

© ЛЮБАКОВСКАЯ Л. А., 2010

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННЫХ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА ПРОЦЕССЫ МОРФОГЕНЕЗА В КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЕ СИРЕНИ (*SYRINGA VULGARIS* L.)

ЛЮБАКОВСКАЯ Л. А.

*УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»;
кафедра фармакогнозии и ботаники*

Резюме. Изучено влияние экзогенных фенольных соединений (ФС) и их предшественников на содержание ФС и реализацию морфогенетического потенциала в каллусе сирени цветкового происхождения. В процессе исследования установлено, что при культивировании каллуса на средах в присутствии экзогенных фенольных соединений и их предшественников на 20-й день культивирования содержание суммы фенольных соединений в каллусной культуре сирени в 6-10 раз выше по сравнению с контрольной средой. Наиболее эффективной средой для индукции морфогенетических процессов явилась среда, содержащая 6,1 мг/л рутин + 1,65 мг/л фенилаланина (среда 5). Введение экзогенных фенольных соединений в среду культивирования позволяет сократить время выращивания каллуса для максимального накопления суммы фенольных соединений в три раза.

Ключевые слова: сирень, фенольные соединения, каллус.

Abstract. The influence of exogenous phenol compounds (PhC) and their precursors on the content of PhC and realization of the morphogenetic potential in the lilac callus culture of the flower origin has been studied. During the investigation it has been found that when callus is cultured on the media in the presence of exogenous phenol compounds and their precursors on the 20th day of cultivation the content of the amount of phenol compounds in callus culture of the lilac is 6-10 times higher in comparison with the control medium. The most effective medium for the induction of morphogenetic processes turned out to be the medium containing 6,1 mg/l of rutin + 1,65 mg/l of phenylalanine (medium 5). Inclusion of exogenous phenol compounds in the cultivation medium helps to reduce the time of growing callus to maximize accumulation of phenol compounds three times.

Изучение процессов индукции морфогенеза является наиболее важным этапом многих биотехнологических исследований. Особый интерес представляет изучение морфогенетических потенциалов изолированных тканей, поскольку особенности морфогенетических реакций предопределяют возможности использования изолированных культур в различных клеточных технологиях. Для решения этих проблем широко использу-

ется экспериментально созданная система – культура клеток *in vitro*, обеспечивающая воспроизводимые результаты при строго определенных условиях [1, 2]. Известно, что процессы каллусо- и морфогенеза строго индивидуальны и в значительной степени лимитируются генотипом. Однако в литературе имеются данные, свидетельствующие о возможности генотипнезависимой регенерации [3]. Следовательно, должны существовать и другие механизмы, принимающие участие в регуляции процессов морфогенеза.

Важная роль в растениях отводится вторичным метаболитам, определяющим специ-

Адрес для корреспонденции: 210023, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27, Витебский государственный медицинский университет, кафедра фармакогнозии и ботаники. – Любаковская Л.А.

фические свойства растений. Фенольные соединения – вторичные метаболиты, характерные для всех видов растений [4, 5]. Роль ФС в процессах морфогенеза неоднозначна. Так, показано, что ФС регулируют процессы роста и развития, являясь модуляторами катаболизма ИУК (индолил уксусной кислоты). К примеру, синаповая и феруловая кислоты ингибируют ферментативное окисление ИУК, что приводит к удлинению и делению клеток и, как следствие, к росту и развитию растений [6, 7]. В культуре клеток ФС, в зависимости от вида растения, могут оказывать как стимулирующее, так и ингибирующее влияние на рост и развитие [8].

Сирень обыкновенная (*Syringa vulgaris* (L.)) является широко распространенным древесным растением, используемым в различных областях: в медицине, парфюмерной промышленности и др. [9, 10]. Кроме того, существует большое разнообразие сортов сирени, коллекции которых имеются в Ботанических садах различных стран. Однако существуют трудности семенного, вегетативного размножения этих растений. Следовательно, одной из возможностей является использование культуры клеток для размножения и сохранения ценного генофонда культивируемых форм. Как и для всех древесных растений, введение сирени в культуру имеет некоторые сложности, связанные с длительностью онтогенеза, а также нерешенности вопроса, каким путем реализуется морфогенетический потенциал данного растения. В литературе отсутствуют данные, касающиеся изучения сирени в изолированной культуре *in vitro*.

Цель исследования – изучение влияния экзогенных фенольных соединений и их предшественников, длительности культивирования каллуса цветкового происхождения сирени, на индукцию процессов морфогенеза.

Методы

Объектом исследования явилась стабильная каллусная культура цветкового происхождения, сирени (*Syringa vulgaris* (L.)), сорта «М.Шолохов», поддерживаемая в культуре Центрального ботанического сада НАН Беларуси.

Каллус цветкового происхождения выращивали на модифицированной среде Мурасиге и Скуга [13], содержащей экзогенные ФС и их предшественники: среда 1 – контрольная среда, не содержащая ФС и их предшественников; среда 2 – содержащая 6,1 мг/л рутина; среда 3 – 6,1 мг/л кверцетина; среда 4 – 1,65 мг/л фенилаланина; среда 5 – 6,1 мг/л рутина + 1,65 мг/л фенилаланина; среда 6 – 6,1 мг/л кверцетина + 1,65 мг/л фенилаланина.

Продолжительность культивирования 60 суток. В качестве анализируемых промежутков взяты 20-й, 40-й и 60-й дни, соответствующие лаг-, экспоненциальной и стационарной фазам ростового цикла каллусной культуры сирени [17]. На каждом этапе исследования взято по 10 параллелей.

Содержание суммы ФС определяли, используя реагент Фолина-Чекольтеу [15, 16]. Экстракцию ФС проводили 70% этанолом в соотношении каллус : экстрагент – 1 : 10 (г/мл), в течение 18 часов, при t° – 60°C, в термостате марки ТС – 80М. Экстракт фильтровали. 0,4 мл экстракта смешивали с 9,6 мл дистиллированной воды, 0,2 мл реактива Фолина – Чекольтеу и 2,0 мл 10% Na_2CO_3 . Смесь инкубировали при комнатной температуре 30 мин. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре СФ-46 в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 720 нм. В раствор сравнения вместо экстракта добавляли воду очищенную. Галловую кислоту использовали для построения стандартной кривой. Сумму фенольных соединений рассчитывали мг/г сырого веса каллуса.

Гистологический анализ каллуса проводили в анализируемые промежутки времени. Для гистологического анализа материал фиксировали в 10% формалине, приготовленном на фосфатном буфере, рН 7,2. Образцы дегидрировали через ряд этилового спирта (60, 70, 80, 96°), ксилол, спирт : ксилол (1:1) и заключали в гистомикс. Срезы толщиной 6-10 мкм готовили на микротоме Leica (Германия), окрашивали гематоксилин – эозином и обезживали, проводя через серию этилового спирта [15, 18]. Световую микроскопию проводили на микроскопе Leica 2500 (Германия).

Статистический анализ данных был проведен с использованием пакета прикладных программ Statistica 6,0 (RUS) фирмы STATSOFT-RUSSIA [19] с использованием модулей: непараметрической статистики с использованием критерия «Wald-Wolfowitz runs test», «Mann-Whitney U-test», «Kolmogorov – Smirnov two – sample test» для независимых выборок, анализа вариантов на основе дисперсионного анализа, регрессионного анализа. Уровень достоверной вероятности определяли с учетом поправки Бонферони.

Результаты и обсуждение

Особый интерес при разработке клеточных технологий представляет изучение морфогенетических потенций изолированных тканей и возможных индукторов данного процесса [11-14]. В качестве индукторов нами выбраны ФС как наиболее распространенная группа вторичных метаболитов, характерная для каждого вида растений. Было изучено содержание суммы ФС в каллусе, культивируемом на различных средах и в среде культивирования, и возможность реализации морфогенетического потенциала в процессе культивирования на данных средах.

При оценке данных полученных в ходе двухфакторного дисперсионного анализа, было установлено, что содержание ФС в каллусе на 20-й день культивирования было выше на всех средах по сравнению с 40-м и 60-м днем (рис.1). По сравнению с контролем (среда 1) содержание суммы ФС (20-й день) в каллусной культуре, выращенной на средах 2 - 6 было выше в 6-10 раз. Самое высокое содержание суммы ФС (1,72 и 0,91 мг/г сырого веса каллуса) в культуре клеток наблюдали на среде 5 (рутин + фенилаланин) на 20-й и 40-й день культивирования (рис.1). На 60-й день наибольшее содержание ФС (0,4 мг/г сырого веса каллуса) наблюдали на среде 4.

Приведенные выше данные подтверждены с помощью регрессионного анализа (рис.2).

Регрессионный анализ показал, что содержание ФС в среде культивирования на 20-й и 40-й дни культивирования во всех средах было в 2-20 раз ниже, чем в каллусной культуре, тогда как на 60-й день культивирования содержание ФС в среде увеличилось по сравнению с 20-м и 40-м днем (рис.3). Оценка параметров уравнения регрессии, проведенного с помощью критерия Краскелла-Уоллеса

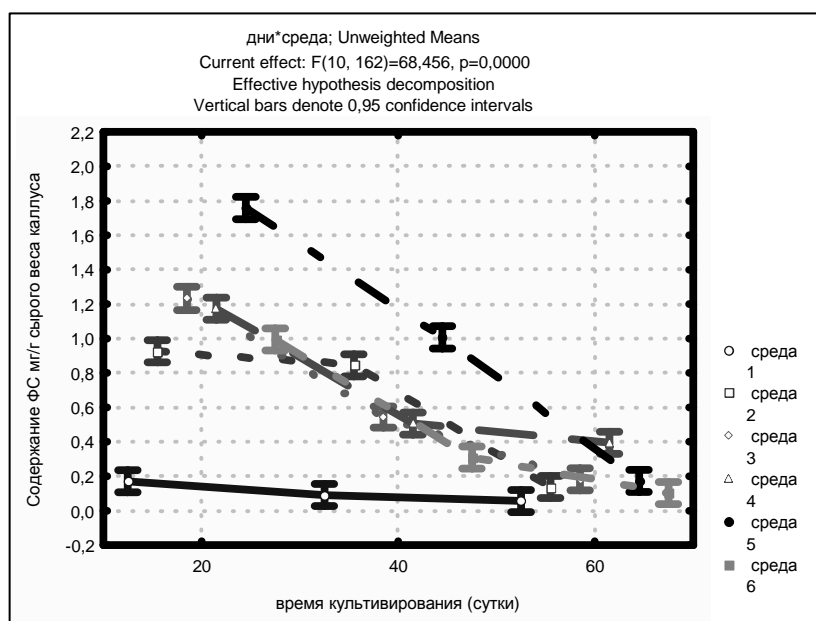


Рис.1. Содержание суммы фенольных соединений в каллусной культуре сирени цветкового происхождения в динамике культивирования на средах различного состава.

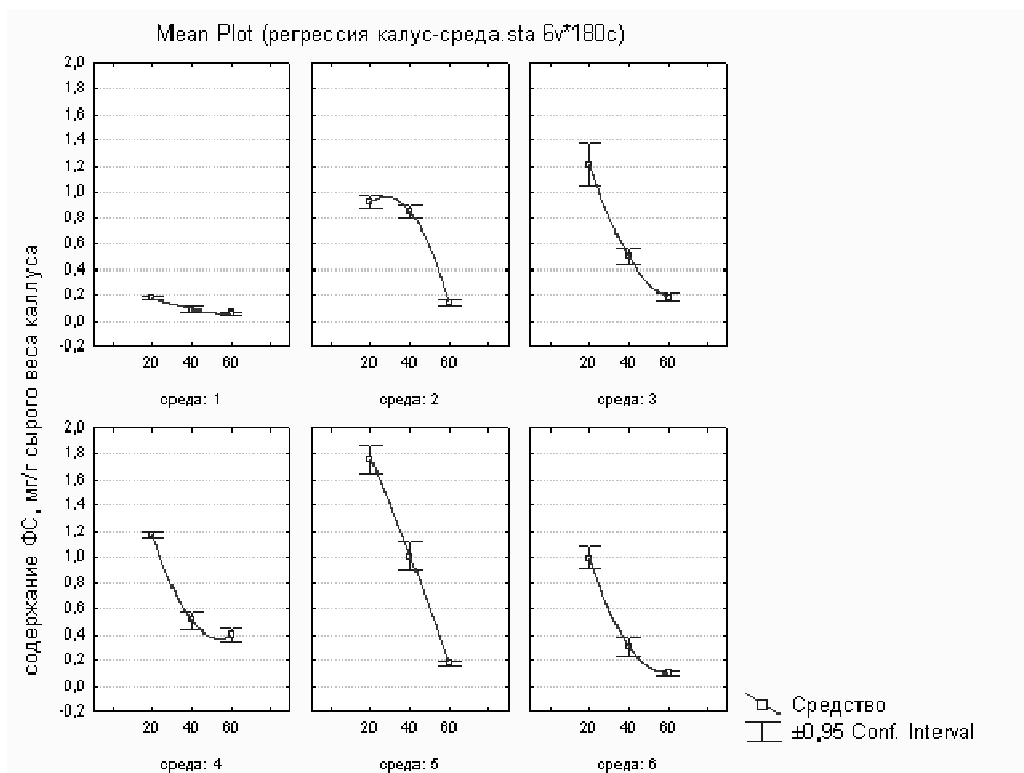


Рис. 2. Регрессионный анализ динамики накопления суммы фенольных соединений в каллусе сирени цветкового происхождения, выращенного на разных средах.

Примечание:

Уравнения регрессии:

среда: 1 $y = 0,297 - 0,1483 * x + 0,0227 * x^2$; среда: 2 $y = 0,3836 + 0,8562 * x - 0,3127 * x^2$;

среда: 3 $y = 2,3095 - 1,297 * x + 0,196 * x^2$; среда: 4 $y = 2,3938 - 1,4982 * x + 0,2773 * x^2$;

среда: 5 $y = 2,426 - 0,6263 * x - 0,0415 * x^2$; среда: 6 $y = 2,1602 - 1,4058 * x + 0,24 * x^2$

Оценки параметров уравнений регрессии:

среда 1: содержание ФС в каллусе: KW-H(2,30) = 24,2488538, $p = 0,000005$; F(2,27) = 111,352676, $p = 0,0000$;

среда 2: содержание ФС в каллусе: KW-H(2,30) = 21,539537, $p = 0,00002$; F(2,27) = 518,909453, $p = 0,00000$;

среда 3: содержание ФС в каллусе: KW-H(2,30) = 25,8064516, $p = 0,000002$; F(2,27) = 124,048724, $p = 0,0000$;

среда 4: содержание ФС в каллусе: KW-H(2,30) = 21,236129, $p = 0,00002$; F(2,27) = 283,603449, $p = 0,0000$;

среда 5: содержание ФС в каллусе: KW-H(2,30) = 25,8064516, $p = 0,000002$; F(2,27) = 389,106805, $p = 0,00000$;

среда 6: содержание ФС в каллусе: KW-H(2,30) = 25,8064516, $p = 0,000002$; F(2,27) = 252,749679, $p = 0,0000$.

и критерия Фишера, показала высокую степень достоверности полученных результатов ($p << 0,01$).

По имеющимся в литературе данным, для многих каллусных культур показано, что максимальное накопление ФС происходит в стационарную фазу роста культуры клеток [5, 6]. В нашем эксперименте максимальное накопление ФС наблюдали на 20-й день культивирования, который соответствует лаг - фазе роста культуры клеток.

Морфологические и гистологические характеристики каллуса, культивируемого на различных средах, отличались.

Среда 1 (контрольная среда). На 20-й день культивирования каллус был светло-коричневого цвета, рыхлый, мягкой консистенции. По данным гистологического исследования каллус представлен рыхло расположенными, изодиаметрическими паренхимными клетками, среди которых имеются мелкие клетки с небольшим ядром, расположенным в центре. Такая структура каллуса сохранялась до конца культивирования (20-й – 60-й день), появления морфогенетических очагов не отмечено.

Среда 2 (рутин). На 20-й и 40-й день культивирования каллус представлял собой

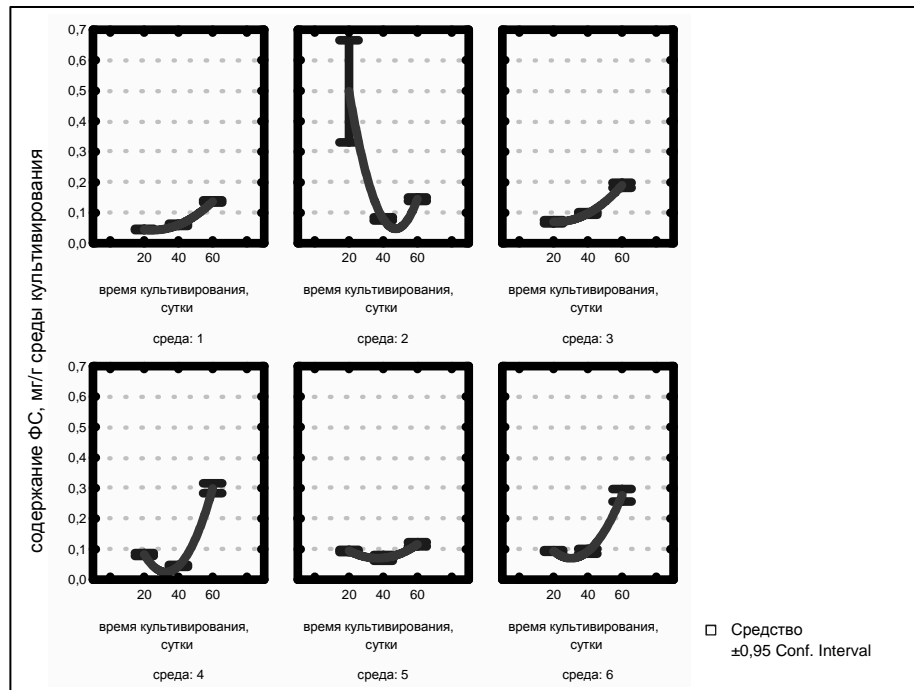


Рис.3. Регрессионный анализ динамики накопления суммы фенольных соединений в среде культивирования каллуса сирени.

Примечание:

Уравнения регрессии:

среда 1: $Y = 0,0913 - 0,0768 * x + 0,0307 * x^2$;

среда 3: $Y = 0,1095 - 0,0718 * x + 0,0329 * x^2$;

среда 5: $Y = 0,185 - 0,1247 * x + 0,0339 * x^2$;

среда 2: $Y = 1,4011 - 1,1443 * x + 0,2418 * x^2$;

среда 4: $Y = 0,4129 - 0,4769 * x + 0,1463 * x^2$;

среда 6: $Y = 0,2794 - 0,2784 * x + 0,0925 * x^2$.

Оценки параметров уравнений регрессии:

среда 1: содержание ФС, мг/г среды культивирования: KW-H(2,30) = 25,8064516, $p=0,000002$; F(2,27) = 1004,11581, $p=00,0000$;
 среда 2: содержание ФС, мг/г среды культивирования: KW-H(2,30) = 13,4193548, $p=0,0012$; F(2,27) = 27,7602658, $p=0,0000003$;
 среда 3: содержание ФС, мг/г среды культивирования: KW-H(2,30) = 25,8064516, $p=0,000002$; F(2,27) = 543,145944, $p=00,0000$;
 среда 4: содержание ФС, мг/г среды культивирования: KW-H(2,30) = 25,8064516, $p=0,000002$; F(2,27) = 960,553756, $p=0,0000$;
 среда 5: содержание ФС, мг/г среды культивирования: KW-H(2,30) = 25,3006452, $p=0,000003$; F(2,27) = 52,2779149, $p=0,0000$;
 среда 6: содержание ФС, мг/г среды культивирования: KW-H(2,30) = 19,3574194, $p=0,00006$; F(2,27) = 352,634528, $p=00,0000$.

светло-коричневую, средней плотности структуру с интенсивными светло-желтыми образованиями, которые покрывали всю поверхность. Появление единичных морфогенетических очагов отмечено на 20-е сутки культивирования. Такая характеристика каллуса сохранялась и на 40-е сутки культивирования, но в этот период каллус характеризовался интенсивным ростом. На 60-й день в массе каллуса присутствовали единичные меристематические клетки, каллус становился коричневым, очень рыхлым, роста нет.

Среды 3, 4, 6 (кверцетин, фенилаланин, кверцетин + фенилаланин, соответственно). Каллус характеризовался светло-коричневой окраской, основная масса каллуса

была плотной, однако у основания каллус был рыхлый (20-й день). В общей массе каллуса имелись небольшие скопления меристематических клеток. В то время как на 40-е и 60-е сутки культивирования каллус становился рыхлым, распадаясь на отдельные части, появлялись очаги некроза, хотя на среде 6 в отдельных участках наблюдали появление желто-зеленых образований.

Среда 5 (рутин + фенилаланин). На 20-й день культивирования каллус представлял собой зелено-желтое плотное образование. Цито-гистологический анализ такого каллуса показал, что его клетки неоднородны и представлены мелкими клетками с крупными хорошо окрашенными ядрами, расположенными

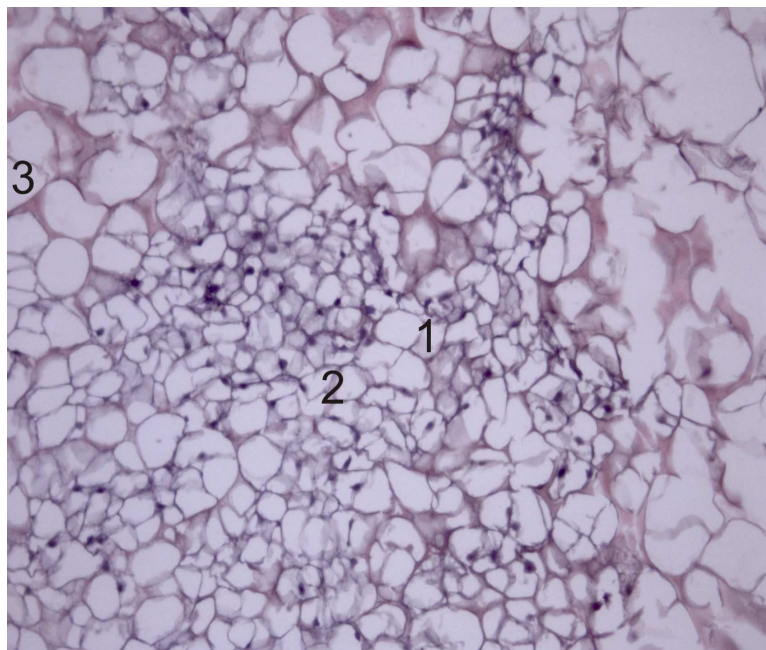


Рис.4. Цито-гистологический анализ каллуса сирени цветкового происхождения при культивировании на среде, содержащей рутин и фенилаланин (среда 5) : 1 - морфогенный очаг; 2 - меристематические клетки; 3 – паренхимные клетки.

как в центре, так и на периферии, и крупными единичными паренхимными клетками (рис. 4). В этот период в каллусе наблюдали формирование морфогенных очагов (рис.4). Морфогенетические очаги, формирующиеся в каллусе, имели гетерогенное строение и представлены следующими типами клеток: 1) по периферии очага расположены крупные рыхлые клетки с крупными вакуолями; ядра достаточно крупные, занимают пристенное положение; 2) зона клеток, занимающая основной объем, состоит из более мелких меристематических клеток с крупными ядрами, хорошо связывающими краситель, с вакуолями или без них (рис.4).

На 20-е сутки отмечено максимальное, в условиях выполненных экспериментов, количество морфогенетических очагов (такой режим культивирования можно считать оптимальным), которые формировались в глубинных слоях каллуса в отличие описанных в литературе многочисленных случаев формирования эмбриоидов из эпидермальных и субэпидермальных клеток, как, например, у арахиса [15] и кофе [16]. На 40-й день морфология каллуса была сходна с каллусом, культивируемым на среде 2, а вот на 60-й день каллус становился коричневым, с единичными

светло-желтыми образованиями на поверхности, рыхлый, роста нет.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что способность к морфогенезу в каллусной культуре сирени цветкового происхождения зависит от присутствия в среде культивирования ФС и/или их предшественников.

Таким образом, присутствие в среде экзогенных ФС, по-видимому, является стимулом для процессов дифференцировки как следствие накопления ФС.

Заключение

1. Используемые нами методические подходы способствуют повышению содержания суммы ФС в каллусе сирени цветкового происхождения на 20-й день культивирования, что позволяет сократить время культивирования каллусной ткани сирени, для получения клеток в высоком содержанием ФС, в три раза.

2. Формирование морфогенетических очагов в каллусе сирени цветкового происхождения зависит от присутствия в питательной среде экзогенных ФС, причем формирование морфогенетических очагов наблюдается при высокой концентрации ФС (1,72 мг/г сырого

веса каллуса) на среде, содержащей рутин и фенилаланин (среда 5).

Литература

1. Бутенко, Р. Г. Индукция морфогенеза в культуре тканей растений / Р. Г. Бутенко // Гормональная регуляция онтогенеза растений. – М.: Наука, 1984. – С. 42-54.
2. Журавлев, Ю. Н. Морфогенез у растений in vitro / Ю. Н. Журавлев, А. М. Омелько // Физиология растений. – 2008. – Т. 55, № 5. – С. 643-664.
3. Development of highly regenerable elite Acala cotton (*Gossypium hirsutum* cv. Махха) - a step towards genotype-independent regeneration / R. Mishra [et al.] // Plant Cell, Tissue Organ Cult. – 2003. – Vol. 73. – P. 21-35.
4. Kefeli, V. I.. Phenolic cycle in plants and environment / V. I. Kefeli, M. V. Kalevitch, B. Borsari // J. Cell and Mol. Biol. – 2003. – Vol. 2. – P. 13-18.
5. Sample preparation of phenolic compounds in fruits / M. Antolovich [et al.] // Analyst. – 2000. – Vol. 125. – P. 989-1009.
- 6 Changes in phenol content during strawberry (*Fragaria x ananasa*, cv. Chandler) callus culture / T. L. Arnaldos [et al.] // Physiol. Plant. – 2001. – Vol. 113. – P. 315-322.
7. Volpert, R. Effects of cinnamic acid derivates on indole acetic acid oxidation by peroxidase / R. Volpert, W. Osswald, E. F. Elstner // Phytochemistry. – 1995. – Vol. 38. – P. 19-22.
8. Ozyigit, I. I.. Relation between explant age, total phenols and regeneration response of tissue cultured cotton (*Gossypium hirsutum* L.) / I. I. Ozyigit M. V. Kahraman, O. Ercan // Afr. J. Biotechnol. – 2007. – Vol. 6 (1). – P. 3-8.
9. Путьерский, И. Н. Лекарственные растения / И. Н. Путьерский. – Мн.: Кн. дом, 2005. – 704 с.
10. Куркин, В. А. Фармакогнозия: учебник для студентов фарм. вузов / В. А. Куркин. – Самара: ООО Офорт, ГОУВПО «СамГМУП», 2004. – 1180 с.
11. Flavone production in transformed root cultures of *Scutellaria baicalensis* Georgi / K. Nishikawa [et al.] // Phytochemistry. – 1999. – Vol. 52. – P. 885-890.
12. Effects of kinetin and 4PU-30 on the growth and the content of polyphenols in tobacco callus tissue / Y. Angelova [et al.] // Bulgar. J. Plant Physiol. – 2001. – Vol. 27 (1-2). – P. 36-42.
13. Composition of phenolics and anthocyanins in a sweet potato cell suspension culture / I. K. Islam [et al.] // Biochem. Eng. J. – 2003. – Vol. 14. – P. 155-161.
14. Tang, W. Increase of polyphenol oxidase and decrease of polyamines correlate with tissue browning in Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.) / W. Tang, R. J. Newton // Plant Sci. – 2004. – Vol. 167. – P. 621-628.
15. Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea Arabica* / F. R. Quiroz-Figueroa [et al.] // Plant Cell Repts. – 2002. – Vol. 20. – P. 1141-1149.
16. Galiba, Y. A novel method for increasing the frequency of somatic embryogenesis in wheat tissue culture by NaCl and KCl supplementation / Y. Galiba, Y. Yamada // Plant Cell Repts. – 1988. – Vol. 7. – P. 55-58.
17. Динамика роста биомассы и накопления фенольных соединений в каллусной культуре сирени обыкновенной (*Syringa vulgaris* (L.)) / О. А. Яковлева [и др.] // Вестн. ВГМУ. – 2007. – Т. 6, № 3. – С. 102-108.
18. Chengalrayan, K. Histological analysis of somatic embryogenesis and organogenesis induced from mature zygotic embryo-derived leaflets of peanut (*Arachis hypogaea* L.) / K. Chengalrayan, S. Hazra, M. Gallo-Meagher // Plant Science. – 2001. – Vol. 161. – P. 415-421.
19. Боровиков, В. STATISTICA: искусство анализа данных на компьютере / В. Боровиков. – СПб., 2001. – 540 с.

Поступила 01.06.2010 г.

Принята в печать 02.09.2010 г.