

ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ РОСТА КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР ПАЖИТНИКА ГРЕЧЕСКОГО

А.О. Логвина, В.М. Юрин

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

Введение

В настоящее время одним из важнейших направлений биотехнологии растений является разработка приемов культивирования клеток в условиях *in vitro* с целью получения ценных фармакологически активных веществ. Перспективность широкого применения данной технологии в будущем определяется преимуществами, которые может дать производителям выращивание клеточных культур по сравнению с классическими способами получения фитомассы. Наиболее важными из таких преимуществ являются полная независимость культивирования от климатических условий и возможность контролировать все этапы производственного процесса.

Интерес к культурам клеток продолжает возрастать в связи с тем, что, во-первых, природные ресурсы многих ценных лекарственных трав истощаются, во-вторых, увеличение объемов получаемой биомассы культивируемых растений часто не представляется возможным из-за трудности акклиматизации и выращивания некоторых ценных растений-продуцентов в новых природных условиях. Использование технологии клеточных культур *in vitro* позволит решить проблему дефицита исходного сырья для фармацевтической промышленности и увеличить масштабы производства лекарственных препаратов [1, 2, 3].

Целесообразность инициирования и дальнейшего использования клеточных культур в подобных производствах определяется многими условиями. Важнейшим из них является правильный выбор растительного объекта, так как клеточные культуры, наследуя генетическую информацию исходного растения, приобретают и его способность синтезировать вторичные метаболиты [4]. Поэтому, как правило, выбор исследователей падает на растения, обладающие какими-либо уникальными биосинтетическими свойствами. Одним из таких растений является пажитник греческий (*Trigonella foenum-graecum* L.) [5, 6]. Его уникальность определяется способностью синтезировать стероидные сапонины – вещества, наличие которых обуславливает такие важные с точки зрения современной медицины свойства, как противораковая [7] и противодиабетическая активности [8].

Известно, что содержание веществ вторичного происхождения в культурах *in vitro* может быть значительно ниже, чем в интактном органе растения, служившего источником эксплантов при инициировании каллусов. Эту проблему можно решить двумя путями: увеличением биосинтетического потенциала клеточных культур в отношении целевых метаболитов или стимуляцией их роста, в результате чего недостаток количества вторичных веществ будет компенсироваться значительным объемом исходного сырья. В обоих случаях необходимо изучить особенности роста клеточных культур, как наиболее важную их характеристику. Обычно рост популяции культивируемых клеток оценивают по их общей биомассе. Несмотря на асинхронность популяции и относительную самостоятельность составляющих ее клонов, клетки *in vitro* в целом проходят фазы ростового цикла, характерные для роста клеток высших растений *in vivo* [3].

В связи с этим целью данной работы явилось исследование динамики прироста биомассы каллусных культур пажитника греческого.

Методы исследования

Объектами изучения служили каллусные культуры стеблевого и листового происхождения пажитника греческого ярового и озимого сортов, так как известно, что происхождение культур *in vitro*, в частности тип первичных эксплантов и сорт растения,

могут в значительной степени определять их биосинтетический потенциал [1]. Исследуемые каллусы были инициированы в ноябре 2009 г.

Для приготовления плотной среды во всех экспериментах был использован агар в концентрации 8 г/л. Величина рН питательных сред до автоклавирования составляла 5,7–5,8 [9]. Питательные среды стерилизовались путем автоклавирования при 0,5 атм и 130°C в течение 30–40 мин.

Минеральная основа питательного раствора соответствовала среде Мурасиге и Скуга (МС) [10]. Для индукции каллусогенеза и поддержания культур *in vitro* в дедифференцированном состоянии среды МС дополняли следующими регуляторами роста: 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой (2,4-Д), кинетином, индолил-3-уксусной кислотой (ИУК).

Каллусные культуры выращивались в темноте в условиях микробиологического термостата при температуре 24,5°C. Пассирование проводили через 35 суток после переноса небольших фрагментов каллуса на свежую питательную среду.

Для изучения динамики прироста биомассы определяли индекс роста в ходе ростового цикла каллусов. Данный показатель рассчитывали по формуле: $I = (m_{\max} - m_0) / m_0$, где m_0 и m_{\max} – сырая масса каллусов в начале цикла выращивания и непосредственно перед его пассированием, соответственно [11].

Эксперименты проводили на протяжении 3 пассажей. Все результаты обработаны статистически [12]. Данные на графиках представлены в виде средних значений со стандартными ошибками средних.

Результаты и обсуждение

Обязательным условием при использовании каллусных тканей в качестве продуцентов биологически активных соединений является стабильность ростовых характеристик, так как в данном случае ее можно наращивать непрерывно и вне зависимости от сезона года.

В связи с этим на первых этапах исследования были оптимизированы ростовые процессы каллусных культур пажитника греческого путем варьирования концентрации фитогормонов и сахарозы в питательной среде.

Полученные результаты позволили установить, что с целью поддержания клеточных культур *Trigonella foenum-graecum* целесообразно использовать питательные среды МС, включающие:

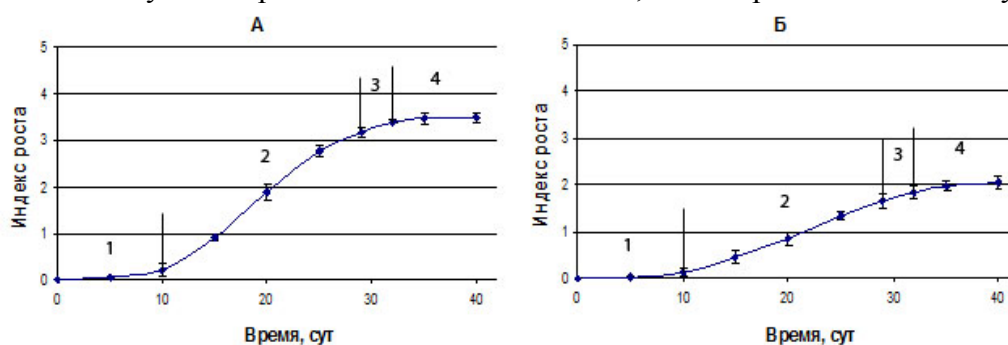
- 1,0 мг/л 2,4-Д, 2,0 мг/л кинетина, 2,0 мг/л ИУК, 40 г/л сахарозы для листового каллуса пажитника озимого сорта;
- 2,0 мг/л 2,4-Д, 2,0 мг/л кинетина, 2,0 мг/л ИУК, 40 г/л сахарозы для стеблевого каллуса пажитника озимого сорта;
- 2,0 мг/л 2,4-Д, 2,0 мг/л кинетина, 2,0 мг/л ИУК, 40 г/л сахарозы для листового каллуса пажитника ярового сорта;
- 1,0 мг/л 2,4-Д, 1,0 мг/л кинетина, 2,0 мг/л ИУК, 40 г/л сахарозы для стеблевого каллуса пажитника ярового сорта.

Культивирование инициированных каллусов на приведенных вариантах питательных сред позволило значительно интенсифицировать ростовые процессы последних, поэтому именно данные питательные растворы были использованы в экспериментах по изучению особенностей роста исследуемых объектов.

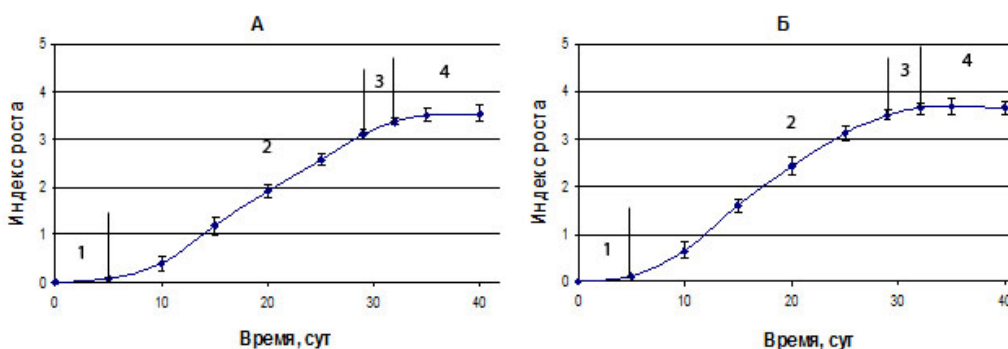
На рисунке 1 представлены графики, отражающие динамику накопления биомассы в ходе ростового цикла листового и стеблевого каллусов пажитника греческого ярового сорта.

Так, показано, что рост обоих каллусов характеризуются довольно длительной лаг-фазой: до 10 сут культивирования практически отсутствует видимый рост объектов. Начиная с 11 сут, наблюдается увеличение ростовой активности каллусных тканей, что свидетельствует о переходе клеток в экспоненциальную фазу накопления биомассы, продолжающуюся до 29 сут культивирования. Далее происходит замедление ростовых процессов, после чего кривая роста выходит на плато и дальнейшие изменения массы

незначительны. Показано, что, несмотря на сходство в продолжительности фаз ростового цикла, листовая каллус пажитника греческого ярового сорта демонстрирует в 1,8 раза более высокое значение индекса роста на стационарной стадии роста по сравнению со стеблевым каллусом. В данном случае можно говорить о наличии зависимости между ростовыми показателями каллусов и происхождением эксплантов, на которых они были получены.



Фазы роста: 1 – латентная; 2 – логарифмическая; 3 – замедления роста; 4 – стационарная
Рисунок 1 – Кривые роста каллусных культур листового (А) и стеблевого (Б) происхождения пажитника греческого ярового сорта



Фазы роста: 1 – латентная; 2 – логарифмическая; 3 – замедления роста; 4 – стационарная
Рисунок 2 – Кривые роста каллусных культур листового (А) и стеблевого (Б) происхождения пажитника греческого озимого сорта

Что касается особенностей роста клеточных культур, инициированных на фрагментах пажитника греческого озимого сорта, то необходимо отметить, что и их ростовые кривые имеют практически одинаковую форму (рисунок 2), причем отличающуюся от кривых роста каллусов пажитника ярового сорта продолжительностью латентной и экспоненциальной фаз. Для обеих клеточных культур фаза скрытого роста длится в течение 5 сут, после чего наблюдается логарифмическое увеличение количества клеток за счет их интенсивного деления. Начиная с 29 сут культивирования, скорость ростовых процессов каллусных тканей пажитника греческого ярового сорта сильно замедляется, что свидетельствует о вступлении клеток в стационарную фазу роста. При этом в отличие от каллусов пажитника ярового сорта, в индексах роста клеточных культур пажитника озимого сорта, демонстрируемых на стационарной фазе роста, не выявлено статистически достоверных различий.

Выводы

Полученные результаты свидетельствуют о том, что ростовые кривые всех исследуемых каллусных культур имеют стандартную S-образную форму. При этом рост культур *in vitro* пажитника греческого ярового и озимого сортов характеризуется различиями в продолжительности латентной и экспоненциальной фаз ростового цикла, поэтому можно говорить о том, что в некоторой степени особенности накопления биомассы каллусами в ходе культивирования определяются сортом растения, служившего источником эксплантов. Также необходимо отметить, что интенсивность ростовых процессов каллусов пажитника

ярового сорта определяется типом эксплантов, а для клеточных культур пажитника озимого сорта подобная зависимость не выявлена.

Анализ данных, позволил установить, что оптимальный срок выращивания каллусных культур пажитника греческого составляет 35 сут. После указанной продолжительности культивирования обязательным условием для поддержания интенсивного роста каллусов является перенос их фрагментов на свежие питательные среды.

Представленные результаты будут служить основой в последующих исследованиях по изучению динамики накопления вторичных метаболитов в культуре пажитника греческого в ходе ростового цикла.

Авторы статьи выражают благодарность профессору кафедры лекарственных и ароматических растений Западно-Венгерского университета Шандору Макай за любезно предоставленные семена пажитника греческого.

Список литературы

1. Street, H.E. Plant tissue and cell culture / H.E. Street. – Oxford: Blackwell Scientific, 1977. – 614 p.
2. Волова, Т.Г. Биотехнология / Т.Г. Волова. – Новосибирск: Изд-во Сибирского отделения Российской Академии наук, 1999. – 252 с.
3. Бутенко, Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: учеб. пособие / Р.Г. Бутенко. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
4. Цыренов, В.Ж. Основы биотехнологии: Культивирование изолированных клеток и тканей растений: Учебно-методическое пособие / В.Ж. Цыренов. – Улан-Удэ: ВСГТУ, 2003. – 58 с.
5. Nadkarni, A.K. Indian Materia Medica / A.K. Nadkarni // Popular Prakashan pvt. Ltd. – Bombay, 1982. – P. 1240–1243.
6. Rajagopalan, M.S. Fenugreek, what this herb can offer? / M.S. Rajagopalan // Naturally. – 1998. – Vol. 1. – P. 1–4.
7. Diosgenin, a Steroid Saponin of *Trigonella foenum-graecum* (Fenugreek), Inhibits Azoxy methane-Induced Aberrant Crypt Foci Formation in F344 Rats and Induces Apoptosis in HT-29 Human Colon Cancer Cells / R. Jayadev [et al.] // Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention. – 2004. – Vol. 13. – P. 1392–1398.
8. Jefferson, C. Fenugreek in diabetes management / C. Jefferson // New Montana Pharmacist. – 1999. – Vol. 23. – P. 1–2.
9. Endreb, R. Plant Cell Biotechnology / R. Endreb. – Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1994. – 353 p.
10. Murashige, T.A. revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T.A. Murashige, F. Skoog // *Physiol. Plant.* – 1968. – Vol. 15, № 13. – P. 473–497.
11. Загребельный, С.Н. Биотехнология. Культивирование продуцентов и очистка продуктов / С.Н. Загребельный. – Новосибирск.: Новосиб. гос. ун-т, 2000. – 108 с.
12. Рокицкий, П.Ф. Биологическая статистика / П.Ф. Рокицкий. – М.: Высш. шк., 1978. – 312 с.

THE STUDY OF GROWTH DINAMICS OF FENUGREEK CALLUS CULTURES

H.O. Lohvina, V.M. Yurin

Belarusian State University, Minsk, Belarus

In the course of conducted research the biomass accumulation dynamics of leaf and stem origin calluses of spring and winter fenugreek varieties was studied, and the optimal term of their growing was found out. It was shown that the growth curves of the all studied cultures *in vitro* were standard S-shaped, and callus growth characteristics depended on their origin. To maintain the intensive growth callus fragments should be transferred on fresh culture medium after 35th day of cultivation.