

ВЛИЯНИЕ ФИТОГОРМОНОВ НА КАЛЛУСОГЕНЕЗ И РОСТОВЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КУЛЬТУР *IN VITRO* *VINCA MAJOR* L.**О.В. Молчан, В.М. Юрин****ГНУ «Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф.Купревича НАН Беларуси» Минск, Республика Беларусь***Белорусский Государственный Университет, Минск, Республика Беларусь
e-mail: olga_molchan@mail.ru***Введение**

Представители рода *Vinca* – вечнозеленые или листопадные кустарнички либо многолетние травянистые растения с ветвящимися, ползучими или лежачими вегетативными побегами [1]. Некоторые виды рода (*V. minor*, *V. herbacea*и др.) культивируются в Беларуси, как декоративные растения и характеризуются высокой степенью натурализации в природных растительных сообществах [2]. *Vinca major* – барвинок большой – европейско-малоазиатский вид, естественный ареал которого расположен в Южной Европе, на Кавказе и в Западной Азии. В странах Северной, Атлантической, Центральной и Восточной Европы, а также в Южной Азии, Северной Африке, Северной Америке и Австралии *V. major* культивируется и иногда дичает [1, 2]. В Беларуси *V. major* – редко культивируемый вид. Широкого распространения его в условиях Беларуси пока не отмечено, вероятно потому, что надземная часть растения, в особенности молодые побеги, очень чувствительна к низким температурам [2]. *V. major* – полиморфный вид – выделяют три его подвида, которые иногда рассматривают как самостоятельные виды [1, 2]. Типовой подвид *subsp. major* характеризуется наиболее широким первичным ареалом (преимущественно южноевропейским). В Беларуси этот подвид обладает наиболее низкой зимостойкостью [2]. В составе фармакологически ценных метаболитов *V. major* обнаружены тритерпеноиды (урсоловая кислота), алкалоиды (резерпин, винкамин, майдин, акуаммин, винкамедин, винцин), флавоноиды (робинин) [1]. Надземная часть растения может использоваться в качестве сырья для получения алкалоидов, стимулирующих кроветворение и деятельность центральной нервной системы, а также средств гипотензивного, кардиотонического и анальгетического действия [1]. При этом исследования метаболитов *V. major* активно продолжаются в настоящее время многими группами исследователей. В большинстве случаев работы посвящены обнаружению в составе вторичных метаболитов новых, ранее не идентифицированных индольных алкалоидов и фенольных соединений [3-5]. Таким образом, *V. major*, являясь фармакологически-ценным растением, не имеет естественного ареала произрастания на территории Беларуси и практически не культивируется [1]. В связи с этим, получение культуры *in vitro* данного растения и использование клеточных культур *V. major* в качестве альтернативного растительного сырья представляет значительный интерес. Следует отметить, что использование каллусных и суспензионных культур для получения фармакологически ценных метаболитов растений, произрастающих в других климатических зонах, является в настоящее время одним из наиболее перспективных биотехнологических подходов и направлений исследований [6].

Целью данной работы были инициация каллусной и суспензионной культуры *Vinca major* и исследование влияния фитогормонов на их ростовые параметры.

Методы исследования

Для получения каллусной культуры использовали листовые экспланты. Листья стерилизовали в течение 15 мин 10% раствором Доместос, затем 5 мин 70% этанолом, после чего трижды промывали автоклавированной дистиллированной водой. Стерильные экспланты площадью около 1 см² переносили на агаризованную питательную среду Мурасиге и Скуга (МС) [7], содержащую фитогормоны НУК и кинетин в различных

концентрациях. Все манипуляции проводили в асептических условиях. Каллусы культивировали при 25 °С в темноте. Суспензионные культуры инициировали из каллусных тканей [8, 9]. Культивирование суспензионной культуры осуществляли в темноте на шейкере ротационного типа при 120 об·мин⁻¹.

Оценку индекса роста проводили на основе определения прироста сырой и сухой массы каллусных или суспензионных клеток. Клетки суспензионной культуры перед высушиванием отделяли от среды культивирования фильтрованием через бумажный фильтр и промыванием дистиллированной водой для удаления остатков питательной среды. Сухую массу клеток и содержание сухого вещества определяли после высушивания при температуре 60 °С до постоянной массы.

Индекс роста рассчитывали по стандартной формуле:

$$I = (m_t - m_0)/m_0, \quad (1)$$

где m_0 – начальная масса, г; m_t – масса в конце цикла выращивания.

Обработку данных производили с помощью пакета статистического анализа программы *Microsoft Excel*. Основными статистическими характеристиками служили: средняя арифметическая величина (\bar{x}) и ошибка средней величины ($S_{\bar{x}}$). Для оценки достоверности различий между вариантами пользовались критерием Стьюдента [10]. Эксперименты были выполнены в 3-4 кратной повторности в течение 5 лет. На диаграммах представлены средние значения \pm ошибка средней величины.

Результаты и обсуждение

Многие фармакологически ценные лекарственные растения характеризуются весьма ограниченными ареалами обитания и чаще всего распространены в регионах с тропическим и субтропическим климатом. В связи с этим, актуальным является введение таких растений в культуру *in vitro* и определение оптимальных условий культивирования клеток для накопления биомассы в качестве ценного растительного сырья. В то же время, существуют только единичные работы, посвященные исследованиям культуры клеток и тканей *V. major* [11]. При этом влияние фитогормонов в широком диапазоне концентраций на ростовые параметры и накопление сухого вещества культивируемых клеток *барвинка большого in vitro* к настоящему времени остается не изученным.

Для инициации каллусных культур, как нами установлено, стерилизацию листовых эксплантов *V. major* следует проводить двухступенчато [12]. В результате возможно получить 97–98% стерильных эксплантов, из которых 75–85% способны к каллусогенезу (рисунок 1).



Рисунок 1 – Инициация каллусогенеза на листовых эксплантах *Vinca major* L.

Важнейшим фактором при инициации и поддержании культур клеток и тканей растений является присутствие в среде инкубации фитогормонов, относящихся к ауксином и цитокининам. Именно концентрацией и соотношением в питательных средах природных или синтетических ауксинов и цитокининов определяется возможность и интенсивность каллусогенеза [6, 8, 9, 12]. Считается, что основными стимуляторами деления растительных клеток являются цитокинины, однако добавление в питательную среду ауксинов, особенно синтетических, усиливает деление клеток [6, 8, 9, 12]. При этом механизмы воздействия ауксинов и цитокининов на этот процесс отличаются.

Исследования последних десятилетий показали, что каллусо- и органогенез в культуре *in vitro* зависит от корректного выбора концентрации фитогормонов [6, 8, 9, 12]. Концентрация и соотношение ауксинов и цитокининов в среде культивирования, как правило, являются видо- и сортоспецифичными, подбираются в соответствии с типом культуры и экспланта, а также целями культивирования [6, 8, 9, 12]. В данной работе важно было определить фитогормональный состав среды культивирования, оптимальный и для инициации каллусогенеза, и для накопления биомассы и сухого вещества клеточной культурой. При инициации каллусогенеза варьировали содержание в питательной среде синтетических фитогормонов кинетина (цитокинин) и НУК (ауксин). Регуляторы роста использовали в диапазоне концентраций 0,1–3 мг/л. В результате было установлено, что при низких концентрациях (до 0,5 мг/л) кинетина и НУК в среде культивирования, каллусогенеза на стерильных эксплантах не отмечается в течение 3-х месяцев субкультивирования. При увеличении концентрации фитогормонов от 0,5 до 3 мг/л и варьировании соотношения [кинетин]/[НУК], образование каллуса на эксплантах происходило на всех питательных средах. При этом, наиболее благоприятными для стимуляции каллусогенеза оказались варианты сред, содержащих кинетин и НУК в соотношении 1:1, не зависимо от концентрации (таблица 1, рисунок 1). На среде, содержащей 0,5 мг/л кинетина и 1 мг/л НУК каллусная ткань образовывалась менее интенсивно, при этом отмечалась стимуляция ризогенеза. При культивировании эксплантов на средах с соотношением [кинетин]/[НУК], равном 2:1 и 3:1 наблюдали стимуляцию геммагенеза, т.е. при данных соотношениях фитогормонов каллусогенез сопровождался образованием побегов (таблица 1).

Таблица 1 – Стимуляция каллусогенеза и образование органов на листовых эксплантах *Vinca major* L. при культивировании на средах с различным содержанием фитогормонов

Среда	Каллусогенез	Ризогенез	Геммагенез
0,1 мг/л кинетина, 0,1 мг/л НУК	-	-	-
0,5 мг/л кинетина, 0,5 мг/л НУК	+	-	-
0,5 мг/л кинетина, 1 мг/л НУК	+	++	-
1 мг/л кинетина, 1 мг/л НУК	+++	-	-
2 мг/л кинетина, 2 мг/л НУК	+++	-	-
3 мг/л кинетина, 3 мг/л НУК	+++	-	-
2 мг/л кинетина, 1 мг/л НУК	+++	-	+
3 мг/л кинетина, 1 мг/л НУК	+++	-	+

Примечание: + - наблюдается, - - не наблюдается каллусогенез или образование органов

Наблюдаемая реакция клеток барвинка большого при инициации культуры *in vitro*, в принципе, объясняется известными эффектами ауксинов и цитокининов. Хорошо известно, что в дифференцированных клетках соблюдается определенный баланс фитогормонов, необходимый на соответствующем этапе роста и развития клетки, ткани, органа и растения в целом. При этом, недостаток цитокининов стимулирует образование корней, а недостаток ауксинов – побегов [13, 14]. При введении растения в культуру *in vitro* баланс нарушается, эндогенного синтеза фитогормонов не происходит. Для активации процессов деления и роста клеточные культуры используют экзогенные фитогормоны из питательной среды. В

культуре *in vitro* низкое соотношение [цитокинин]/[ауксин] часто стимулирует образование корней, высокое – побегов, а сбалансированное сочетание данных фитогормонов приводит к каллусогенезу [12, 15]. Однако состав и соотношение фитогормонов, необходимых для каллусогенеза и дальнейшего роста каллусной ткани является видоспецифичным. Так, например, в работе [15] каллусогенез на листовых эксплантах табака не наблюдался только при содержании ИУК менее 0,03 мг/л и кинетина менее 0,2, а при соотношении [цитокинин]/[ауксин], равном 1:1 образование и рост каллуса были менее интенсивным, чем при 0,5:1.

Далее нами было исследовано влияние фитогормонов на интенсивность роста и накопление сухого вещества каллусной культурой барвинка большого. На рисунке 2 А представлены результаты определения индекса роста каллусной ткани, субкультивируемой на средах с различным содержанием и соотношением кинетина и НУК.

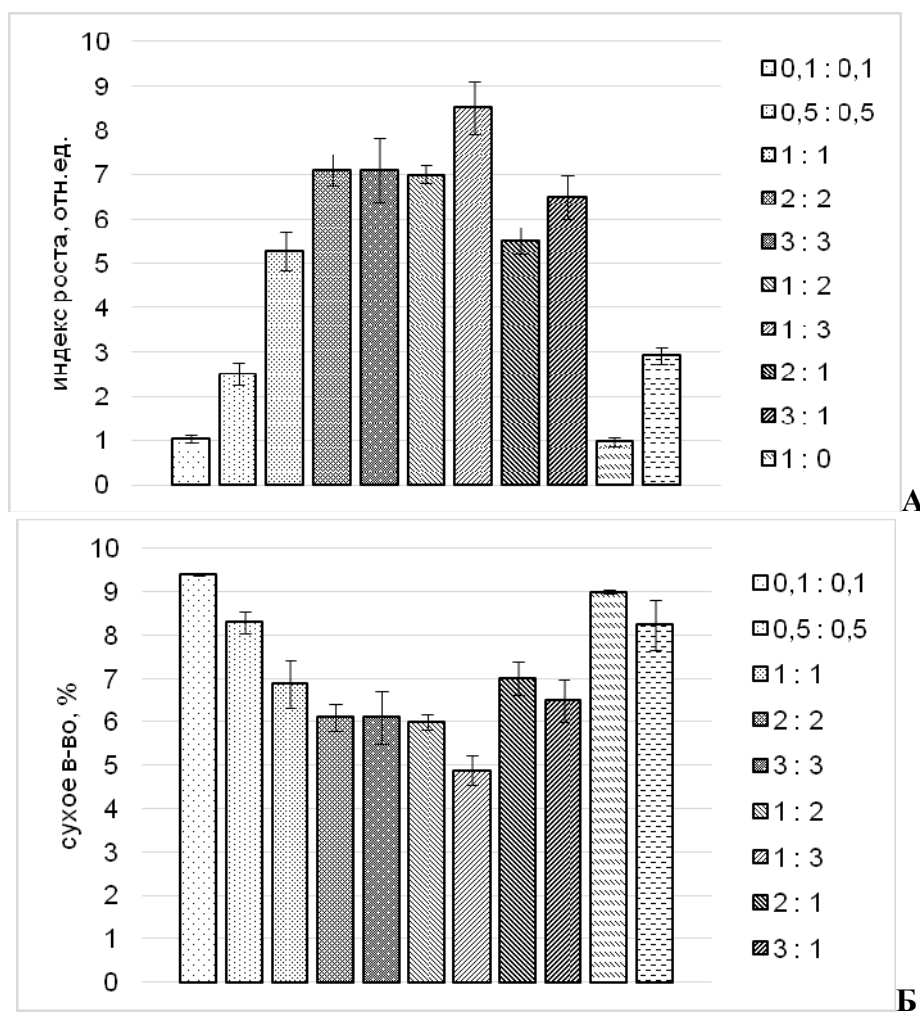


Рисунок 2 – Зависимость индекса роста (А) и накопления сухого вещества (Б) каллусной культурой *Vincetoxicum major* L. от содержания фитогормонов (соотношения [кинетин]/[НУК]) в питательной среде

На рисунке 2 А показано, что увеличение содержания фитогормонов в среде от 0,1 до 2 мг/л при их соотношении, равном 1:1, приводило к стимуляции накопления сырой массы каллусной культурой. Как видно на рисунке 2 А, величины индекса роста при соотношениях [кинетин]/[НУК], равных 0,1:0,1; 0,5:0,5; 1:1 и 2:2 составляли $1,05 \pm 0,01$; $2,51 \pm 0,25$; $5,28 \pm 0,19$ и $6,88 \pm 0,34$ отн. ед., соответственно. Дальнейшее увеличение концентрации фитогормонов до 3 мг/л к достоверному росту исследуемого параметра не приводило. Так, при соотношении [кинетин]/[НУК], равном 3:3, индекс роста составлял $7,10 \pm 0,58$ отн. ед.

Интерес представляло также исследование интенсивности ростовых процессов при изменении соотношения [кинетин]/[НУК] в среде. Использовали следующие варианты сред, варьируя соотношение [кинетин]/[НУК] – 1:2; 1:3; 2:1 и 3:1. В результате было отмечено достоверно более высокое ($8,50 \pm 0,33$ отн. ед.) по сравнению с другими вариантами значение индекса роста каллусов при соотношении [кинетин]/[НУК] в среде культивирования, равном 1:3. Такой эффект повышенного по сравнению с кинетином содержания НУК может быть обусловлен одной из наиболее известных функций ауксинов, стимуляцией роста клеток растяжением, которое сопровождается повышением лабильности клеточных стенок и входом воды в клетки. Также значительное отличие от максимального значения индекса роста было отмечено в варианте, где соотношение [кинетин]/[НУК] составляло 2:1, т.е. 2 мг/л кинетина и 1 мг/л НУК. При данном фитогормональном составе питательной среды индекс роста снижался и составлял $5,52 \pm 0,23$ отн. ед. (рисунок 2А)

Важно было также определить индекс роста каллусной культуры барвинка малого при исключении кинетина либо цитокинина из питательной среды. В результате было обнаружено, что исключение НУК из питательной среды и культивирование каллуса только в присутствии 1 мг/л кинетина приводило к существенному ингибированию ростовых процессов. На рисунке 2 Б показано, что индекс роста при этом снижался до величины, равной $0,99 \pm 0,04$ отн. ед. Исключение кинетина из состава питательной среды не приводило к столь существенным изменениям – индекс роста снижался только до величины $2,92 \pm 0,33$ отн. ед. Вероятно, в каллусной ткани барвинка большого экзогенный ауксин (НУК) контролирует деление клетки и ростовые процессы более эффективно, чем экзогенный цитокинин (кинетин).

В то же время, как видно на рисунке 2Б, каллусы с низким индексом роста, культивируемые на средах с соотношением [кинетин]/[НУК], равным 0,1:0,1; 0,5:0,5, 1:0 и 0:1, отличались более ксероморфной структурой и большим содержанием сухого вещества в тканях – 8–9%. Интересно отметить, что каллусные ткани, культивируемые на средах с соотношением [кинетин]/[НУК], равным 1:0 и 0:1, и индексами роста $0,99 \pm 0,04$ отн. ед. и $2,92 \pm 0,33$ отн. ед., соответственно, практически не отличались по содержанию сухого вещества. Возможно, это объясняется тем, что присутствие ауксина в среде стимулирует рост клеток растяжением, в то время как кинетин такого действия не оказывает. При соотношении [кинетин]/[НУК], равном 1:3, также отмечена более высокая влажность и, соответственно, меньшее ($4,89 \pm 0,33\%$) содержание сухого вещества в каллусных тканях по сравнению с данными показателями для каллусов, культивируемых при других соотношениях фитогормонов. Обнаружение данных закономерностей подтверждает наше предположение о стимуляции роста растяжением клеток каллусной ткани барвинка большого под действием повышенного содержания НУК. При культивировании каллусных тканей барвинка большого на средах с соотношением [кинетин]/[НУК], равным 1:1; 2:2; 3:3; 1:2; 2:1 и 3:1, накопление сухого вещества составляло 6–6,5%, и достоверных различий между вариантами обнаружено не было.

Таким образом, было установлено, что достаточно интенсивный рост каллуса барвинка большого происходит на нескольких вариантах сред (1:1; 2:2; 3:3; 1:2; 1:3; 2:1 и 3:1). В то же время, содержание сухого вещества в тканях при соотношении в питательной среде [кинетин]/[НУК], равном 1:3, было более низким по сравнению с другими вариантами. Поэтому для дальнейшего субкультивирования каллусной ткани *Vinca major* была использована среда, содержащая 1 мг/л кинетина и 1 мг/л НУК, позволяющая снизить расход дорогостоящих фитогормонов.

Полученную каллусную культуру субкультивировали в течение нескольких лет, оценивая индекс роста и содержание сухого вещества. Как видно на рисунке 3 при дальнейшем субкультивировании ростовые процессы исследуемой каллусной культуры характеризовались достаточной стабильностью. Индекс роста со временем культивирования

от 3-х до 48 месяцев практически не менялся. Не было отмечено и достоверных изменений в накоплении сухого вещества каллусом. Данный параметр составлял, как правило 6,5–7%.

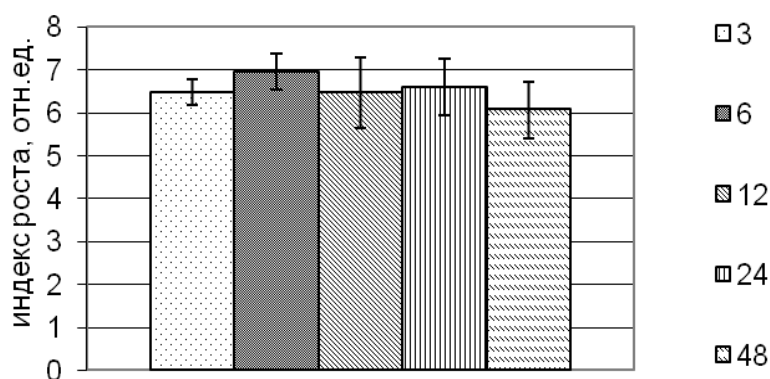


Рисунок 3 – Индекс роста каллусной культуры *Vinca major* L. при субкультивировании в течение 3–48 месяцев

Поскольку наиболее востребованным объектом в промышленной биотехнологии является клеточная суспензия, так как она характеризуется ускоренными ростовыми процессами и более однородными клетками, из каллусной ткани барвинка малого была инициирована суспензионная культура. Инициацию первичной суспензии и дальнейшее субкультивирование осуществляли на среде МС, содержащей 1 мг/л кинетина и 1 мг/л НУК. Для инициации использовали интенсивно пролиферирующую рыхлую каллусную культуру.

Далее исследовали зависимость индексов роста каллусной и суспензионной культур от времени культивирования. На рисунке 4 представлены полученные ростовые кривые, рассчитанные по приросту сырой и сухой массы.

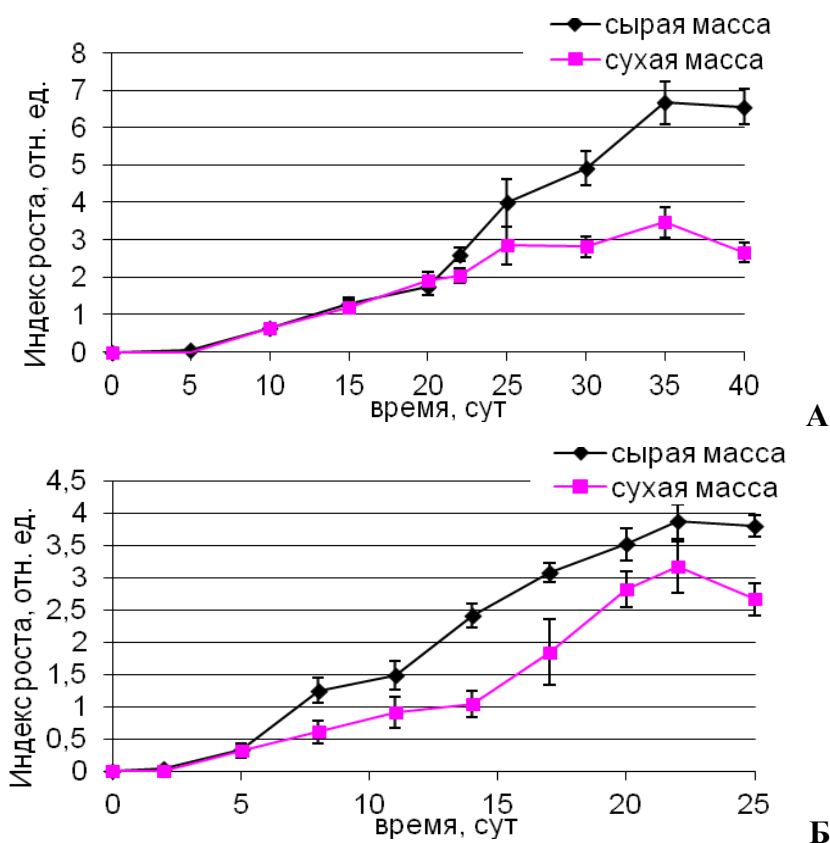


Рисунок 4 – Ростовые кривые каллусной (А) и суспензионной (Б) культур *Vinca major* L.

На рисунке 4 видно, что на ростовых кривых и для каллусной, и для суспензионной культур можно выделить фазы ростового цикла. Так, лаг-фаза ростового цикла каллусной культуры заканчивалась к 10-м, суспензионной – к 5-м суткам культивирования. Лог-фаза каллусной культуры продолжалась в течение 10–35, суспензионной – 5–22 суток культивирования. Стационарная фаза для клеток каллусной культуры начиналась после 35, для суспензионных – после 22 суток культивирования. На рисунке 4 также видно, что ростовые кривые, рассчитанные по приросту сырой и сухой массы, существенно различаются. Так, для каллусной культуры после 25 суток культивирования кривая прироста сухого вещества выходит на плато, в то время как накопление сырой массы еще продолжается. Таким образом, очевидно, что прирост биомассы в каллусной ткани после 25 суток культивирования происходит только за счет водообменных процессов. На этапе линейного роста в клетках активируются биосинтетические процессы, образуются продукты первичного и вторичного метаболизма при использовании углеводов из питательной среды. При истощении питательной среды в культивируемых *in vitro* клетках и тканях замедляются и ростовые и биосинтетические процессы. Снижение сухого веса культуры на данном этапе свидетельствует об использовании клетками накопленных углеводов [12]. Однако сырой вес продолжает расти вследствие накопления клетками воды из питательной среды. Сравнительный анализ ростовых кривых по сырой и сухой массе для суспензионной культуры показывает, что уже после 5 суток культивирования на протяжении всего ростового цикла сырая биомасса накапливается более интенсивно за счет накопления воды клетками. В то же время, если в начале лог-фазы индексы роста суспензионной культуры, рассчитываемые по сырой и сухой массе отличались в 2,5 раза, то на стационарной – только в 1,2 раза.

Выводы

В результате проведенных исследований было установлено, что увеличение в среде культивирования каллусной ткани содержания кинетина и НУК при их соотношении, равном 1:1, в концентрациях от 0,1 до 2 мг/л для каждого фитогормона приводило к стимуляции каллусогенеза и активации роста каллусной ткани. Увеличение содержания НУК и кинетина до 3 мг/л дополнительному увеличению индекса роста не способствовало. В то же время повышение (по сравнению с концентрацией кинетина) содержания НУК в питательной среде стимулировало увеличение прироста сырой биомассы, но не накопление сухого вещества. Оптимальной для ростовых и биосинтетических процессов клеточных культур *V. major* является питательная среда, содержащая 1 мг/л кинетина и 1 мг/л НУК. При таком соотношении фитогормонов индекс роста и содержание сухого вещества составляют 6–7 отн.ед. и 6,5–7%, соответственно. Накопление сухого вещества и, таким образом, возможно, фармакологически ценных вторичных метаболитов, в каллусной культуре *Vinca major* L. происходит в течение 25–30, в суспензионной – 20–22 суток культивирования.

Список литературы

1. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование: В 9 т. – Л.: Наука. 1990. Т. 5: Семейства *Caprifoliaceae* – *Plantaginaceae*. – 1990. – 328 с.
2. Джус, М.А. Род *Vinca* L. (Аросунасеае) во флоре Беларуси / М.А. Джус, О.В. Молчан, Л.В. Кухарева, Е.В. Спиридович, В.М. Юрин // Украинский ботанический журнал. – 2009. – Т. 66. – № 6. – С. 783–793.
3. Şöhretoğlu, D. Iridoids, monoterpene glucosides, alkaloids and flavonoids from *Vinca major* / D. Şöhretoğlu, M. Masullo, S. Piacente, H. Kirmizibekmez // *Biochemical Systematics and Ecology*. – 2013. – V. 49. – P. 69–72.
4. Tatsuzawa, F. Differences in the floral anthocyanin content of violet–blue flowers of *Vinca minor* L. and *V. major* L. (Apocynaceae) / F. Tatsuzawa // *Phytochemistry Letters*. – 2015. – V. 13. – P. 365–369.

- 5.Cheng, G.G. Non-alkaloid constituents of *Vinca major* / G.G. Cheng et. al. // Chinese Journal of Natural Medicines. – 2016. –V. 14. Is. 1. –P. 56–60.
- 6.Юрин, В.М. Культура растительных клеток и тканей: технология получения, разнообразие фармакологически активных метаболитов и приемы регуляции их синтеза / В.М. Юрин и др. // Труды БГУ. Серия «Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем»– 2010. –Т.4. Ч.2. – С. 1–15.
- 7.Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // *Physiol. Plant.* – 1968. – Vol. 15, №13. – P. 473–497.
- 8.Болвелл, Г.П. Биотехнология растений: культура клеток / под. ред. Р.Г. Бутенко. – М.: Агропромиздат, 1989. – 280 с.
- 9.Бутенко, Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе / Р.Г. Бутенко. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
- 10.Рокицкий, П.Ф. Биологическая статистика / П.Ф. Рокицкий. – М.: Высш. школа, 1978. – 312 с.
11. Eilert,U. Greening and strictosidine lactam production in two cell lines of *Vinca major* cv. *variegata* / U. Eilert, J. Balsevich, W. G. W. Kurz. –*Plant Cell, Tissue and Organ Culture* January. – 1987. –V.8. Issue 2. –P. 177–182.
- 12.Methods in Molecular biology. Plant Cell and Tissue Culture. / Ed. by J.W. Pollard and J.M. Walker // Humana press. Clifton, New Jersey. – 1990. – V. 6. – 597 p.
- 13.Saini, S. Auxin: a master regulator in plant root development / S. Saini, I. Sharma, N. Kaur, P. K. Pati // *Plant Cell Rep.* –2013. – V. 32. – P.741–757.
- 14.Kunikowska, A. Cytokinins resume: their signaling and role in programmed cell death in plants / A. Kunikowska, A. Byczkowska, M. Doniak, A. Kaz'mierczak // *Plant Cell Rep.* – 2013. – V. 32. – P. 771–780.
- 15.Skoog, F., and Miller, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Molecular and Cellular Aspects of Development*, E. Bell, ed., Harper and Row, New York. – 1965. – P. 481–494.

**EFFECTS OF PHYTOHORMONES ON CALLUS INITIATION AND GROWTH
CHARACTERISTICS OF CALLUS AND SUSPENSION CULTURES
OF *VINCA MAJOR* L.**

O.V. Molchan, V.M. Yurin*

Institute of experimental botany NAS of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

**Belarussian State University, Minsk, Republic of Belarus*

e-mail: olga_molchan@mail.ru

Callus cultures of *Vinca major* L. were induced on MS medium with different concentration of NAA and kinetin. The most efficient hormone combinations were identified to stimulate callus, roots or shoots development. There were significant differences in the tissue morphology resulting from varying phytohormones content. One of hormones combinations was the most efficient in promoting callus development, total biomass and dry mass production. This combination was selected to induce cell suspension cultures. Total biomass and dry mass growth of *Vinca major* L. callus and suspension cultures were studied.