

РОСТОВЫЕ И БИОСИНТЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ SYRINGA VULGARIS L. СОРТА «М. ШОЛОХОВ» СТЕБЛЕВОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В КУЛЬТУРЕ IN VITRO

ЛЮБАКОВСКАЯ Л.А. *, ЯКОВЛЕВА О.А. *, БРЕЛЬ Н.Г. **

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»,
Центральный ботанический сад НАН Беларуси**, Минск*

Резюме. Дана характеристика морфологических и физиологических параметров: цвет, консистенция, масса сырого и сухого вещества, индекс скорости роста, удельная скорость роста сырой и сухой биомассы каллуса, время удвоения биомассы, максимальное накопление сырой и сухой биомассы, экономический коэффициент, продуктивность по сырой и сухой биомассе каллусной культуры стеблевого происхождения *Syringa vulgaris* L. сорта «М. Шолохов» в течение ростового цикла. Изучена взаимосвязь динамики роста и синтеза суммы фенольных соединений в культуре in vitro на двух средах (контрольной и модифицированной), отличающихся содержанием ростовых веществ. Продолжительность ростового цикла составила 70 дней. Модифицированная среда, содержащая 6-бензиламинопури в концентрации 1 мг/л определена как лучшая для накопления биомассы и синтеза суммы фенольных соединений.

Ключевые слова: *Syringa vulgaris*, фенольные соединения, культура in vitro

Abstract. The characteristic of morphological and physiological parameters is given: color, a consistence, weight of crude and dry substance, an index of growth rate, specific growth rate of a crude and dry biomass callus, time of doubling of a biomass, the maximal accumulation of a crude and dry biomass, economic factor, efficiency on a crude and dry biomass callus cultures of stem origin *Syringa vulgaris* L. grades "M.Sholokhov" during growth cycle. The interrelation of dynamics of growth and synthesis of the sum of phenolic connections in culture in vitro on two environments (control and modified), distinguished by the maintenance growth substances is investigated. Duration growth a cycle has made 70 days. The modified environment containing 6-benzilaminopurin in concentration 1 mg / l is determined as the best for accumulation of a biomass and synthesis of the sum of phenolic connections.

Адрес для корреспонденции: Республика Беларусь, 210023, г.Витебск, пр. Фрунзе, 27, Витебский государственный медицинский университет, каф. фармакогнозии и ботаники. - Любаковская Л.А.

В настоящее время большое внимание уделяется фундаментальным исследованиям природных продуктов метаболизма растений, получаемых при помощи культуры клеток и использования их как альтернативного источника различных соединений для медицины, парфюмерной промышленности и других отраслей народного хозяйства. Эта возможность связана с тем, что культивируемые клетки, как правило, сохраняют способность к синтезу вторичных веществ, свойственных тому виду растения, из которых они получены.

Являясь популярным декоративным растением, сирень обыкновенная (*Syringa vulgaris* L., Oleaceae) издавна используется в народной медицине в качестве противовоспалительного, антисептического, жаропонижающего, обезболивающего средства и др. Установлено, что в сирени содержатся фенольные соединения: фенологликозиды, фенолокислоты, дубильные вещества, флавоноиды и др. [1].

Различия в биосинтетической способности растительных тканей свидетельствуют с одной стороны о разнообразной роли вторичных метаболитов в процессе жизнедеятельности клеток, а с другой зависят от видовой специфичности изучаемых культур. У каллусов растений разных видов, сортов и даже клонов связь исследуемых процессов с накоплением фенолов может быть прямо или обратно пропорциональной или даже отсутствовать совсем [2]. Следовательно, сложно получить клеточную культуру *in vitro*, которая бы имела как высокую скорость роста культуры, так и высокое содержание продуктов вторичного метаболизма.

Целью настоящего исследования является оптимизация условий выращивания клеточной культуры *in vitro* *Syringa vulgaris* (L.) сорта «Михаил Шолохов» стеблевого происхождения, которая бы обеспечивала как рост культуры, так и образование продуктов вторичного метаболизма.

Методы

Объектом исследования явилась стабильная каллусная культура стеблевого происхождения *Syringa vulgaris* (L.) сорта «Михаил Шолохов», поддерживаемая в культуре с 1991 г. в лаборатории Центрального ботанического сада НАН Беларуси.

Для проведения исследований каллус выращивали на двух средах. Первая среда, обозначена как контрольная (оптимальная для поддержания роста при длительном культивировании каллуса сирени), среда Мурасиге и Скуга [3] с половинным содержанием NH_4NO_3 , KH_2PO_4 , витаминов по Стаба, агара и ростовых гормонов: 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д) и 6-бензиламинопуридин (ВА), в концентрации 0,5 мг/л. Вторая среда – модифицированная, которая нами была отмечена как наиболее продуктивная для накопления фенольных соединений в культуре стеблевого происхождения. По составу была такая же, как и контрольная, но содержала только ВА в концентрации 1 мг/л. В среду для культивирования каллуса добавляли сахарозу в концентрации 30 г/л, рН среды 5,6-5,8 до автоклавирования.

Калусную культуру выращивали в культуральных помещениях при искусственном освещении люминесцентными лампами ЛБ-40 (освещенность 3000 лк) при 12-часовом световом и темновом периодах при температуре $26 \pm 1^\circ\text{C}$, влажности 70%. Продолжительность культивирования - 70 суток. Контрольными отрезками для анализа калусной культуры были: 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 дней культивирования.

Ростовую кривую анализировали при помощи графического и аналитического выражения. На всех контрольных отрезках времени культивирования определяли следующие ростовые параметры культуры:

- 1) массу сырого и сухого веса, индекс скорости роста, удельную скорость роста сырой и сухой биомассы;
- 2) время удвоения, максимальное накопление сырой и сухой биомассы;
- 3) экономический коэффициент, продуктивность по сырой и сухой биомассе.

Массу сырого веса определяли в начале и в конце роста культур весовым методом на аналитических весах марки OHAUS(Scout), отделяя клетки от питательной среды. Для определения сухой массы сырую биомассу сушили лиофильно на сушилке «Иней 3-2 №11192» при -40°C до постоянного веса. Сухую массу определяли весовым методом на аналитических весах.

Расчёт показателей проводили по формулам:

- увеличение сырого веса (г): $M = W_t - W_0$, где M – увеличение сырого веса, W_0 – исходный вес ткани, W_t – конечный вес ткани [4];
- прирост сырой биомассы относительно исходного веса (г): $\Pi = (W_t - W_0) / W_0$, где Π – прирост сырой биомассы относительно исходного веса, W_0 – исходный вес ткани, W_t – конечный вес ткани [5];
- прирост с учётом фактора времени (сут⁻¹): $\Pi_t = ((W_t - W_0) / W_0) * 1/t$, где Π_t – прирост с учётом фактора времени, W_0 – исходный вес ткани, W_t – конечный вес ткани, t – время [6];
- удельную скорость роста (сут⁻¹): $\mu = (\ln W_t - \ln W_0) / t$, где μ – удельная скорость роста, W_0 – биомасса в начале интегралов времени ($t = 0$), W_t – биомасса в конце интегралов времени, t – время;
- время удвоения биомассы (сут): $g = \ln 2 / \mu$, где g – время генерации (период удвоения) биомассы, μ – удельная скорость роста;
- индекс скорости роста по сырой биомассе: $I = W_t / W_0$, где I – индекс скорости роста по сырой биомассе, W_t – масса каллусов в конце цикла выращивания, W_0 – масса каллусов в начале цикла выращивания [7];
- максимальное накопление биомассы (г/л): $X = W_t * 1000 / V_{\text{среды}}$, где X – максимальное накопление биомассы, W_t – максимальная биомасса (сырая или сухая) в течение цикла культивирования, $V_{\text{среды}}$ – объём среды культивирования;
- экономический коэффициент (грамм биомассы на 1 грамм потребленной сахарозы): $\text{ЭК} = W_t / ((C * V_{\text{среды}}) / 1000)$, где ЭК – экономический коэффициент, W_t – максимальная биомасса (сырая или сухая) в течение цикла

культивировании, $V_{\text{среды}}$ - объем среды культивирования, C –концентрация сахарозы в среде;

- продуктивность по биомассе (г/л в сутки): $P = X/t$, где P - продуктивность по биомассе, X - максимальное накопление биомассы (сырой и сухой), t - время.

Содержание воды в ткани определяли по формуле: $X\% = ((W_{t \text{ сыр}} - W_{t \text{ сух}}) * 100\%) / W_{t \text{ сыр}}$, где $X\%$ - содержание воды в ткани, $W_{t \text{ сыр}}$ – сырая биомасса в конце интегралов времени, $W_{t \text{ сух}}$ – сухая биомасса в конце интегралов времени [8].

Фенольные соединения извлекали из лиофильно высушенного материала горячим 96% этанолом. Содержание суммы фенольных соединений определяли спектрофотометрически с реактивом Фолина –Чекольтеу (поглощение при 720 нм) [9]. Калибровочный график строили по галловой кислоте.

Результаты и обсуждение

Ростовые процессы в течение цикла выращивания каллусной ткани характеризуются динамикой ряда физиологических параметров, таких, как масса сырого и сухого вещества, индекс скорости роста, удельная скорость роста сырой и сухой биомассы каллуса, время удвоения биомассы, максимальное накопление сырой и сухой биомассы, экономический коэффициент, продуктивность по сырой и сухой биомассе (рисунок 1,2, таблицы 1 - 4).

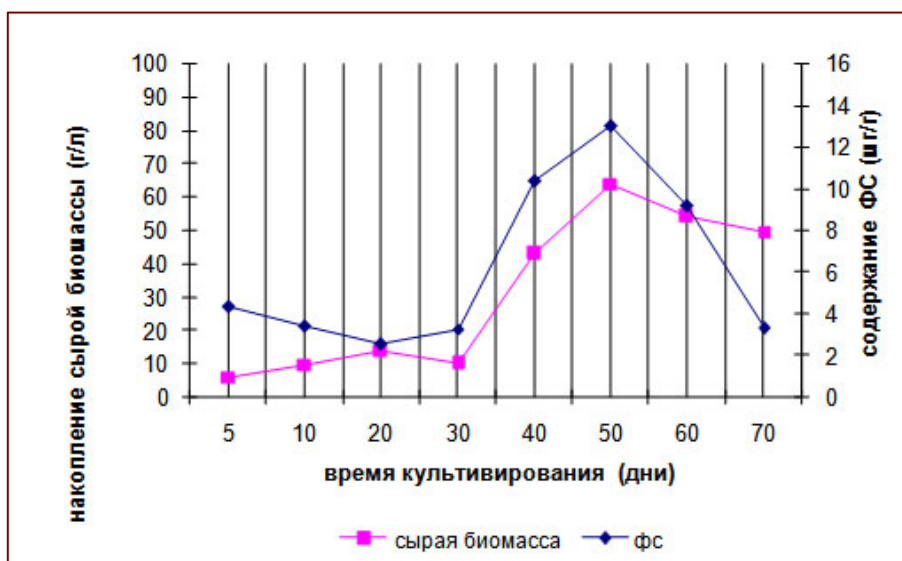


Рис. 1. Динамика накопления биомассы и суммы фенольных соединений в культуре *Syringa vulgaris* стеблевого происхождения сорта «Михаил Шолохов» на контрольной среде.

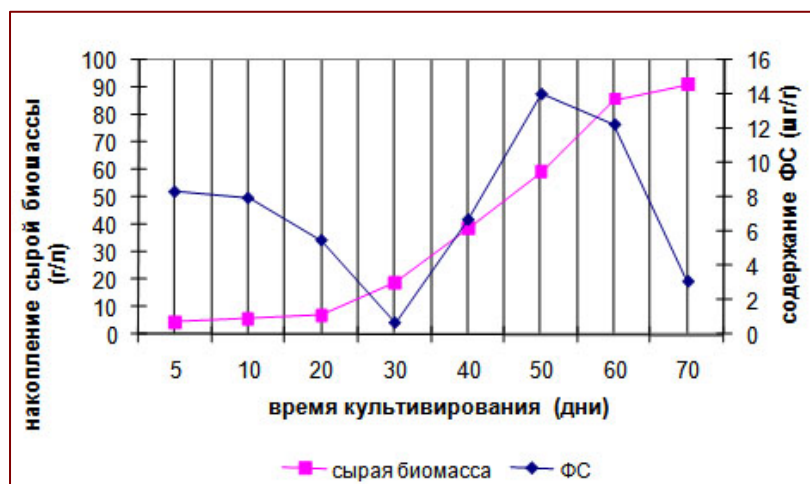


Рис. 2. Динамика накопления биомассы и суммы фенольных соединений в культуре *Syringa vulgaris* стеблевого происхождения сорта «Михаил Шолохов» на модифицированной среде.

Таблица 1

Аналитические параметры каллуса стеблевого происхождения *S.vulgaris* (L.) сорта «Михаил Шолохов» на контрольной и модифицированной средах: М -увеличение сырого веса; П -прирост сырой биомассы относительно исходного веса; П_t -прирост с учётом фактора времени

время	М (г)		П (г)		П _t (сут ⁻¹)	
	контр.	модиф.	контр.	модиф.	контр.	модиф.
5	0,03±0,001	0,017±0,004	0,352±0,051	0,293±0,172	0,07±0,01	0,059±0,034
10	0,100±0,020	0,043±0,019	1,237±0,330	0,587±0,288	0,124±0,03	0,059±0,029
20	0,187±0,003	0,073±0,039	2,089±0,325	1,007±0,445	0,104±0,002	0,050±0,022
30	0,158±0,110	0,313±0,026	4,167±0,380	4,995±0,637	0,139±0,01	0,167±0,021
40	0,800±0,020	0,685±0,118	12,680±4,40	7,837±1,282	0,317±0,11	0,196±0,021
50	1,190±0,400	1,123±0,212	12,550±1,07	17,675±2,618	0,25±0,020	0,354±0,052
60	1,050±0,050	1,623±0,089	35,11±1,700	17,897±1,342	0,585±0,03	0,298±0,022
70	0,960±0,230	1,744±0,064	35,49±1,800	22,796±0,767	0,51±0,025	0,327±0,011

Таблица 2

Аналитические параметры каллуса стеблевого происхождения *S.vulgaris* (L.) сорта «Михаил Шолохов» на контрольной и модифицированной средах: μ-удельная скорость роста; g -время удвоения биомассы; I -индекс скорости роста

время	μ (сут ⁻¹)		g (сут)		I	
	контр.	модиф.	контр.	модиф.	контр.	модиф.
5	0,060±0,007	0,050±0,026	11,660±1,500	19,660±15,520	1,352±0,050	1,293±0,172
10	0,080±0,010	0,045±0,019	8,960±1,700	22,5130±21,305	2,237±0,330	1,587±0,288
20	0,056±0,050	0,034±0,011	12,440±1,270	22,950±9,600	3,090±0,320	2,007±0,445
30	0,050±0,002	0,060±0,004	12,698±0,570	11,676±0,718	5,170±0,380	5,995±0,637
40	0,064±0,001	0,054±0,004	11,040±1,800	12,855±1,121	13,680±4	8,837±1,282
50	0,050±0,002	0,058±0,003	13,320±0,400	11,910±0,719	13,550±1,070	18,675±2,618
60	0,060±0,001	0,049±0,001	11,600±0,150	14,167±0,381	36,100±1,720	18,897±1,342
70	0,050±0,001	0,045±0,001	13,490±0,180	15,309±0,154	36,500±1,800	23,796±0,767

Таблица 3

Аналитические параметры каллуса стеблевого происхождения *S.vulgaris* (L.) сорта «Михаил Шолохов» на контрольной и модифицированной средах: X - накопление сырой биомассы; ЭК -экономический коэффициент по сырой биомассе; Р -продуктивность по сырой биомассе

время	X (г/л)		ЭК (г сырой биомассы на 1 г потребленной сахарозы)		Р (г/л в сутки)	
	контр.	модиф.	контр.	модиф.	контр.	модиф.
5	5,830±0,660	4,500±1,643	0,190±0,020	0,150±0,055	1,167±0,130	0,900±0,330
10	9,670±2,300	6,000±0,630	0,320±0,080	0,200±0,0211	0,967±0,230	0,600±0,060
20	13,830±2,030	7,166±2,370	0,460±0,070	0,239±0,079	0,690±0,100	0,358±0,118
30	9,920±7,040	18,834±1,461	0,330±0,230	0,628±0,049	0,330±0,230	0,628±0,049
40	43,000±10,000	38,611±6,040	1,430±0,340	1,287±0,201	1,075±0,300	0,965±0,151
50	64,000±20,000	59,330±10,780	2,140±0,700	1,978±0,359	1,280±0,400	1,187±0,216
60	54,000±2,600	85,708±4,389	1,800±0,090	2,857±0,146	0,900±0,040	1,429±0,073
70	49,58±11,69	91,055±3,466	1,650±0,390	3,035±0,116	0,710±0,170	1,301±0,050

Таблица 4

Аналитические параметры каллуса стеблевого происхождения *S.vulgaris* (L.) сорта «Михаил Шолохов» на контрольной и модифицированной средах: Xсух -максимальное накопление сухой биомассы; ЭКсух -экономический коэффициент по сухой биомассе; Рсух -продуктивность по сухой биомассе

время	Xсух (г/л)		ЭКсух (г сухой биомассы на 1 г потребленной сахарозы)		Рсух (г/л в сутки)	
	контр.	модиф.	контр.	модиф.	контр.	модиф.
5	0,245±0,050	0,309±0,094	0,008±0,002	0,010±0,003	0,049±0,010	0,062±0,019
10	0,440±0,110	0,450±0,022	0,150±0,004	0,015±0,001	0,040±0,010	0,045±0,002
20	0,660±0,100	0,549±0,126	0,020±0,004	0,018±0,004	0,033±0,005	0,028±0,006
30	0,670±0,350	1,324±0,064	0,020±0,010	0,044±0,002	0,022±0,010	0,044±0,002
40	1,950±0,120	2,314±0,541	0,065±0,004	0,077±0,018	0,049±0,003	0,058±0,014
50	3,390±0,900	3,595±0,727	0,110±0,030	0,120±0,024	0,068±0,018	0,072±0,015
60	3,000±0,001	5,462±0,253	0,100±0,001	0,182±0,008	0,05±0,001	0,091±0,004
70	3,110±0,710	7,257±0,457	0,104±0,020	0,242±0,015	0,040±0,010	0,104±0,007

Данные исследования показали, что каллусная ткань стеблевого происхождения *S.vulgaris* (L.) сорта «Михаил Шолохов», выращиваемая на контрольной и модифицированной среде отличалась по таким признакам как: окраска, консистенция, активность роста.

Культура ткани сирени, культивируемая на контрольной питательной среде имела зелёную окраску, по консистенции - среднеплотная, а на модифицированной среде – зелёная, плотная. По активности роста каллусная ткань как на контрольной, так и на модифицированной среде до 40 дня характеризовалась как активная, а с 30 по 70 - как высокоактивная. Имеющиеся в литературе данные говорят о широком морфологическом разнообразии у каллусов различных растений. Так для герани и лаванды характерны каллусы рыхлой консистенции, оводнённые, преимущественно светло-бежевого цвета

или почти бесцветные; каллусы кориандра имели светло-коричневый или жёлтый цвет и довольно плотную консистенцию. У эфиромасличной розы каллусные ткани даже одного штамма отличались высокой морфологической гетерогенностью - чаще встречались плотные жёлтые или светло-бежевые каллусы. При этом иногда в них отмечались зелёные или красные зоны. Каллусная ткань очень компактная, твёрдая, слабо оводнённая [10].

Суммарным отражением физиолого-биохимических состояний каллусной культуры сирени явился сигмоидный характер роста биомассы (рисунок 1,2). Длительность фаз ростовой кривой для каллуса сирени стеблевого происхождения, выращенного на контрольной и модифицированной средах имели некоторые особенности.

В культуре ткани стеблевого происхождения за стандартный цикл выращивания на контрольной питательной среде происходило 36-кратное, а на модифицированной - 24-кратное увеличение массы сырого вещества (таблица 2).

С 5 по 30 день культивирования на контрольной среде масса ткани практически не изменялась, что соответствует латентной фазе ростового цикла. Для каллуса, культивируемого на модифицированной среде, лаг-фаза была короче: с 5 по 20 день культивирования (рисунок 1,2).

Начиная с 30 дня (на контрольной среде) и 20 дня (на модифицированной среде) в ростовом цикле можно выделить экспоненциальную (логарифмическую) фазу роста, в течение которой происходит быстрое увеличение биомассы растительных клеток. Так с 30 по 50 день - на контрольной среде сырая биомасса увеличилась в 5,1 раз, а на модифицированной среде (с 20 по 60 день) - в 10 раз. В этот период определяется минимальное время генерации клеточной популяции для культуры на контрольной среде - 11,04 суток (40 день), на модифицированной - 11,68 суток (30 день) (таблица 2). Окончание экспоненциальной фазы характеризовалась снижением удельной скорости роста до $0,05 \text{ сут}^{-1}$ для обеих культур (таблица 2).

Стационарная фаза роста для каллуса *S.vulgaris* (L.) сорта «Михаил Шолохов» стеблевого происхождения, выращенного на контрольной среде, длилась с 50 по 70 день культивирования, на модифицированной среде с 60 по 70 день. Этот период характеризовался снижением удельной скорости роста, увеличением времени удвоения биомассы. В этот промежуток времени на контрольной среде произошло уменьшение биомассы на 23% (с 50 по 70 день), на модифицированной среде было незначительное увеличение биомассы на 7% (с 60 по 70 день) (таблица 3).

Максимальное накопление сырой биомассы для каллуса стеблевого происхождения, выращенного на контрольной среде, наблюдалось на 50 день и составило 64 г/л, что соответствует экономическому коэффициенту 2,14 г сырой биомассы на 1 г потребленной сахарозы (таблица 3). Индекс и удельная скорость роста по сырой биомассе составили 13,55 и $0,05 \text{ сут}^{-1}$ соответственно (таблица 2). Максимальная продуктивность на контрольной среде по сырой биомассе и сухой биомассе наблюдается также на 50 день, и составила 1,28 и 0,068 г/л в сутки соответственно (таблица 3,4).

Для каллуса стебля, выращенного на модифицированной питательной среде максимальное накопление сырой биомассы наблюдалось на 70 день культивирования, и составило 91,06 г/л, что соответствует экономическому коэффициенту 3,04 г сырой биомассы на 1 г потребленной сахарозы (таблица 3). Индекс и удельная скорость роста по сырой биомассе составили 23,8 и 0,045 сут⁻¹ соответственно (таблица 2). К этому периоду ростового цикла культура клеток достигает и максимума сухого веса. Закономерность накопления сухой биомассы такая же, как и для сырой: на контрольной среде на 50 день культивирования (3,39 г/л), экономический коэффициент 0,11 г сухой биомассы на 1 г потребленной сахарозы; на модифицированной среде на 70 день культивирования (7,26 г/л), экономический коэффициент 0,24 г сухой биомассы на 1 г потребленной сахарозы (таблица 4). Максимальная продуктивность на модифицированной среде: на 60 день по сырой биомассе (1,43 г/л в сутки), по сухой биомассе на 70 день (0,1 г/л в сутки) (таблица 3, 4).

Количественное определение суммы фенольных соединений проводили на всех контрольных отрезках для культур, культивируемых на 2-х средах. Каллусная культура отличается по количественному содержанию суммы фенольных соединений при культивировании на контрольной и модифицированной средах (рисунок 1, 2).

Нами было обнаружено, что содержание ФС различно в начале и в конце лаг-фазы. Так, на контрольной среде на 5 день количество ФС было на 53% больше, чем на 30 (конец лаг - фазы), а на модифицированной среде на 34% больше на 5 день, чем на 20 день (рисунок 1, 2).

Во время экспоненциальной фазы сумма ФС увеличилась на контрольной среде в 6,4 раза (с 30 по 50 день). На модифицированной питательной среде происходило уменьшение суммы ФС в 8,3 раза (с 20 по 30 день), с 30 по 50 день сумма фенольных соединений увеличилась в 25 раз. В это время (на 50 день) наблюдается максимальное содержание суммы фенольных соединений в культуре сирени на модифицированной среде. С 50 по 60 день снова произошло уменьшение ФС в 1,1 раз (рисунок 1,2).

За период стационарной фазы, для каллуса культивируемого на контрольной питательной среде содержание ФС снизилось на 75% (с 50 по 70 день), для каллуса, культивированного на модифицированной питательной среде снизилось на 76% (период с 60 по 70 день). Максимальное накопление суммы ФС на контрольной питательной среде наблюдается на 50 день культивирования в начале стационарной фазы, но содержание суммы фенольных соединений на 21,5% меньше, чем на модифицированной среде. (рисунок 1,2).

Содержание воды в ткани (оводнённость) для культуры ткани так же имела свои отличия. Так, за время лаг- фазы (с 5 по 30 день для каллуса, культивируемого на контрольной питательной среде, с 5 по 20 день- на модифицированной) содержание воды в ткани уменьшилось на 3% и на 1% соответственно. За время ранней экспоненциальной фазы (для каллуса, культивируемого на контрольной среде с 30 по 40 день, на модифицированной - с 20 по 30 день) происходило увеличение оводнения каллуса на 2,8% и на 1%

соответственно. За период фазы латентного роста (у культуры, культивируемой на контрольной среде с 40 по 50 день, на модифицированной (с 30 по 60 день) происходило незначительное уменьшение оводнения ткани, культивируемой на контрольной среде на 0,7%. А для культуры, культивируемой на модифицированной среде наблюдали увеличение оводнения на 0,67%. Во время стационарной фазы происходило уменьшение содержания воды в каллусе, культивируемом на контрольной среде на 0,8% (с 50 по 70 день), а для каллуса, культивируемого на модифицированной среде на 1,6% (с 60 по 70 день). В дни максимального содержания ФС оводнение ткани составило 94,6% для каллуса, культивируемого на контрольной питательной среде и 94% - для каллуса, культивируемого на модифицированной питательной среде (рисунок 3).

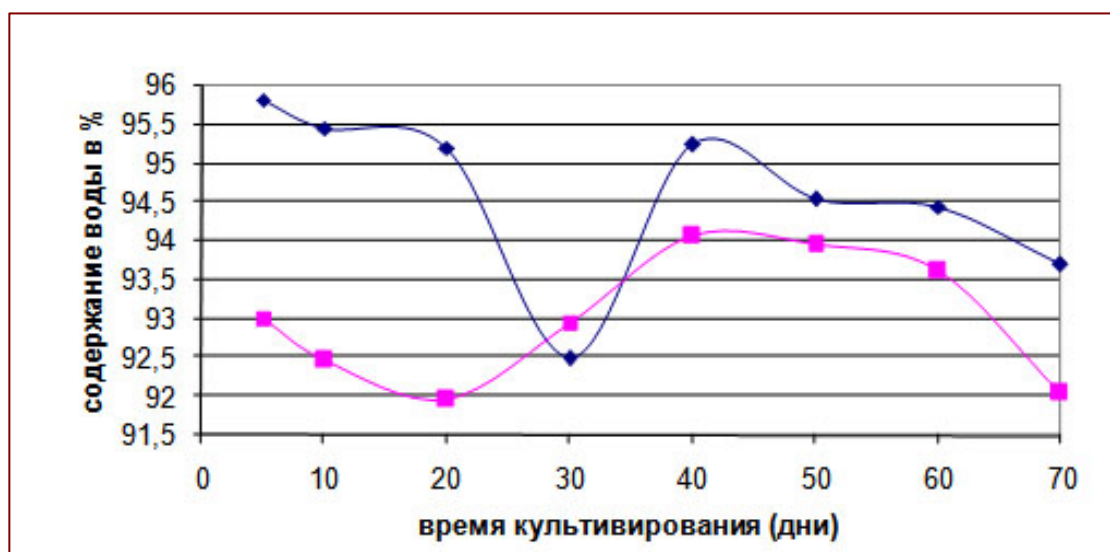


Рис. 3. Изменение содержания воды в каллусной культуре стеблевого происхождения, выращенного на контрольной и модифицированной среде.

По полученным результатам и имеющимся в литературе данным можно обозначить, что длительность ростового цикла и лаг-фаза для культуры клеток сирени была довольно продолжительной (20 суток для культуры на контрольной среде и 30 суток для культуры на модифицированной среде). Такая же длительность лаг-фазы была характерна и для культуры серпухи венценосной (около 20 суток) [23]. Для других же каллусных культур она была более короткой: для *Rubia tinctorum* L. - 7 суток, лаванды - 2-3 суток, герани - 4 сутки, кориандра - 6 сутки [10,11].

Экспоненциальная фаза роста на контрольной среде начиналась с 30 дня, на модифицированной среде и с 20 дня. Для других культур, например для каллусных клеток розы эта фаза наступала раньше: на 6-8 сутки [10].

Стационарная фаза роста для каллуса *S.vulgaris* (L.) на контрольной питательной среде длилась с 50 по 70 день культивирования, на модифицированной среде с 60 по 70 день. Достаточно позднее наступление стационарной фазы описывалось для каллусных клеток розы (40-45-е сутки), для популяции клеток серпухи венценосной (70-е сутки цикла выращивания)

[10,12]. Хотя чаще всего основное накопление массы происходит до 30-40-х суток субкультурального цикла. Так у культуры лаванды стационарная фаза наступала на 26 сутки, герани на 40 сутки, кориандра на 35 сутки [10].

В начале цикла выращивания (на 5 день) на контрольной и на модифицированной среде были обнаружены фенольные соединения. Это можно объяснить тем, что в ответ на механическое повреждение растительных тканей в них начинается интенсивное образование фенольных соединений, сопровождающееся окислительной конденсацией: продукты конденсации образуют защитный слой, что выражается в формировании полимерных фенольных соединений так называемого раневого лигнина. По сути, в этом также проявляется роль фенолов как фактора иммунитета растений [13].

На контрольной среде на 50 день, в начале стационарной фазы было обнаружено максимальное содержание суммы ФС. Таким образом, каллусные культуры стеблевого происхождения, культивируемые на контрольной среде, обладают наибольшей способностью к синтезу фенольных соединений в стационарную фазу роста, что согласуется с данными, полученными Dalton и соавт. [14]. В фазе замедления роста клеточной популяции на 50 день наблюдалось максимальное содержание суммы фенольных соединений в культуре сирени на модифицированной среде. В фазе замедления роста максимальное накопление веществ вторичного метаболизма характерно и для культур древесных растений, например, культур клеток *Populus vulgaris* L. и *Vupleurum falculatum* [15,16]. Это можно объяснить тем, что во время стационарной фазы размер клеток продолжает увеличиваться (за счёт их оводнённости), а их деление прекращается, появляются чрезвычайно крупные вакуолизированные клетки [15]. Механизмы и условия, блокирующие клеточную пролиферацию и активный рост, являются одновременно механизмами активации, обеспечивающими синтез веществ вторичного метаболизма [17].

Можно проследить связь между кривой, описывающей оводнение и кривой, описывающей содержание суммы фенольных соединений. Связь имеет некоторую прямую зависимость. Это, вероятно, можно объяснить тем, что широко распространённые в растениях флавоноиды, подобно другим растительным терпеноидам, образуются в хлоропластах, но местом их накопления служат вакуоли [18].

Цикл культивирования для каллуса *S.vulgaris* (L.) сорта «Михаил Шолохов» стеблевого происхождения составил 70 дней. Такой же длительный довольно длительный цикл характерен и для каллусной культуры *Rubia tinctorum* L. продолжительность пассажа, для которой составляет 70-75 суток [11].

Заключение

Таким образом, анализ ростовых и биосинтетических характеристик каллуса *S.vulgaris* (L.) сорта «М. Шолохов» стеблевого происхождения, имеет достаточно высокие ростовые и биосинтетические характеристики. Каллус, культивируемый на контрольной и модифицированной среде, как и у большинства каллусных культур, имел сигмовидный характер роста биомассы.

Модифицированная среда явилась лучшей как для максимального накопления биомассы, так и для синтеза суммы фенольных соединений.

Литература

1. Куркин, В.А. Фармакогнозия: учебник для студентов фармацевтических вузов (факультетов) / В.А. Куркин / - Самара: ООО «Офорт», ГОУВПО «СамГМУП», 2004. - С.652.
2. Корецкая, Т. Ф. Культура ткани чайного растения (*Camellia sinensis*) как модель для изучения условий образования фенольных соединений / Т. Ф. Корецкая, М. Н. Запрометов // Физиол. Растений. – 1975. - № 22.- С. 282.
3. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog, // *Physiol. Plant.* - 1962. -V.15. № 3. -P.473-497.
4. Калинин, Ф.Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / В.В. Сарнацкая, В.Е. Полищук. – Киев: «Навукова думка», 1980. - с.143-144.
5. Филатова, Л.Г. Особенности регуляции каллусогенеза и биосинтез таксола *in vitro* у тиса ягодного / Л.Г. Филатова, Л.В. Малышева, В.П. Грахов, Я.Б. Блюм // Биотехнология. – 1996. - №8. - С. 38-44.
6. Nitsch, J.P. Auxin- dependent growth of excised *Helianthus tuberosus* tissues / J.P. Nitsch, S. Nitch // *Amer. J. Bot.* – 1956. -V. 43, № 10. - P. 839-851.
7. Болвелл, Г.П. Биотехнология растений: Культура клеток / Г.П. Болвелл [и др.]; пер. с англ. Негрука, В.И.; с предисл. Бутенко, Р.Г. - М.: Агропромиздат, 1989. - С.18-19.
8. Кузовкина, И.Н. Характеристика штамма каллусной ткани руты душистой (*Ruta Graveolens*) продуцирующего рутакидон / И.Н. Кузовкина, Т.П. Чернышева, И.Е. Альтерман // Физиология растений. -1979. -Том 26, вып.3. - С.492-499.
9. Wrolstad, R.E., Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent / R.E. Wrolstad, V. L. Wiley, R. Orthofer, R. M. Lamuela-Raventos // *Methods in Enzymology.* – 1999. - V. 299. – P. 152-178.
10. Егорова, Н.А. Цитофизиологическая характеристика каллюсных культур некоторых эфиромасличных растений/ Н.А. Егорова // Физиология и биохимия культ. растений. - 2001.- Т.33, №2. - С.159-164.
11. Shcherbakova, E.N. Physiological characteristic of anthraquinone producing callus culture of *Rubia tinctorum* L. / E.N. Shcherbakova, M.K. Mkrtoumyan, Y.G. Popov // II Intern. Symp. on plant biotechnol: Abstr. – Kyiv, 1998. – P.112.
12. Карначук, Р.А. Клеточная культура серпухи венценосной как перспективный продуцент фитоэкдистероидов / Р.А. Карначук [и др.] // Биология культивируемых клеток и биотехнология растений. – М.: Наука, 1991. – С.39-41.

13. Запрометов, М.Н. Специализированные функции фенольных соединений в растениях / М.Н. Запрометов // Физиология растений. - 1993. -Т. 40, №6. - С. 921–931.

14. Dalton, C.C. Product formation and cell specialization: a case study of photosynthetic development in plant cell cultures / C.C. Dalton, E. Peel // Progr. Ind. Microbiol. - 1983. - V.17. - P. 109.

15. Harborne, J.B. Plant Phenolics // Secondary Plant Products. Encycl. of Plant Physiol. New Series. V. 8./ J.B. Harborne, E.A. Eds Bell, B.V. Charlwood Berlin etc.: Springer, 1980. - P. 329-347.

16. Запрометов, М.Н. О функциональной роли фенольных соединений в растениях / М.Н. Запрометов // Физиология растений. - 1992. - Т. 39, Вып. 6. - С. 1197-1207.

17. Культура клеток растений и биотехнология; ответственный редактор член- корреспондент АН СССР Р. Г. Бутенко. – Москва: «Наука», 1986. - С. 7-16.

18. Sanders, J. The Occurrence and Photoregulation of Flavonoids in Barley Plastids / J. Sanders, J. Mc Clure // Phytochemistry. - 1976. - V.15, №5. - P. 805-807.