

**Культура клеток и тканей**

УДК 581.143.6:57.08

**ОПТИМИЗАЦИЯ СРЕД ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ РАСТЕНИЙ  
in vitro НА ПРИМЕРЕ ЩАВЕЛЯ ВОДНОГО *Rumex aquaticus* L.\***

**М.В. СКАПЦОВ, Д.В. БАЛАБОВА, М.Г. КУЦЕВ**

Одна из проблем размножения растений *in vitro* — накопление полифенольных соединений, вследствие чего для некоторых культур требуется частый пассаж на свежие питательные среды. Мы протестирували дополнительные компоненты питательных сред в отношении их влияния на накопление полифенольных соединений в тканях и питательной среде и активность пролиферации и жизнеспособности каллусных клеток. Каллус индуцировали из листовых эксплантов щавеля водного (*Rumex aquaticus* L., модельный объект) на среде Мурасиге-Скуга, содержащей бензиладенин-6 и α-нафтилуксусную кислоту. Полученные каллусы субкультивировали на тех же средах с добавлением сорбентов (поливинилпирролидон) и антиоксидантов (тиосульфат натрия). Наблюдалось увеличение срока жизни каллусов без частого субкультивирования за счет снижения накопления суммы полифенолов в тканях. Установлено, что содержание фенольных соединений на классических средах при длительном культивировании достигает 7 мг на 1 г каллусной ткани, после чего наблюдается остановка роста и гибель клеток. Напротив, на модифицированных средах в тканях каллусов содержится в среднем в 2 раза меньше полифенолов, чем в выращенных без внесения в среды сорбентов и антиоксидантов.

**Ключевые слова:** *Rumex aquaticus* L., каллусообразование, биотехнология, поливинилпирролидон, полифенолы.

Щавель водный (*Rumex aquaticus* L.) благодаря неприхотливости, быстрому росту биомассы, удобству при получении протопластов и генноинженерных операциях служит перспективным объектом для исследований в области селекции, биотехнологии и генной инженерии растений (1).

Одна из проблем размножения растений *in vitro* — накопление полифенольных соединений, вследствие чего для некоторых культур требуется частый пассаж на свежие питательные среды. Продукты фенольного окисления токсичны для каллусной ткани и замедляют ее рост (2).

Для снижения эффекта накопления полифенолов чаще всего применяют хитозан, цистеин, фенолпропаноид, аскорбиновую кислоту или адсорбенты, например активированный уголь (3). Хитозан обладает антибактериальным действием, но подавляет ферментативную активность (4). Цистеин также служит сильным ингибитором последней (4, 5).

Для связывания продуктов окисления полифенольных соединений при культивировании растительных клеток используют химические сорбенты, такие как поливинилпирролидон или вещества, проявляющие антиоксидантную активность (6).

Целью нашей работы было исследование дополнительных компонентов питательных сред для снижения негативного влияния накопления полифенольных соединений в тканях и питательной среде на активность пролиферации и жизнеспособность клеток при поверхностном культивировании тканей растений.

**Методика.** Культивирование *in vitro* изолированных тканей и органов растений *R. aquaticus* осуществляли согласно общепринятым рекомендациям с вариациями (7). На разных этапах экспериментальной работы использовали минеральную основу питательных сред Мурасиге-Скуга (MS) с добавлением сахарозы (30 г/л), мезоинозитола (100 мг/л), агара

\* Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ (13-04-90774-мол\_рф\_нр).

(6 г/л) (8, 9). Поверхностную стерилизацию листьев проводили в течение 15 мин в 2 % растворе лизоформина (10). В качестве исходного материала для индукции каллусогенеза использовали листья *R. aquatics*, у которых удаляли листовую пластинку, а центральную жилку делили на фрагменты и помещали на питательные среды.

Экспланты культивировали на агаризованной питательной среде MS. Каллусогенез индуцировали в условиях затемненности, при температуре 25 °С. Субкультивирование осуществляли через 28-30 сут (до появления белого плотного каллуса).

Для индукции и поддержания каллусогенеза экспланты культивировали на твердой питательной среде MS с добавлением ауксинов и цитокининов в различных концентрациях и сочетаниях: бензиладенин-6 (БА), α-нафтилуксусная кислота (НУК), дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д), 4-амино-3,5,6-трихлорпиколиновая кислота (АТХП) («Sigma Aldrich», Германия). Рассматривали следующие варианты: БА (0,4 мг/л) + НУК (1,9 и 3,7 мг/л); БА (0,4 и 2,2 мг/мл) + 2,4-Д (2,2 мг/мл); БА (0,4 и 1,1 мг/л) + АТХП (2,4 мг/л). После подбора оптимальных концентраций регуляторов роста полученные каллусы пассировали на среду MS, в которую вносили поливинилпирролидон К30 (ПВП; «AppliChem», Германия) в концентрации 2, 5, 7 и 10 г/л, контроль ставили без добавления в питательные среды ПВП. В качестве антиоксиданта использовали тиосульфат натрия (100, 150, 200, 250 и 300 мг/л) (ЗАО «Новосибхимфарм», Россия). Для оценки комплексного влияния ПВП и тиосульфата натрия на продолжительность культивирования каллусных тканей наблюдали за изменением окраски каллусов.

Количественное определение суммы полифенолов осуществляли в соответствии с общепринятой методикой (11). Для анализа концентрации полифенолов проводили отбор каллусных масс через 30 и 40 сут от последнего пассажа со сред, содержащих ПВП, и контрольных сред (без ПВП). Каллусы высушивали при 40 °С в вытяжном шкафу, затем измельчали в ступке до размера частиц, проходящих через сито с диаметром отверстий 2 мм. Для экстракции 40 мг измельченных каллусных тканей помещали в пробирки типа Eppendorf и заливали 1 мл дистиллированной воды, после чего плотно закрытые пробирки переносили в твердотельный термостат Термит («ДНК-Технология», Россия) на 1,5-2,0 ч при температуре 40 °С, смесь встряхивали на вортексе каждые 15 мин. По окончании экстракции образцы центрифугировали (MultiSpin, «Eppendorf GmbH», Германия) 1 мин при 10 тыс. об/мин до осветления раствора. Полученный супернатант использовали в дальнейших исследованиях. Суммарное содержание фенольных соединений определяли методом Фолина-Чокальтеу в пересчете на галловую кислоту.

Статистический анализ проводили в программе Statistica v. 8.0.

*Результаты.* Для длительного поддержания активно пролиферирующей культуры *in vitro* важно подобрать оптимальное соотношение цитокинина и ауксина. Как показали результаты наших исследований, темпы роста щавеля водного были значительно выше при концентрациях бензиладенина-6 (БА) 0,4 мг/л и α-нафтилуксусной кислоты (НУК) 1,9 мг/л (табл. 1).

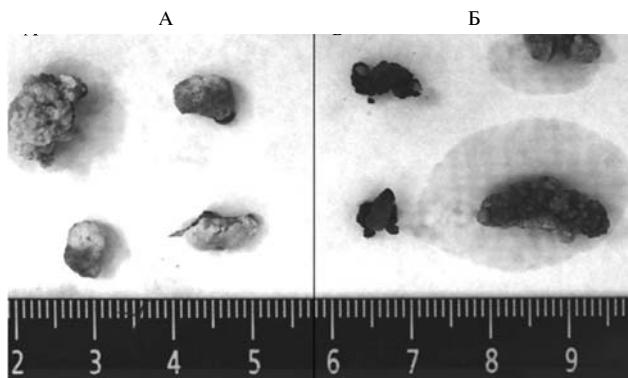
В среде для культивации оптимальными были концентрации ПВП 10 г/л и тиосульфата натрия 250 мг/л. Показателем накопления полифенолов в каллусной ткани служило изменение окраски каллуса: на среде без ПВП окраска тканей становилась темно-буровой (рис., Б) вследствие

накопления полифенолов. В присутствии ПВП таких изменений не наблюдалось (см. рис., А).

### 1. Индукция каллуса *Rumex aquaticus* L. в зависимости от концентрации регуляторов роста в среде

Концентрация фитохормонов, мг/л	Число эксплантов, шт.	Доля эксплантов, индуцирующих каллус, %	Морфология каллуса		Рост каллуса
			структура	цвет	
0,4 (БА) + 1,9 (НУК)	20	50	Плотный	Белый	++
0,4 (БА) + 3,7 (НУК)	20	70	Плотный	Белый	+
0,4 (БА) + 2,2 (2,4-Д)	20	5	Плотный	Белый	-
2,2 (БА) + 2,2 (2,4-Д)	20	80	Мягкий	Серый	+
0,4 (БА) + 2,4 (АТХП)	20	50	Плотный	Серый	+
1,1 (БА) + 2,4 (АТХП)	20	20	Плотный	Серый	+

П р и м е ч а н и е. «—» — после инициации рост прекращается, «+» — рост незначителен, «++» — хороший рост; БА — бензиладенин-6, НУК —  $\alpha$ -нафтилуксусная кислота, 2,4-Д — дихлорфеноксикускусная кислота, АТХП — 4-амино-3,5,6-трихлорпиколиновая кислота.



Каллусная ткань *Rumex aquaticus* L. через 45 сут культивирования на среде MS с добавлением поливинилпирролидона (А) и без него (Б).

Культуре варировало от 0,7 до 2,7 мг, после 40 сут — от 1,1 до 5,8 мг на 1 г ткани. Концентрация полифенолов в тканях, культивировавшихся на средах без ПВП и антиоксидантов, составляла в расчете на 1 г ткани 2,0-3,1 мг через 30 сут и 4,5-10,7 мг через 40 сут. Показатели относительной ошибки среднего значения и коэффициента вариации при доверительной вероятности 95 % равнялись соответственно не более 9 и 38 % (табл. 2).

### 2. Содержание суммы полифенолов в тканях *Rumex aquaticus* L. в зависимости от типа среды и времени культивирования

Тип среды	Время культивирования, сут	Минимальное содержание, мг/г	Максимальное содержание, мг/г	$\bar{X}_{\text{ср.}} \pm \varepsilon$ , мг/г	$Cv$ , %
MS модифицированная	30	0,7	2,7	1,9±0,2	38
MS модифицированная	40	2,5	5,8	3,7±0,3	27
MS немодифицированная	30	3,1	8,1	4,5±0,3	35
MS немодифицированная	40	4,5	10,7	6,9±0,5	26

П р и м е ч а н и е.  $\bar{X}_{\text{ср.}}$  — среднее значение,  $\varepsilon$  — относительная ошибка среднего значения,  $Cv$  — коэффициент вариации.

Таким образом, при культивировании каллусной ткани щавеля водного в присутствии ПВП и тиосульфата натрия снижается накопление производных полифенолов. Каллусные ткани, культивирующиеся без смеси питательной среды и внесения ПВП в течение 40 сут и более, прекращают рост и развитие. Наши данные свидетельствуют о целесообразности применения ПВП и тиосульфата натрия для продления срока жизни тка-

ни.

Количественное содержание суммы полифенолов в сырых каллусных тканях *R. aquaticus* на модифицированных средах с ПВП и тиосульфатом натрия после 30 сут культивирования варьировало от 0,7 до 2,7 мг, после 40 сут — от 1,1 до 5,8 мг на 1 г ткани. Концентрация полифенолов в тканях, культивировавшихся на средах без ПВП и антиоксидантов, составляла в расчете на 1 г ткани 2,0-3,1 мг через 30 сут и 4,5-10,7 мг через 40 сут. Показатели относительной ошибки среднего значения и коэффициента вариации при доверительной вероятности 95 % равнялись соответственно не более 9 и 38 % (табл. 2).

ней, которые размножают методом поверхностного культивирования растений, требовательных к частой смене питательных сред.

*Авторы выражают глубокую благодарность С.В. Смирнову за ценные консультации и оказанную помощь в организации работы.*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ai-fang Y., Su-yun J., Xiao-guang D., Ju-ren Z. High efficient in vitro propagation and salt tolerant plantlet regeneration in *Rumex*. *Acta Pratacultural Sinica*, 2005, 14(2): 56-61.
2. Naz S., Ali A., Iqbal J. Phenolic content in vitro cultures of chick pea (*Cicer arietinum L.*) during callogenesis and organogenesis. *Pac. J. Bot.*, 2008, 40(6): 2525-2539.
3. Lewandowski I., Kahlnt G. Development of a tissue culture system with unemerged inflorescence of *Misanthus «Gigantheus»* for the induction and regeneration of somatic embryos. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen*, 1993, 1: 439-451.
4. Sapers G. Chitosan enhances control of enzymatic browning in apple and pear juice by filtration. *J. Food Science*, 1992, 57: 1192-1193.
5. Walker J. Enzymatic browning in foods. Its chemistry and control. *Food Technology New Zealand*, 1977, 12: 19-25.
6. Cilliers J., Singleton V. Caffeic acid autoxidation and the effects of thiols. *J. Agriculture and Food Chemistry*, 1990, 38: 1789-1796.
7. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений in vitro и биотехнология на их основе: уч. пос. М., 1999.
8. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 1962, 15(13): 473-497.
9. Муратова С.А., Шорников Д.Г., Янковская М.Б., Папихин Р.В. Совершенствование метода клonalного микроразмножения актинидии и лимонника китайского. Современное садоводство, 2010, 1: 96-100.
10. Вечерина Н.А. Биотехнология растений: уч. пос. Барнаул, 2009.
11. Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище. Руководство. Р 4.1.1672-03 (Утв. главным государственным санитарным врачом РФ 30.06.2003)/МЗ России. М., 2004.

ФГБОУ ВПО Алтайский государственный  
университет, УПБП Южно-Сибирский  
ботанический сад,  
656049 Россия, г. Барнаул, просп. Ленина, 61,  
e-mail: mr.skaptsov@mail.ru, m\_kucev@mail.ru, biotech@bio.asu.ru

Поступила в редакцию  
21 мая 2012 года

## OPTIMIZATION OF MEDIA FOR in vitro PLANT CULTIVATION BY THE EXAMPLE OF WATER SORREL (*Rumex aquaticus L.*)

*M.V. Skaptsov, D.V. Balabova, M.G. Kutsev*

*Altai State University, South Siberian Botanical Garden, 61, prospr. Lenina, Barnaul, 656049 Russia, e-mail  
mr.skaptsov@mail.ru, m\_kucev@mail.ru, biotech@bio.asu.ru*

### Abstract

Accumulation of polyphenols makes a real problem under in vitro plant propagation because of toxic effects of phenol oxidation products to callus tissue, and in some cases a frequent subculturing is required. We screened the possible media components for decreasing negative effects of polyphenols to cell proliferation and viability under cultivation, callus tissue of Sorrel aqueous *Rumex aquatics L.* used as a model. Callus was induced from leaf explants on basal Murashige and Skoog medium with benzyladenin-6 and  $\alpha$ -naphthylacetic acid. Derived callus was subcultivated on the same medium with the addition of sorbents (polyvinylpyrrolidone) and antioxidants (sodium thiosulfate). There is the prolongation of life of callus without frequent subculturing by reducing accumulation of polyphenols in the tissues. Through quantitative studies of the amount of polyphenols by a modified method of Folin-Chokalteu, it was established that the concentration of phenolic compounds in the tissues in the classical media with long-term cultivation made up to 7 mg per 1 g of callus tissue, if re-counted to gallic acid, followed by a growth arrest and cell death. In contrast, in the modified media a content of polyphenols is an average of up to 2 times lower than in the callus tissue grown in the medium without use of adsorbents and antioxidants.

Keywords: *Rumex aquaticus L.*, callus formation, plant biotechnology, polyvinylpyrrolidone, polyphenols.