза больше растворимых углеводов по сравнению с соответствующими концентрациями глюкозы. Суммарное содержание углеводов в каллусной культуре на средах с 2% и 4% концентрациями сахарозы также было выше по сравнению с 2% и 4% глюкозой, и составило 25,18 мг/г и 66,82 мг/г сухой массы и 20,3 мг/г и 53,13 мг/г, соответственно. Однако на средах с 1% и 3% концентрацией глюкозы суммарное содержание углеводов в культуре было выше, чем на средах с 1% и 3% сахарозой и составило 23 мг/г и 45 мг/г сухой массы и 13,7 мг/г и 43,2 мг/г сухой массы, соответственно.

Поскольку при введении растений в культуру клеток уровень синтеза биологически активных соединений может изменяться, что связано с уровнем дифференциации клеток, представлялось целесообразным сравнить накопление углеводов в каллусной культуре каллизии и органах нативного растения.



1– 1% сахароза, 2– 2% сахароза, 3– 3% сахароза (контроль), 4– 4% сахароза
 5– 1% глюкоза, 6– 2% глюкоза, 7– 3% глюкоза, 8– 4% глюкоза

Рисунок 1 – Зависимость содержания углеводов в каллусной культуре *Callisia fragrans* от концентрации сахарозы и глюкозы в среде

(представлены средние значения 5 экспериментов \pm стандартная ошибка средней величины)

* – различия достоверны по сравнению с контролем (общее содержание углеводов) при $p \leq 0,05$

** – различия достоверны по сравнению с контролем (содержание растворимых углеводов) при $p \leq 0,05$

Определение количества водорастворимых углеводов и суммы углеводов в вегетативных органах каллизии душистой показало наибольшее их содержание в верхушечных листьях побега – 7,9 мг/г и 18,7 мг/г сухой массы, соответственно. В горизонтальных стеблях и нижних листьях побега эти показатели составили 3,92 мг/г и 6,9 мг/г; 4,3 мг/г и 5,3 мг/г сухой массы, соответственно (рисунок 2). Суммарное содержание углеводов и количество растворимых углеводов в органах нативного растения в верхушечных листьях побега сравнимо с содержанием углеводов в каллусной культуре выращиваемой на средах с низкой концентрацией сахарозы или глюкозы (1%) в питательной среде, а на средах с 2–3–4% сахарозой и глюкозой этот показатель выше в 1,3–3,7 раза.

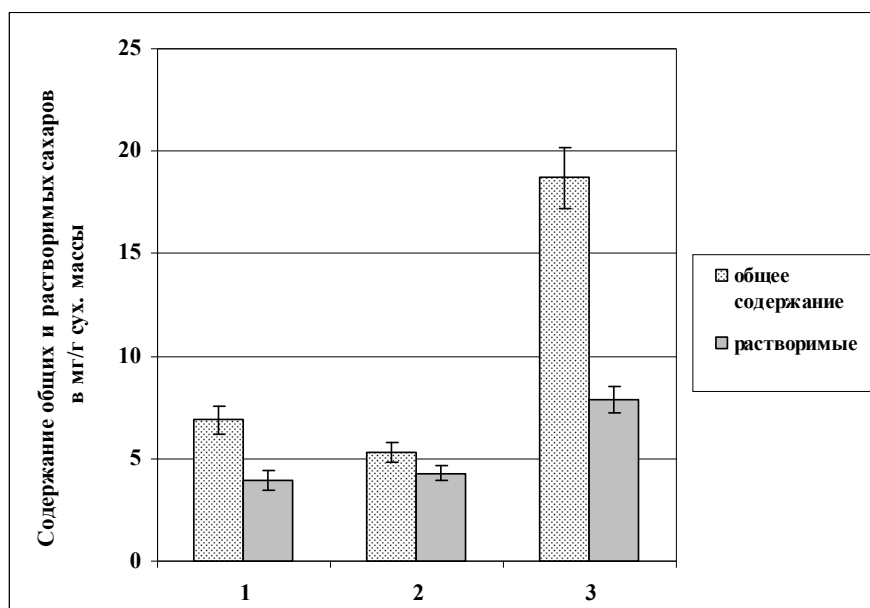


Рисунок 2 – Содержание углеводов в вегетативных органах нативного растения *Callisia fragrans* (1 – горизонтальный стебель, 2 – листья нижней части побега, 3 – листья верхней части побега)

Выводы

Таким образом, установлено, что для максимального наращивания клеточной биомассы каллизии душистой *in vitro* необходимо содержание углеводов в среде не менее 20–30 г/л (2%–3%). При 1%-ой и 4%-ой концентрации сахарозы и глюкозы в среде скорость роста каллусов замедлялась по сравнению со скоростью роста каллусов, выращиваемых в присутствии 2% и 3% углеводов в среде. С экономической точки зрения предпочтительнее использовать сахарозу, поскольку она дешевле глюкозы.

С увеличением концентрации сахарозы и глюкозы в культуральной среде суммарное содержание углеводов и количество растворимых углеводов в каллусной культуре каллизии душистой возрастает и максимально на средах с концентрацией глюкозы и сахарозы 4%. Изменение углеводного состава культуральной среды оказывает регуляторное влияние на биосинтез и улучшает продуцирование полисахаридов каллусной культурой каллизии душистой.

Список литературы

1. Goubet, F. Synthesis of cell wall galactans from Flax (*Linum usitatissimum* L.) Suspension-Cultured Cells / F.Goubet, C. Morvan // *Plant Cell Physiology*. – 1994. – Vol. 35, №5. – P. 719–727.
2. Бутенко, Р.Г. Культура клеток растений и биотехнология / Р.Г. Бутенко. – М.: Наука, 1986.
3. Yu, Su-May Cellular and Genetic Responses of Plants to Sugar Starvation / Su-MayYu // *Plant Physiology*. – 1999. – Vol. 121. – P. 687–693.
4. Stepan-Sarkissian, G. Carbohydrate metabolism in plant cells / G. Stepan-Sarkissianand, M.W. Fowler // Plenum Press, New York, London. – 1986. – P. 151–181.
5. Холодова, В.П. Культура клеток растений / В.П. Холодова (под ред. Бутенко Р.Г.) // М.: Наука. – 1981. – С.17–36.
6. Оленников, Д.Н. Химический состав сока Каллизии душистой (*Callisia fragrans wood.*) и его антиоксидантная активность *in vitro* / Д.Н. Оленников, И.Н. Зилфикаров, А.А. Торопова // *Химия растительного сырья*. – 2008. – №4. – С. 95–100.

7. Мышкина, В.И. Изучение углеводного состава водных экстрактов *Callisia fragrans* / В.И. Мышкина, А.Б. Шиповская // Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья. – 2007. – №1. – С.224–228.
8. Murasshige, T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murasshige, F.Skoog // *Physiology Plantarum*. – 1962. – Vol. 15. – P. 473–497.
9. Загребельный, С.Н. Биотехнология. Часть 1. Культивирование продуцентов и очистка продуктов / С.Н. Загребельный // Новосибирск: Новосиб. Гос. Ун-т. – 2000.
10. Мокроносов, А.Т. Малый практикум по физиологии растений / А.Т. Мокроносов. – М. – 1994.
11. Barnett, J.A. The Utilization of disaccharides and some other sugar by yeast / J.A Barnett // *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. – 1981. – Vol. 39. – P. 347–404.
12. Seijo, G. Effect of preculture with sucrose and ABA on cell suspension water status and its relation with vitrification resistance / G. Seijo // *Revista Brasileira de Fisiologia Vgeta*. – 2000. – Vol. 12. – P. 35–50.
13. Гюнтер, Е.А. Продукция полисахаридов каллусной культурой в зависимости от углеводов среды / Е.А. Гюнтер, Ю.С. Оводов // *Биохимия* – 2003. – Т. 68, вып. 8. – С. 1079–1087.
14. Endreb, R. *Plant Cell Biotechnology* / R. Endreb. – Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York. – 1994. – P. 353.

**INFLUENCE OF SUCROSE AND GLUCOSE ON CHARACTERISTICS
OF GROWTH AND CONTENT OF CARBOHYDRATES IN CALLUS CULTURE**

CALLISIA FRAGRANS

A.A. Bulatova, M.P. Shapchits, V.M. Yurin

Belarusian State University, Minsk, Belarus

In work investigated influence of various concentrations of sucrose and glucose in the medium on growth and accumulation of carbohydrates in callus culture *Callisia fragrans*. It is established that for the maximum growth callus culture the content of carbohydrates in the environment – 2–3 % is necessary. With increase in concentration of sucrose and glucose from 1 to 4 % the content of carbohydrates in callus culture increases in the environment and is maximum at 4 %.