

УДК 581.143

**ПОЛУЧЕНИЕ КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ ПАЖИТНИКА ГРЕЧЕСКОГО И
ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ЕЕ РОСТА****В.М. Юрин, Ш. Макай¹, В.Н. Решетников², Е.В. Спиридович², Т.И. Дитченко,
А.О. Логвина***Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь*¹ – *Западно-Венгерский университет, Мошонмадьяровар, Венгрия*² – *Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь***Введение**

В настоящее время в мире широко культивируется целый ряд растений, среди которых значительное место по праву занимает пажитник греческий (*Trigonella foenum-graecum* L.) – одно из древнейших лекарственных растений. Он является уникальным источником многих биологически активных соединений - флавоноидов [3], алкалоида тригонеллина, стероидных сапогенинов [9], в частности диосгенина [5].

Семена и зеленая масса пажитника характеризуются различными терапевтическими свойствами, а препараты на их основе находят широкое применение при лечении ряда заболеваний. Экстракты семян пажитника греческого используются при лечении гипертонии [6] и диабета 2 типа [11]. Они обладают значительным ранозаживляющим эффектом [16], иммуномодулирующими свойствами [7], антиоксидантной [8] и гепатопротекторной [12] активностью. Экстракты листьев пажитника характеризуются противовоспалительными, болеутоляющими и жаропонижающими свойствами [14]. Вытяжки из семян и листьев демонстрируют антибактериальную активность по отношению к некоторым патогенам [4]. Недавние исследования позволяют заключить, что активные компоненты пажитника греческого обладают антиканцерогенным потенциалом [15].

Для удовлетворения потребностей фармацевтических производств в получении целевого продукта требуется значительный объем исходного сырья. Однако ареал произрастания пажитника греческого ограничен климатическими условиями. В связи с этим необходимо внедрение новых подходов, среди которых наиболее перспективным является применение биотехнологического способа получения фитомассы, основанного на культивировании в искусственных условиях на питательных средах клеток и тканей растений. Данный метод обладает рядом преимуществ по сравнению с использованием интактных растений: радикальное решение проблемы дефицита исходного сырья; независимость от климатических условий; возможность управления процессом биосинтеза целевых продуктов [1].

Для того чтобы составить конкуренцию традиционно используемому растительному сырью культуры клеток и тканей должны характеризоваться высокими скоростями прироста биомассы, а также значительным биосинтетическим потенциалом. Рост клеток в культуре *in vitro* регулируется многими факторами, среди которых на первое место выступает состав питательной среды и содержание отдельных ее компонентов, в частности фитогормонов, а также источника углерода.

В связи с этим, целью настоящей работы было получение культуры клеток *Trigonella foenum-graecum* L. и исследование регуляции ее ростовых процессов.

Методы исследования

В работе использовалась основная питательная среда по прописи Мурасиге и Скуга (МС) [13]. В экспериментах по получению асептически выращенных проростков пажитника греческого применяли безгормональную среду МС. В ходе изучения гормональной регуляции эффективности каллусогенеза и ростовых процессов каллусов в основную питательную среду МС вносили фитогормоны. В качестве ауксина была

использована 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д), источником цитокининов служил кинетин. Варьирование концентраций указанных фитогормонов осуществлялось в диапазоне от 0,5 до 2,0 мг/л.

С целью установления характера регуляторного влияния индолилуксусной кислоты (ИУК) на показатели роста каллусов пажитника греческого в отдельной серии экспериментов в качестве дополнительного источника ауксинов питательные среды содержали ИУК в концентрациях 1,0 и 2,0 мг/л.

Исследование влияния уровня сахарозы в питательной среде на прирост биомассы каллусов пажитника греческого включало тестирование 4 вариантов сред, в которых концентрация сахарозы составляла 20, 30, 40 и 50 г/л. Контролем служила питательная среда МС, содержащая 30 г/л сахарозы.

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 [10]. Питательные среды стерилизовались путем автоклавирования при 0,5 атм и 130°C в течение 30-40 мин.

Культивирование каллусов осуществлялось в темноте в условиях микробиологического термостата при температуре 24,5°C, а также на свету в условиях фитостата (14 ч свет/10 ч темнота) при комнатной температуре и интенсивности освещения 3000 лк.

Изучение влияния фитогормонов и сахарозы на ростовые характеристики каллусной культуры пажитника греческого включало определение следующих параметров: индекса роста, удельной скорости роста, времени удвоения биомассы [2]. Определение указанных показателей роста производилось перед пассированием каллусов пажитника греческого на свежие питательные среды (30-32 сутки культивирования).

Для получения кривой роста исследуемой каллусной культуры отбор биомассы каллусов осуществлялся каждые 2-3 суток в течение всего ростового цикла.

На диаграммах приведены средние величины \pm ошибка средней величины.

Результаты и обсуждение

Для введения в культуру *in vitro* *Trigonella foenum-graecum* необходимо было получить асептически выращенные растения – источник эксплантов. С этой целью семена пажитника подвергали стерилизации с последующим их переносом в пробирки, содержащие стерильную безгормональную среду МС. Проращивание семян осуществлялось в термостате в течение 3-5 суток. После этого проростки стерильно переносили в конические колбы объемом 300 мл со средой МС, которые инкубировали в условиях фитостата в течение 3-4 недель. Далее осуществляли отбор эксплантов для индукции первичного каллуса и их перенос на содержащую гормоны питательную среду МС. Эксплантами служили фрагменты листьев асептически выращенных растений [10].

Фитогормоны являются обязательными компонентами всех питательных сред, используемых для получения первичного каллуса и роста культур клеток и тканей растений. При этом оптимум концентраций ауксинов и цитокининов сильно варьирует у разных видов растений. В большинстве случаев его определяют эмпирическим путем. Для установления характера влияния фитогормонов на эффективность процессов дедифференциации и каллусогенеза у пажитника греческого было использовано 7 вариантов питательных сред с различным соотношением 2,4-Д и кинетина.

Максимальная эффективность каллусогенеза (100%) отмечалась у листовых эксплантов *Trigonella foenum-graecum* в присутствии 1,0 мг/л 2,4-Д и 1,0 мг/л кинетина. Полученные каллусы имели светло-оранжевую либо желтую окраску, среднеплотную консистенцию. Средняя продолжительность процесса получения первичного каллуса пажитника греческого, пригодного для субкультивирования, составляла 4-5 недель.

Увеличение содержания 2,4-Д в среде до 2,0 мг/л существенно ингибировало процессы дедифференциации и каллусогенеза у данного растения.

При исследовании гормональной регуляции ростовых процессов полученной каллусной культуры установлено, что наиболее высокие показатели ростовой активности были характерны для каллуса *Trigonella foenum-graecum*, выращиваемого на среде, содержащей 2,0 мг/л 2,4-Д и 2,0 мг/л кинетина – вариант 7 (рис. 1). Средние величины удельной скорости роста каллусов в этом варианте составляли в среднем 0,047 г сырой массы на 1 г исходного веса каллусов в сутки, а времени удвоения биомассы – 16,5 суток. Каллусная культура, выращиваемая в присутствии 1,0 мг/л 2,4-Д и 2,0 мг/л кинетина (вариант 6), также демонстрировала довольно высокие показатели ростовой активности.

Варианты питательных сред, содержащие 2,4-Д в диапазоне концентраций 0,5-2,0 мг/л и кинетин в концентрациях 0,5 мг/л и 1,0 мг/л характеризовались достоверно более низкой удельной скоростью роста и более длительным временем удвоения биомассы. В частности, минимальный прирост биомассы каллусов пажитника греческого отмечался на среде, включающей самые низкие концентрации обоих использованных регуляторов роста – 0,5 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетина. Удельная скорость роста каллусной культуры снижалась практически в 3 раза по сравнению с наиболее оптимальным вариантом, а для удвоения биомассы каллусов требовалось не менее 50 суток.

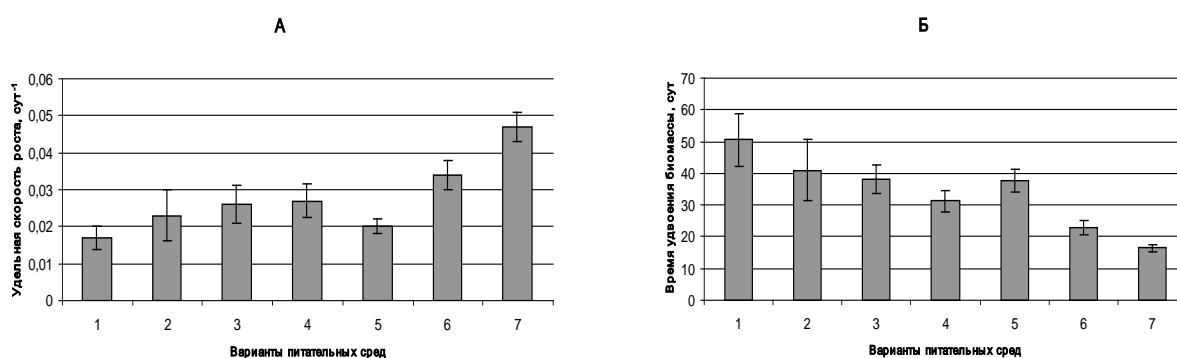


Рисунок 1 – Влияние различных комбинаций 2,4-Д и кинетина на удельную скорость роста (А) и время удвоения биомассы (Б) каллусов пажитника греческого, культивируемых в темноте:

- 1 – 0,5 мг/л 2,4-Д + 0,5 мг/л кинетина; 2 – 1,0 мг/л 2,4-Д + 0,5 мг/л кинетина;
 3 – 0,5 мг/л 2,4-Д + 1,0 мг/л кинетина; 4 – 1,0 мг/л 2,4-Д + 1,0 мг/л кинетина;
 5 – 2,0 мг/л 2,4-Д + 1,0 мг/л кинетина; 6 – 1,0 мг/л 2,4-Д + 2,0 мг/л кинетина;
 7 – 2,0 мг/л 2,4-Д + 2,0 мг/л кинетина

Полученные данные позволяют заключить, что для оптимизации ростовых процессов каллусов пажитника греческого целесообразно использовать указанные фитогормоны в концентрациях 2,0 мг/л и 1,0 мг/л, соответственно, либо в одинаковых концентрациях, равных 2,0 мг/л. Снижение содержания обоих гормонов в питательной среде до 0,5 мг/л крайне неблагоприятно сказывается на показателях прироста биомассы исследуемой каллусной культуры.

Известно, что для успешного культивирования изолированных клеток и тканей растений необходимо соблюдать определенные физические условия выращивания. Большинство каллусных тканей не нуждается в свете, так как они питаются гетеротрофно. Однако условия освещения могут оказывать влияние на рост изолированных клеток, тканей и органов, которые и не обладают автотрофным питанием. В данном случае эффект света обусловлен не регуляцией фотосинтеза, а воздействием на фитохромную систему, что оказывает влияние на митотическую

активность и рост клеток [1].

В связи с этим представляло интерес исследовать характер влияния освещения на ростовые показатели каллусной культуры пажитника греческого. В данной серии экспериментов было использовано 4 варианта питательных сред, содержащих 0,5 мг/л 2,4-Д и 1,0 мг/л кинетина, 1,0 мг/л 2,4-Д и 1,0 мг/л кинетина, 1,0 мг/л 2,4-Д и 2,0 мг/л кинетина, 2,0 мг/л 2,4-Д и 2,0 мг/л кинетина.

Установлено, что освещение не оказывает значительного влияния на удельную скорость роста и время удвоения биомассы каллусов *Trigonella foenum-graecum*, культивируемых на всех исследуемых вариантах сред по сравнению с каллусными культурами, выращиваемыми в темноте. При этом каллусы, культивируемые на свету в течение 1-2 пассажей, приобретали хорошо выраженную зеленую окраску, тогда как выращенные в темноте имели светло-оранжевый цвет. Таким образом, исследуемая культура характеризовалась достаточно высокой способностью к позеленению на свету, однако освещение не приводило к изменению консистенции каллусов. Более того, во многих вариантах они становились еще более плотными по сравнению с каллусами, выращиваемыми в темноте.

Углеводы также являются необходимым компонентом питательных сред для культивирования изолированных клеток и тканей, так как в большинстве случаев последние лишены хлорофилла и не способны к автотрофному питанию. Чаще всего в качестве углевода используют сахарозу или глюкозу в концентрации 2-3% [10].

Влияние сахарозы на ростовую активность культуры клеток *Trigonella foenum-graecum* было изучено на двух вариантах сред с наиболее оптимальным соотношением фитогормонов. Показано, что в питательной среде, содержащей 1,0 мг/л 2,4-Д и 2,0 мг/л кинетина, увеличение концентрации сахарозы до 40 г/л и 50 г/л приводило в обоих случаях к повышению удельной скорости роста на 23% и уменьшению времени удвоения биомассы в среднем на 24% по отношению к контролю (рис. 2). В результате величины удельной скорости роста и времени удвоения биомассы каллусов для данных вариантов питательной среды приближались к таковым в присутствии 2,0 мг/л 2,4-Д и 2,0 мг/л кинетина и 30 г/л сахарозы.

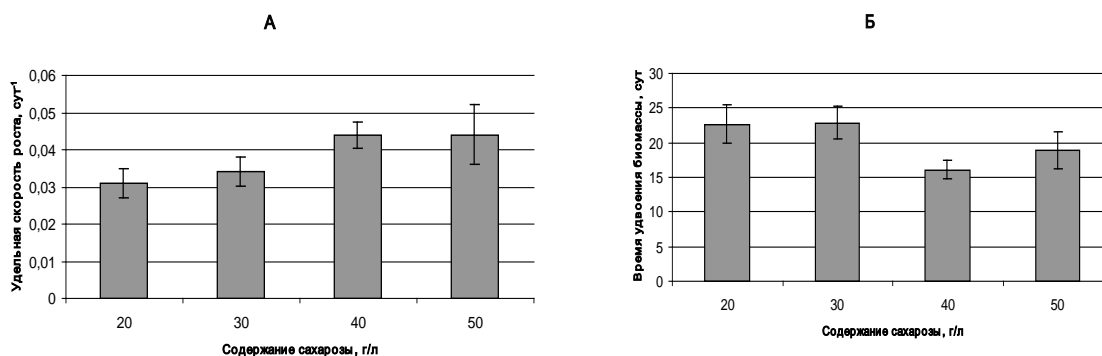


Рисунок 2 – Влияние уровня сахарозы на удельную скорость роста (А) и время удвоения биомассы (Б) каллусов культивируемых в присутствии 1,0 мг/л 2,4-Д и 2,0 мг/л кинетина

Увеличение концентрации сахарозы до 40 г/л и 50 г/л в среде, содержащей 2,4-Д и кинетин в концентрации 2,0 мг/л для каждого, оказывало на каллус пажитника греческого негативное влияние: наблюдалось уменьшение скорости прироста биомассы в среднем на 40% по отношению к контролю (рис. 3).

Снижение концентрации сахарозы в среде до 20 г/л не вызывало достоверных различий в величинах удельной скорости роста и времени удвоения биомассы культуры клеток пажитника греческого относительно контрольных значений для обоих вариантов питательных сред.

Таким образом, наиболее оптимальными для культивирования каллуса *Trigonella*

foenum-graecum являются питательные среды, содержащие 1,0 мг/л 2,4-Д и 2,0 мг/л кинетина и сахарозу в концентрации 40-50 г/л, а также варианты, включающие 2,0 мг/л 2,4-Д, 2,0 мг/л кинетина и 20-30 г/л сахарозы. Снижение уровня 2,4-Д в питательной среде от 2,0 до 1,0 мг/л приводит к проявлению стимулирующего эффекта повышенных концентраций сахарозы на ростовые процессы каллусов пажитника греческого. Согласно литературным данным, стимулирующий эффект сахарозы может быть связан с увеличением продолжительности стационарной фазы ростового цикла, ингибированием синтеза эндогенных ауксинов, увеличением активности ферментов пентозофосфатного пути [10].

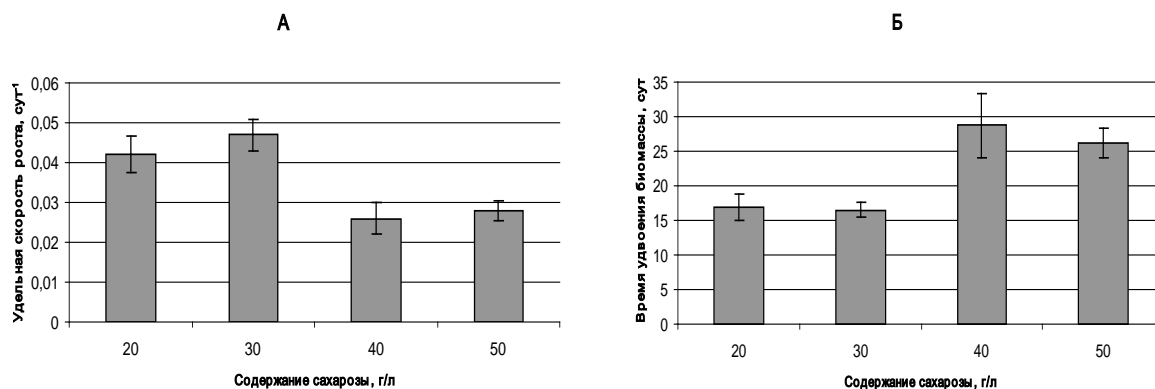


Рисунок 3 – Влияние уровня сахарозы на удельную скорость роста (А) и время удвоения биомассы (Б) каллусов культивируемых в присутствии 2,0 мг/л 2,4-Д и 2,0 мг/л кинетина

Как известно, в промышленной биотехнологии с целью получения вторичных метаболитов и клеточной биомассы в основном используются суспензионные культуры, получаемые на основе каллусных тканей. Для этого наиболее подходят каллусы рыхлого типа, которые при переносе в жидкую питательную среду легко распадаются на кластеры и небольшие группы клеток. Как правило, их получают на средах с повышенным содержанием ауксинов, в частности ИУК [1]. В связи с этим было изучено влияние ИУК в концентрациях 1,0 и 2,0 мг/л на показатели ростовой активности каллусов *Trigonella foenum-graecum*, культивируемых на двух вариантах сред с наиболее оптимальным соотношением 2,4-Д и кинетина (варианты 6 и 7). Данные питательные среды служили контролем.

В ходе проведенных исследований установлено, что включение в состав питательных сред дополнительного источника ауксинов не привело к стимуляции ростовых процессов исследуемой каллусной культуры. При этом присутствие данного фитогормона вызывало в течение 2 пассажей заметное изменение консистенции каллусов, а именно, способствовало значительному их разрыхлению. Данный эффект был наиболее выраженным для варианта питательной среды, включающего 1,0 мг/л 2,4-Д и 2,0 мг/л кинетина. Под действием ИУК каллусные ткани становились более оводненными, гомогенными, практически полностью утрачивали уплотненные участки и легко разделялись скальпелем на транспланты при пересадке. Следовательно, ИУК не оказывая стимулирующего эффекта на процессы клеточного деления, вероятнее всего, способствовала росту клеток растяжением за счет их вакуолизации, а также ослаблению межклеточных контактов между мелкими и плотно сомкнутыми клетками первичного каллуса. Установленные результаты позволяют заключить, что для получения каллуса пажитника греческого рыхлой консистенции наиболее предпочтительным является использование среды МС со следующими концентрациями фитогормонов: 1,0 мг/л 2,4-Д, 2,0 мг/л кинетина и 2,0 мг/л ИУК.

На заключительном этапе исследований было предпринято изучение динамики

прироста биомассы каллусов *Trigonella foenum-graecum*, культивируемых в присутствии 2,0 мг/л 2,4-Д и 2,0 мг/л кинетина, а также сахарозы в концентрации 30 г/л. В результате была получена кривая роста каллусной культуры пажитника греческого, представленная на рис. 4.

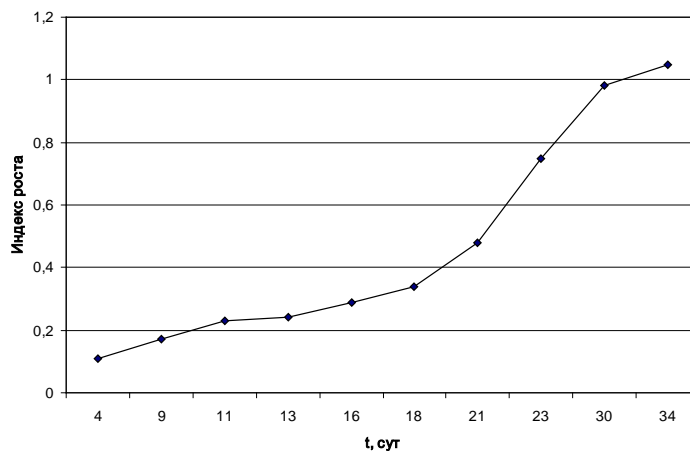


Рисунок 4 – Кривая роста каллусной культуры пажитника греческого

Из приведенных результатов видно, что рост клеточной культуры пажитника описывается типичной S-образной кривой. В течение первых 13-16 суток прирост биомассы каллусов осуществляется очень медленно, что позволяет сделать заключение о довольно длительной лаг-фазе или фазе скрытого роста. Начиная с 18 суток, отмечается выраженное ускорение прироста биомассы каллусов, т.е. начало логарифмической фазы. Продолжительность данной фазы составляет около 12 суток. Начиная с 30-х суток, наблюдается резкое замедление роста и последующий переход каллусной культуры в фазу замедления ростового цикла. Поскольку в фазу стационарного роста начинается постепенная деградация клеток, а после нее наступает отмирание культуры [1], то необходимым этапом является пересадка каллусов *Trigonella foenum-graecum* на свежую питательную среду на 30-35 сутки культивирования.

На сегодняшний день не существует однозначного ответа на вопрос, как связан синтез вторичных метаболитов с ростовыми процессами. У отдельных культур максимальное накопление вторичных метаболитов наблюдается при завершении лаг-фазы ростового цикла (некоторые антоцианы, фенольные соединения, сесквитерпены, антрахиноны). В некоторых случаях синтез продукта происходит одновременно с активным ростом клеток, т.е. в ходе логарифмической фазы (серпентин, никотин, бетацианин, берберин, диосгенин, сангвинарин). У многих культур вторичные метаболиты накапливаются в значительных количествах лишь при замедлении или остановке роста (хлорогеновая кислота, шиконин, виснагин). Предполагается, что механизмы и условия, блокирующие деление клеток и активный рост, является одновременно механизмами активации, обеспечивающими синтез ферментов вторичного метаболизма [10]. Таким образом, в каждом конкретном случае необходимо проследить динамику накопления вторичных метаболитов в ходе цикла выращивания культур для того, чтобы разработать эффективные технологии их получения, что и будет предметом дальнейших исследований для каллусной культуры пажитника греческого.

Выводы

Проведенные исследования регуляции ростовых процессов каллусной культуры пажитника греческого под действием фитогормонов и уровня сахарозы в питательной среде, а также освещения позволили выявить наиболее оптимальные условия для

поддержания роста каллусов. Полученная каллусная культура в целом оказалась весьма чувствительной к изменению гормонального баланса питательной среды.

Выявленные закономерности прироста биомассы каллусной культуры пажитника греческого в ходе ростового цикла будут использованы при анализе биосинтетического потенциала культуры в отношении отдельных групп вторичных метаболитов (сапогенинов, фенольных соединений, в частности, флавоноидов) при накопительном культивировании.

Список литературы

1. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: учеб. пособие. - М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. - 160 с.
2. Загребельный С.Н. Биотехнология. Часть 1. Культивирование продуцентов и очистка продуктов. - Новосибирск.: Новосиб. гос. ун-т, 2000. - 108 с.
3. Adamska M., Lutomski J. C-Glycoside flavones in the seeds of *Trigonella foenum-graecum* // *Planta Medica*. - 1971. – Vol. 20. – P. 224-229.
4. Amalraj A., Balasubramanian A., Edwin E., Sheeja E. Antimicrobial activity of fenugreek seeds and leaves // *Indian Journal of Natural Products*. - 2005. – Vol. 21, №2. – P. 35-36.
5. Bakshi VM., Hamied YK. Isolation of diosgenin from fenugreek seeds // *Indian Journal of Pharmacy*. - 1971. – Vol. 33. – P. 55-56.
6. Balaraman R., Dangwal S., Mohan M. Antihypertensive effect of *Trigonella foenum-graecum* seeds in experimentally induced hypertension in rats // *Pharmaceutical Biology*. - 2006. – Vol. 44, №8. - P. 568-575.
7. Bilal BH., Rizwarul H., Suhel P., Suwarna P., Iqbal S., Raisuddin S. Immunomodulatory effects of fenugreek extract in mice // *Int. Immunopharm.* - 2003. – Vol. 3. - P. 257 - 265.
8. Choudhary GP. Free radical scavenging activity of seeds of *Trigonella foenum-graecum* Linn // *Journal of Natural Remedies*. - 2006. – Vol. 6, №1. - P. 99-102.
9. Dawidar AM., Saleh AA., El-Motei SL. Steroid sapogenin constituents of fenugreek seeds // *Planta Medica*. - 1973. - Vol. 24. – P. 367-370.
10. Endreb R. *Plant Cell Biotechnology*. - Springer - Verlag Berlin Heidelberg, 1994. - 353 p.
11. Jefferson C. Fenugreek in diabetes management // *New Montana Pharmacist*. -1999. – Vol. 23. - P. 1-2.
12. Kaviarasan S., Anuradha CV. Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seed polyphenols protect liver from alcohol toxicity: A role on hepatic detoxification system and apoptosis // *Pharmazie*. - 2007. – Vol. 62, №4. - P. 299-304.
13. 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.
14. Parvizpur A., Ahmadiani A., Kamalinejad M. Spinal serotonergic system is partially involved in antinociception induced by *Trigonella foenum-graecum* (TFG) leaf extract // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2004. – Vol. 95, №1. - P. 13-17.
15. Sur P., Das M., Gomes A. et al. *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) seed extract as an antineoplastic agent // *Phytother Res*. - 2001. – Vol. 15. - P. 257-259.
16. Taranalli AD., Kuppast II. Study of wound healing activity of seeds of *Trigonella foenum-graecum* in rats // *Indian journal of pharmaceutical sciences*. -1996. - Vol. 58, №3. - P. 117-119.