

УДК 581.19:57.086.83

О. В. КОПАЧ, А. А. КУЗОВКОВА, В. Н. РЕШЕТНИКОВ

**ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ
КРАСНО- И БЕЛОЦВЕТКОВОЙ РАС *SILYBUM MARIANUM* ПРИ ВВЕДЕНИИ
В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* И КАЛЛУСОГЕНЕЗЕ**

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, e-mail: olga-kopa@mail.ru

(Поступила в редакцию 11.03.2013)

Введение. Лекарственные растения являются природными источниками биологически активных веществ (БАВ). Сегодня в медицине, пищевой и парфюмерно-косметической промышленности активно используется более 300 видов растений, из которых около 60 – специально выращиваются, а остальные – дикорастущие [1]. Решить проблему дефицита сырья и сохранить в природе лекарственные растения могут клеточные технологии. Культуры клеток, тканей, органов и микрорастения *in vitro* можно использовать как «фабрики» по производству БАВ [2,3]. Однако широкое их использование часто лимитировано рядом факторов, один из которых – недостаток знаний о физиологии и биохимии клеточных культур конкретных лекарственных растений.

Известно, что клетки каллусных культур испытывают окислительный стресс вследствие специфических условий *in vitro* [4]. Сильное развитие окислительного стресса приводит к клеточным повреждениям и гибели культуры. Активные формы кислорода – прооксиданты – утилизируются специализированными неферментными и ферментными антиоксидантными системами. Способность клеток поддерживать баланс между образованием прооксидантов и их деактивация зависят от генотипа растения. Поэтому цель наших исследований состояла в выявлении физиологических особенностей и сравнительном анализе состояния ферментной антиоксидантной системы (по активности пероксидаз гваяколового типа (ПГТ) и супероксиддисмутаз (СОД)) лекарственного растения расторопши пятнистой (*Silybum marianum* L.) двух рас – красноцветкового сорта Золушка белорусской селекции и белоцветкового сортообразца венгерской селекции – при введении в культуру *in vitro* и каллусогенезе. Оценка состояния антиоксидантной системы *S. marianum* исследуемых сортов актуальна также и с позиции их общей биохимической характеристики, поскольку ранее было показано [5], что семена сортов расторопши пятнистой, относящихся к разным расам, отличаются по накоплению БАВ, особенно силимарина, обладающего антиоксидантной активностью. Силимарин (силимариновый комплекс) – это собирательное название флавонолигнанов, основных БАВ расторопши пятнистой [6]. На основе силимарина разработан ряд фармакологических препаратов с высоким антигепатотоксическим, гепатопротекторным и антихолестерологическим действием [7, 8]. Однако до сих пор стоит проблема стандартизации содержания изомеров флаволигнанов в сырье и препаратах. Она может быть решена при использовании в качестве источника силимарина культуры клеток *S. marianum* с прогнозируемым и стабильным выходом БАВ.

Материалы и методы исследования. Для введения в культуру *in vitro* семена *S. marianum* сорта Золушка были представлены лабораторией биоразнообразия растительных ресурсов ЦБС НАН Беларуси, а сортообразца венгерской селекции – доктором Abel Laszlio-Bencsik-Budakalasz из Research Institute For Medical Plants (Венгрия). Всхожесть семян оценивали на 7-й день прорастания. Стерилизацию семян проводили промыванием в хозяйственном мыле и замачиванием

в 0,4%-ном растворе контактного фунгицида «Дитан» в течение 40 мин и 10%-ном растворе гипохлорита натрия в течение 20 мин с последующим трехкратным промыванием автоклавированной водой. Семена проращивали на модифицированной питательной среде Мурасиге-Скууга (МС) с добавлением 0,05%-ного активированного угля на свету с фотопериодом 16 ч день / 8 ч ночь при температуре 25°C. В возрасте 17 дней растения отделяли от семян и пересаживали на свежую среду МС и культивировали на свету с указанным выше фотопериодом. Каллусы инициировали из корневых и семядольно-листовых эксплантов-сегментов размерами 4 мм, взятых

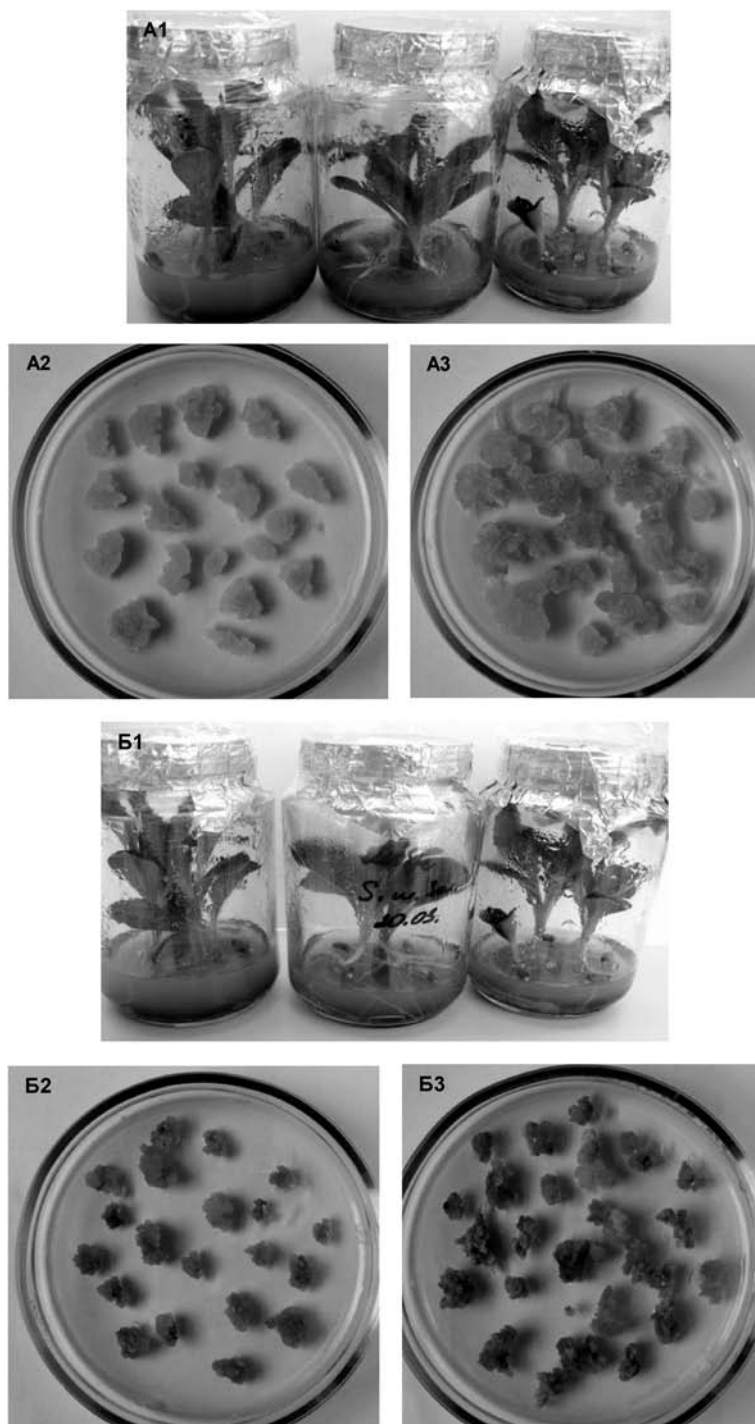


Рис. 1. 17-дневные растения *S. marianum* в культуре *in vitro* и индуцированные из них каллусы 4-го пассажа: А1 – белоцветковый сортообразец венгерской селекции; А2 – корневой каллус; А3 – семядольно-листовой каллус; Б1 – красноцветковый сорт Золушка белорусской селекции; Б2 – корневой каллус; Б3 – семядольно-листовой каллус

с 17-дневных растений на среде МС, содержащей гормоны 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (1 мг/л) и кинетин (0,4 мг/л), с рН до автоклавирования 5,7. Культивирование проводили в темноте при температуре 25°C. Через 2–3 недели каллусы пассировали на среду МС с добавлением гормонов бензиламинопурина (2 мг/л) и нафтилуксусной кислоты (1 мг/л). Каждые 14–17 дней каллусы пассировали на свежую среду. Для анализов использовали каллусы 0, 1, 2 и 5 пассажей.

Экстракцию белков вели по [10] с нашими модификациями, используя 37,5 мМ Трис-НСl буфер (рН 7,6), содержащий 5 мМ аскорбата. Во всех экспериментах соотношение «навеска:буфер» было 1:3. Содержание белка определяли используя набор реагентов «DC Protein Assay» (Bio-Rad, США) [9]. Активность ПГТ оценивали по [10] и выражали в условных единицах на миллиграмм белка. Активность СОД определяли по [11], за единицу активности принимали количество фермента, способного ингибировать на 50 % реакцию восстановления нитросинего тетразолия. Все анализы проводили как минимум в шестикратной повторности, полученные результаты обрабатывали используя статистику Microsoft Office Excel.

Результаты и их обсуждение. При введении в культуру *in vitro* всхожесть семян *S. marianum* сорта Золушка составила 51,7 %, их инфицированность – 8,3 %, для сортообразца данные показатели составили 83,5 и 1,2 % соответственно. К 7-му дню культивирования у обоих вариантов одновременно с появлением корней начиналось развитие семядольных листьев, к 17-му дню была сформирована одна пара настоящих листьев, вторые находились на начальном этапе развития. Однако следует отметить, что габитус растений белоцветковой расы превышал таковой красноцветковой, в частности размер семядольных листьев (рис. 1).

17-дневные растения сортообразца венгерской селекции отличались от сорта Золушка и по ряду биохимических показателей. Обнаружены различия в содержании белка и особенно в активности главных антиоксидантных ферментов в корнях, стеблях, семядольных и настоящих листьях (табл. 1). Повышенное содержание белков в семядольных листьях *S. marianum* белоцветковой расы, по-видимому, и явилось одной из причин их лучшего развития.

Т а б л и ц а 1. Биохимическая характеристика 17-дневных *in vitro* растений *S. marianum* красно- и белоцветковой рас

Показатель	Орган			
	корень	стебель	лист	семядольный лист
Красноцветковый сорт Золушка белорусской селекции				
Содержание белка, мг/мл	2,113±0,064	0,599±0,044	1,5±0,037	0,764±0,046
Активность пероксидазы, у.е/мг белка	17984,126±2020,23	5550,479±532,1	71,378±7,077	1125,654±75,071
Активность СОД, у.е/мг белка	54,790±5,058	90,471±1,213	259,737±6,19	133,78±4,279
Белоцветковый сортообразец венгерской селекции				
Содержание белка, мг/мл	1,764±0,095	0,651±0,082	0,938±0,042	1,07±0,086
Активность пероксидазы, у.е/мг белка	2946,334±529,490	1597,649±183,047	1131,802±122,889	1536,571±131,412
Активность СОД, у.е/мг белка	702,773±63,69	276,084±7,502	253,962±25,66	392,396±69,39

Инициация каллусогенеза на корневых и семядольно-листовых эксплантах красно- и белоцветковой *S. marianum* также наступала в разные сроки. Очаги каллусных клеток на эксплантах венгерского сортообразца появились на 11-й день культивирования, а у сорта Золушка – лишь на 19-й. К 18-му дню у 100 % корневых и семядольно-листовых эксплантов белоцветковой расторопши был полностью сформирован краевой каллус, в то время как у красноцветковой эта стадия каллусогенеза наблюдалась на 29-й день культивирования. Вероятно, экспланты от

белоцветковых растений венгерской селекции обладали гормональным статусом, способствующим более активному каллусогенезу. Определенную роль, возможно, в этом сыграла и высокая активность СОД – фермента, утилизирующего свободные радикалы. Роль ПГТ в инициации каллусогенеза у расторопши пятнистой неоднозначна, поскольку не наблюдалось единообразия в поведении ПГТ в корнях и семядольных листьях красно- и белоцветковых растений (табл. 1).

Биохимический анализ первичных каллусов (нулевой пассаж – 34 дня культивирования на среде для каллусогенеза для сорта Золушка и 25 дней – для венгерского сортообразца) показал (рис. 2), что инициация каллусогенеза сопровождается индукцией синтеза белка в растительных клетках. При этом в первичных корневых каллусах и от белоцветковой и особенно от красноцветковой расторопши пятнистой (табл. 1,2) резко снижается активность ПГТ (соответственно в 7 и 373 раза) по сравнению с таковой в корнях растений. Активность СОД у каллусов также была снижена (соответственно в 60 и 2 раза). В первичных семядольно-листовых каллусах на фоне многократного увеличения содержания белка также наблюдалось падение активности ПГТ: незначительное, в 2 раза, в каллусах от сорта Золушка и экстремальное – в 384 раза от сортообразца по сравнению с исходным эксплантом. При этом активность СОД в каллусе от белоцветковой расторопши была в 43 раза ниже таковой в семядольных листьях, а в каллусе от красноцветковых растений не тестировалась вовсе.

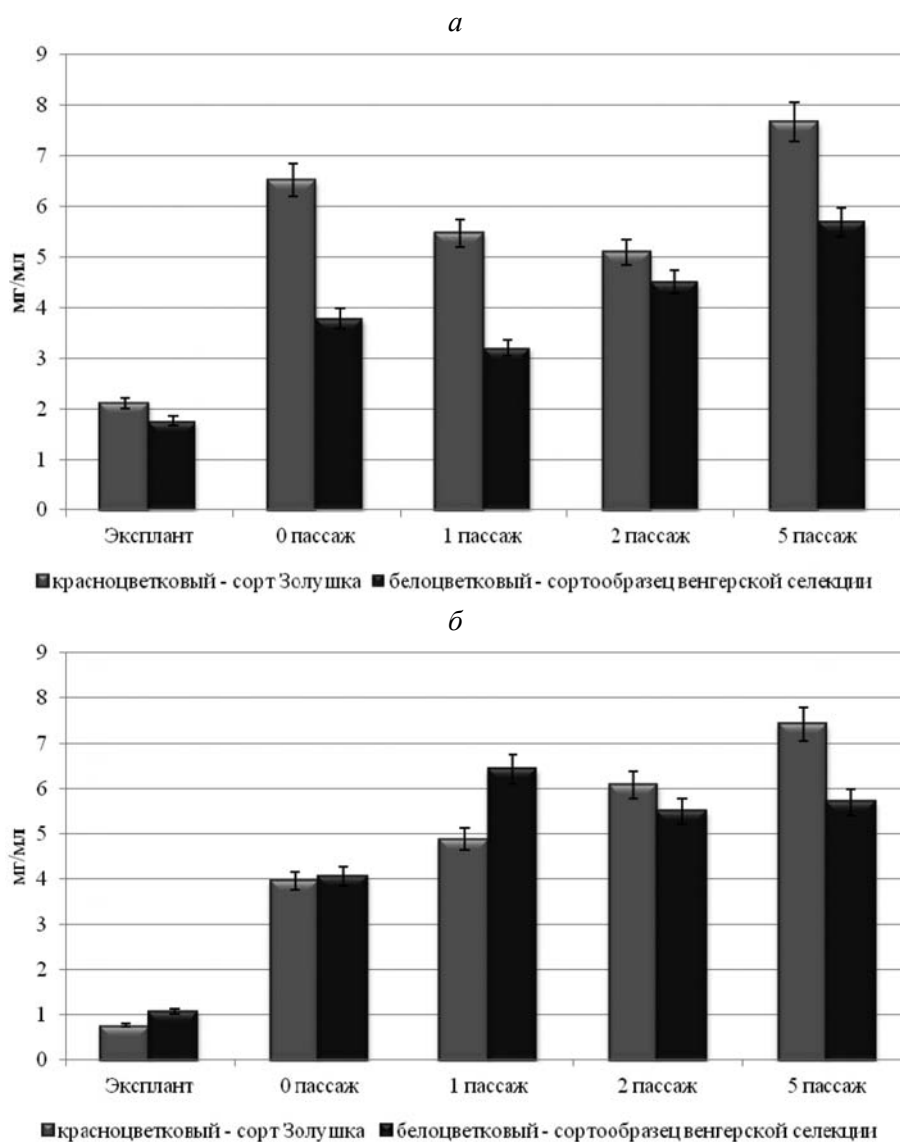


Рис. 2. Содержание белка (мг/мл) в эксплантах *S. marianum* красно- и белоцветковой рас и индуцированных из них каллусах: а – корень и корневые каллусы; б – семядольный лист и семядольные каллусы

После пассирования на свежую среду (1-й пассаж) и культивирования в течение 17 дней каллусы от *S. marianum* венгерской селекции приобрели более рыхлую структуру и светло-кремовый цвет в отличие от плотных коричневых каллусов (особенно корневых) от белорусских растений. Данные морфологические особенности каллусов сохранялись и в течение 4 следующих пассажей на свежую среду (рис. 1).

Содержание белка в корневых каллусах от растений обеих рас в течение 2 пассажей сохранялось на уровне первичного каллуса (рис. 2), но к 5-му пассажи увеличивалось на 18 % у каллусов от красноцветковой и на 50 % – от белоцветковой расы. Четкая тенденция к увеличению содержания белка прослеживалась от пассажа к пассажи и у семядольно-листового каллуса от белорусской расторопши (на 88 % от 1-го к 5-му пассажи). При каллусогенезе на семядольных листьях венгерского сортообразца подобной картины не наблюдалось. Следует отметить, что в целом в корневых каллусах от красноцветковых растений содержание белка было большим, чем в таковых от белоцветковых. Содержание белка в семядольно-листных каллусах от обеих рас было сходным, за исключением каллусов 5-го пассажа.

Активность ПГТ в корневых каллусах резко уменьшалась от нулевого к 5-му пассажи как у красно-, так и у белоцветковой рас (табл. 2). Причем активность ферментов в 1-м и 2-м пассажах корневых каллусов от сортообразца была настолько низкой, что не тестировалась используемым методом.

Т а б л и ц а 2. Активность ПГТ (в у.е/мг белка) в каллусах *S. marianum* красно- и белоцветковой рас

Каллус	Пассажи			
	0	1	2	5
Красноцветковый сорт Золушка белорусской селекции				
Корневой	48,25±3,87	68,85±5,41	16,01±1,39	2,377±0,275
Семядольно-листовой	695,677±46,076	182,564±25,124	13,684±1,769	8,122±0,569
Белоцветковый сортообразец венгерской селекции				
Корневой	435,93±26,13	–	–	10,18±0,355
Семядольно-листовой	3,349±0,189	2,149±0,092	13,684±0,897	4,264±0,067

Похожая тенденция к резкому снижению активности ПГТ при каллусогенезе была отмечена (табл. 2) и для семядольно-листового каллуса от красноцветковых растений. В семядольно-листных каллусах от белоцветковой расторопши активность ПГТ экстремально упала в момент инициации каллусообразования и сохранялась на низком уровне от пассажа к пассажи. Что касается изменения в поведении СОД на ранних стадиях каллусогенеза расторопши пятнистой (1–5-й пассаж), то четких закономерностей выявить не удалось (табл. 3).

Т а б л и ц а 3. Активность СОД (в у.е/мг белка) в каллусах *S. marianum* красно- и белоцветковой рас

Каллус	Пассажи			
	0	1	2	5
Красноцветковый сорт Золушка белорусской селекции				
Корневой	25,092±7,088	10,131±0,541	4,127±0,570	20,758±0,76
Семядольно-листовой	–	25,569±1,873	21,199±8,72	27,235±3,125
Белоцветковый сортообразец венгерской селекции				
Корневой	11,631±2,299	19,741±3,84	11,398±3,329	5,449±0,947
Семядольно-листовой	9,166±0,878	5,329±0,655	24,275±0,793	65,645±17,322

Заклучение. Показано, что исследуемые представители красно- и белоцветковой рас расторопши пятнистой отличаются по содержанию белка и активности ПГТ и СОД в отдельных органах (настоящих и семядольных листьях, корнях). Повышенное содержание белка в семядольных листьях белоцветкового сортообразца венгерской селекции, по-видимому, явилось одной из причин их лучшего развития к 17-му дню культивирования в условиях *in vitro* по сравнению с красноцветковым сортом Золушка белорусской селекции. Инициация каллусообразования на корневых и семядольно-листных эксплантах белоцветковой *S. marianum* наступала раньше, чем на эксплантах красноцветковой, что позволяет предположить наличие особого гормонального статуса у сортообразца венгерской селекции. Определенную роль в ускоренной инициации каллусогенеза у белоцветковой расторопши сыграла, по-видимому, и высокая активность СОД, утилизирующей свободные радикалы, которые образуются в клетках, начиная с этапа вычленения экспланта. Каллусы расторопши пятнистой белоцветковой расы в течение 1–5-го пассажей обладали более рыхлой структурой и светло-кремовым цветом в отличие от плотных коричневых каллусов (особенно корневых), полученных от красноцветковой *S. marianum*. Цвет каллуса определяется уровнем накопления фенольных соединений: вероятно, он выше в каллусах от сорта белорусской селекции. Инициация каллусообразования расторопши пятнистой сопровождалась значительным увеличением (от 2 до 5 раз) содержания белка и резким падением активности антиоксидантных ферментов ПГТ (от 2 до 384 раз) и СОД (от 2 до полного отсутствия активности) в клетках первичного каллуса по сравнению с эксплантами. Тканеспецифичность исходных эксплантов (корня и семядольного листа) не определяла изменения в содержании белка и активности СОД в каллусах расторопши пятнистой в процессе дедифференцирования их клеток, но имел значение генотип растений. Поведение ПГТ при каллусогенезе (резкое снижение активности) было универсальным, не зависящим ни от тканеспецифичности исходных эксплантов, ни от генотипа расторопши пятнистой.

Литература

1. Verpoorte R. // Phytochem. Rev. 2002. Vol. 1. P. 13–25.
2. Rao R. S. // Biotechnol. Adv. 2002. Vol. 20. P. 101–153.
3. Karuppusamy S. // Journal of Medicinal Plants Research. 2009. Vol. 3, N 13. P. 1222–1239.
4. Faltin Z., Holland D., Velcheva V., Tsapovetsky M. // Plant cell physiol. 2010. Vol. 51, N 7. P. 1151–1162.
5. Кисличенко В. С., Поспелов С. В., Самородов В. Н. и др. // Расторопша пятнистая – от интродукции к использованию: монография. Полтава, 2008. С. 6–9.
6. Wellington K., Jarvis B. // Silymarin: A review of its clinical properties in the management of hepatic disorders, BIO-DRUGS. 2001. Vol. 15, № 7. P. 465–489.
7. Valenzuela R., Guerra R., Videla L. A. // Planta Med. 1986. N 6. P. 438–440.
8. Pradhan S. C. // Indian J Med Res. 2006. Vol. 124, № 5. P. 491–504.
9. Peterson G. L. // Analytical Biochemistry. 1979. Vol. 100. P. 201–220.
10. Сафонов В. И., Сафонова М. П. // Биохимические методы в физиологии растений. М., 1971. С. 113–119.
11. Ермаков А. И. // Методы биохимического исследования растений. Л., 1987. С. 41–45.

O. V. KOPACH, A. A. KUZOVKOVA, V. N. RESHETNIKOV

PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF RED- AND WHITE FLOWERS *SILYBUM MARIANUM* IN *IN VITRO* CULTURE INTRODUCTION AND CALLUSOGENESIS

Summary

Physiological and biochemical characteristics of red- and white flowers *Silybum marianum* in *in vitro* culture introduction and callusogenesis were detected. The differences in the protein content and antioxidant system (for peroxidase activity gvaokolovogo type and superoxide dismutase) in explants (root and seed leaves) the red- and white flowers and initiated from these calluses were illustrated.

РЕФЕРАТЫ

УДК 581.19:57.086.83

Копач О. В., Кузовкова А. А., Решетников В. Н. Физиолого-биохимические особенности красно- и белоцветковой рас *Silybum marianum* при введении в культуру *in vitro* и каллусогенезе // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2013. № 4. С. 5–10.

Исследовались физиолого-биохимические особенности введения в культуру *in vitro* и каллусогенеза *Silybum marianum* L. красно- и белоцветковой рас. Установлены различия в содержании белка и состоянии антиоксидантной системы (по активности пероксидаз гваяколового типа и супероксидисмутаза) в эксплантах (корень и семядольный лист) двух рас и инициированных из них каллусах.

Табл. 3. Ил. 2. Библиогр. – 11 назв.