

## **ЗАКОНОМЕРНОСТИ ДИНАМИКИ РОСТА КАЛЛУСА ЛИСТОВОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ СИРЕНИ, КУЛЬТИВИРУЕМОГО НА МОРФОГЕННЫХ СРЕДАХ**

ЛЮБАКОВСКАЯ Л.А.\*, КОРОБОВ Г.Д.\*, РЕШЕТНИКОВ В.Н.\*\*

*УО «Витебский государственный медицинский университет»\*,  
Центральный ботанический сад НАН Беларуси \*\**

**Резюме.** Оценка ростовых параметров каллуса листового происхождения сирени, сорта «М.Шолохов», при культивировании клеток на морфогенных средах в присутствии экзогенных фенольных соединений, проводилась с помощью подбора адекватных регрессионных моделей. На основании анализа графического представления моделей установлено, что регрессионные модели для всех сред оказались идентичными.

Достоверность различий ростовых параметров оценивали на 40 день культивирования, на средах различного состава. Максимальное накопление сырой биомассы каллуса, выращенного на среде 2, было на 80% выше, чем на средах 3 и 4 и на 64% выше, чем на среде 1. На основании пошагового регрессионного анализа было установлено, что среды 3 и 4 являются идентичными и описываются одним уравнением модели. Следовательно, средой, обеспечивающей высокую пролиферативную активность каллуса, является среда 2, содержащая рутин.

**Ключевые слова:** каллус листовой, морфогенные среды, рутин.

**Abstract.** The estimation of growth parameters of leaf origin callus of «M.Sholokhov» kind lilac at cells cultivation on morphogene media in the presence of exogenous phenol compounds was made with the help of adequate regression models selection. On the basis of the analysis of models graphic presentation it has been established that regressive models for all media turned out to be identical. The reliability of differences in growth parameters was estimated on the 40-th day of cultivation on the media of different composition. Maximum accumulation of raw callus biomass, grown on the medium 2 was 80% higher, than that on the media 3 and

4, and 64% higher than that on the medium 1. On the basis of step-by-step regressive analysis it has been determined that media 3 and 4 are identical and are described by one model equation. Thus, the medium, that provides high proliferative callus activity is medium 2, containing rutin.

**Адрес для корреспонденции:** Республика Беларусь, 210023, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27, Витебский государственный медицинский университет, кафедра фармакогнозии, тел. 37-09-29, Любаковская Л.А.

Рациональное использование растительных ресурсов и сохранения их видового разнообразия является актуальной проблемой, которую приходится решать в интересах устойчивого развития индустриального общества. Большое значение для ресурсоведения имеет разработка методов микрклонального размножения растений с ценными хозяйственными признаками [1], а также биотехнологические подходы по использованию клеточных культур растений как альтернативных источников растительного сырья.

Культуры клеток являются экспериментально созданной биологической системой, в большинстве случаев гетерогенной (генетически, эпигенетически и физиологически) популяцией клеток, фенотип и генотип которой соответствуют условиям выращивания. Однако особенности функционирования данной системы пока мало изучены.

Особенностью растений является наличие веществ вторичного метаболизма, определяющих фармакологические свойства этих организмов и выполняющих самые разнообразные функции. Среди вторичных метаболитов значительное место занимают фенольные соединения – низкомолекулярные соединения с высокой биологической активностью [2].

Одним из фактов, влияющих на процессы роста клеточных культур растений, может быть присутствие фенольных соединений. Однако в большинстве случаев уровень их накопления в условиях *in vitro* ниже, чем в исходных тканях, что может являться следствием генетических и

биохимических изменений клеток культуры ткани [3-5]. Известно также, что любое механическое повреждение способствует активации синтеза в растениях разнообразных соединений фенольной природы [6]. Следовательно, не исключено влияние вторичных метаболитов на процессы роста и морфогенеза в культурах *in vitro*. Широким спектром исследования характеризуются работы по изучению влияния различных фитогормонов на ростовые характеристики и процессы морфогенеза в культуре *in vitro*. Однако влияние вторичных метаболитов на эти процессы практически не изучено. Поскольку процессы морфогенеза тесно связаны с процессами пролиферации, роста и дифференциации в очагах органогенеза [7-9], следовательно, на молекулярном уровне морфогенез, по-видимому, сопряжен с активностью пролиферации [10, 8, 11]. Поэтому установление связи между процессами роста и морфогенеза в условиях *in vitro* и влияние на эти процессы фенольных соединений является актуальной задачей.

Цель данного исследования – изучение влияния экзогенных фенольных соединений и их предшественников на процессы роста каллуса сирени листового происхождения при культивировании на морфогенных средах

Задачи исследований – анализ ростовых параметров каллуса сирени листового происхождения, культивируемого на морфогенных средах.

### **Методы**

Объект исследования – стабильная каллусная культура листового происхождения, сирени (*Syringa vulgaris* (L.)), сорта «М.Шолохов», поддерживаемая в культуре Центрального ботанического сада НАН Беларуси, г. Минск с 2001 г. на модифицированной среде Мурасиге и Скуга (МС) (половинное содержанием  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), в присутствии ростовых гормонов 2, 4- дихлорфеноксиуксусной кислоты (2, 4-Д) и 6- бензнаминопурина (БАП) [12]. При изучении ростовых параметров каллусных линий способных к морфогенезу использовали среды следующего состава:

Среда 1 – модифицированная МС среда, содержащая (мг /л): аскорбиновую кислоту – 50, гидролизат казеина – 500,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 185,

глутамин – 500 , аланин – 30, аргинин – 80, аспарагин – 250, сахароза – 30, 0,6% агар, 13,5  $\mu$ М 2.4-Д и 4,4  $\mu$ М БАП, рН 5,7 до автоклавирования. Среда 2 – среда того же состава, что и среда 1 с добавлением 6,1 мг/л рутина. Среда 3 – среда того же состава, что и среда 1 с добавлением 1,65 мг/л фенилаланина. Среда 4 – среда того же состава, что и среда 1 с добавлением 6,1 мг/л рутина и 1,65 мг/л фенилаланина. Для каждого типа экспланта было взято по 10 параллелей.

Продолжительность культивирования 60 суток. В качестве анализируемых промежутков взяты 10, 15, 20, 30, 40 и 60 дни, соответствующие лаг-, экспоненциальной и стационарной фазам ростового цикла. На анализируемых участках определяли следующие ростовые параметры: масса каллуса в конце цикла выращивания ( $W_t$ ), прирост сырой биомассы с учетом времени культивирования ( $\Pi_t$ ), увеличение сырой биомассы каллуса ( $M$ ), индекс скорости роста ( $I$ ), удельную скорость роста ( $\mu$ ), время удвоения биомассы ( $G$ ), максимальное накопление сырой биомассы ( $X$ ), экономический коэффициент ( $\text{ЭК}$ ) и продуктивность по сырой биомассе ( $P$ ) [12].

В качестве аналитического инструмента был использован лицензионный пакет прикладных программ Statistica 6,0 (RUS) фирмы STATSOFT-RUSSIA [13] с использованием следующих модулей: основного анализа вариационных рядов; регрессионного анализа динамических рядов; разведочного анализа путем 3-D моделирования; дискриминантного анализа с предварительной редукцией данных на основе корреляционной матрицы [14].

### **Результаты и обсуждения**

Исходя из того, что процессы морфогенеза тесно связаны с активностью пролиферации в культуре *in vitro* [14, 12, 15], нами наряду с цитологическими изменениями, в анализируемые промежутки времени, были изучены ростовые характеристики каллуса листового происхождения, сорта "М.Шолохов", культивируемого на морфогенных средах, а также влияние экзогенных

фенольных соединений и их предшественников на ростовые характеристики культивируемой каллусной ткани.

Оценка особенностей динамики роста каллуса сирени, проводилась с помощью подбора адекватных регрессионных моделей. В качестве инструмента моделирования было применено средство статистики – графика с ошибками, входящее в качестве модуля в ППП “STATISTICA” 6.0 RUS.

Из всех анализируемых показателей роста нами были выбран показатель максимального накопления сырой биомассы (X), значение которого является доказательством высокой пролиферативной активности листового каллуса сирени, культивируемого на различных морфогенных средах.

Следовательно, значение максимального накопления сырой биомассы (X) являлось зависимой переменной. Независимой переменной служило время в сутках. Адекватность модели оценивалась с помощью F-критерия Фишера. Таким образом, было установлено, что наиболее адекватной моделью является полином 4-й степени (рисунок 1).

Адекватность описания регрессионных моделей составила:

среда: 1 X:  $F(11,48) = 18,747144$ ,  $p = 0,0000$ ;

среда: 2 X:  $F(11,48) = 78,3964206$ ,  $p = 00,0000$ ;

среда: 3 X:  $F(11,48) = 21,4078474$ ,  $p = 0,0000$ ;

среда: 4 X:  $F(11,47) = 10,2708232$ ,  $p = 0,000000003$ ,

что соответствует высокой степени статистической достоверности.

На основании анализа графического представления моделей было установлено, что регрессионные модели для всех сред оказались идентичными.

Для всех сред было характерно наличие лаг-фазы до 30-х суток культивирования. Экспоненциальная фаза роста отмечалась с 25-30 суток до 35-40. Максимальное накопление биомассы наблюдали на 40 день культивирования. По-видимому, максимальное накопление сырой биомассы происходило за счет пролиферации, а не за счет оводненности клеток в



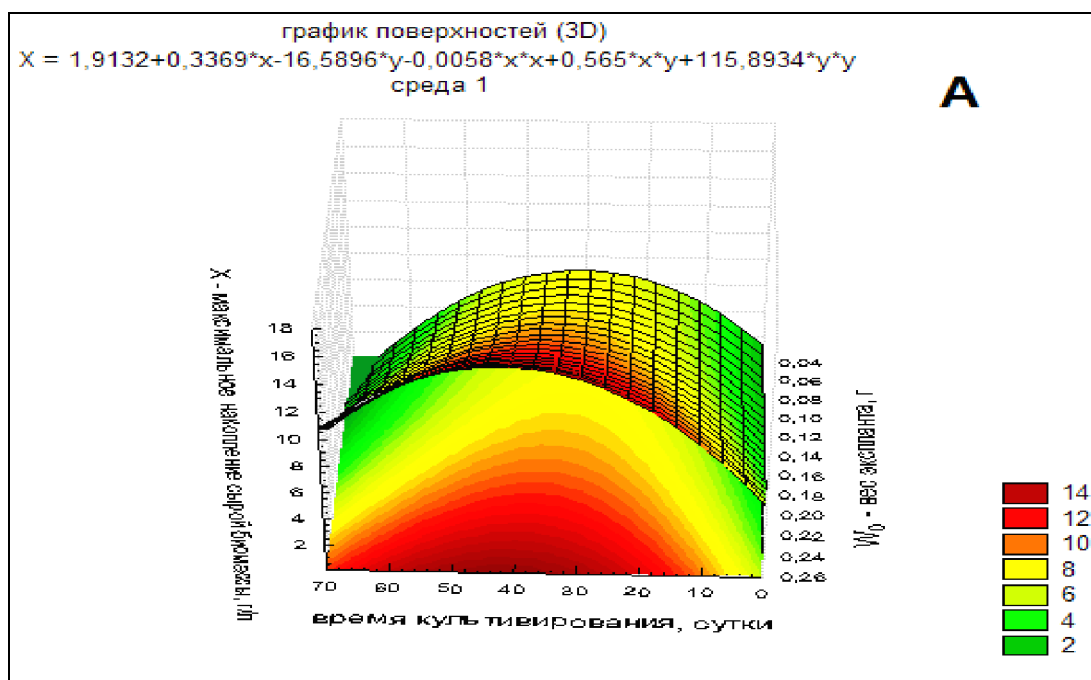


Рис. 2А. Трехмерное моделирование зависимости максимального накопления сырой биомассы (X) каллуса от веса исходного экспланта и времени культивирования (Среда № 1).

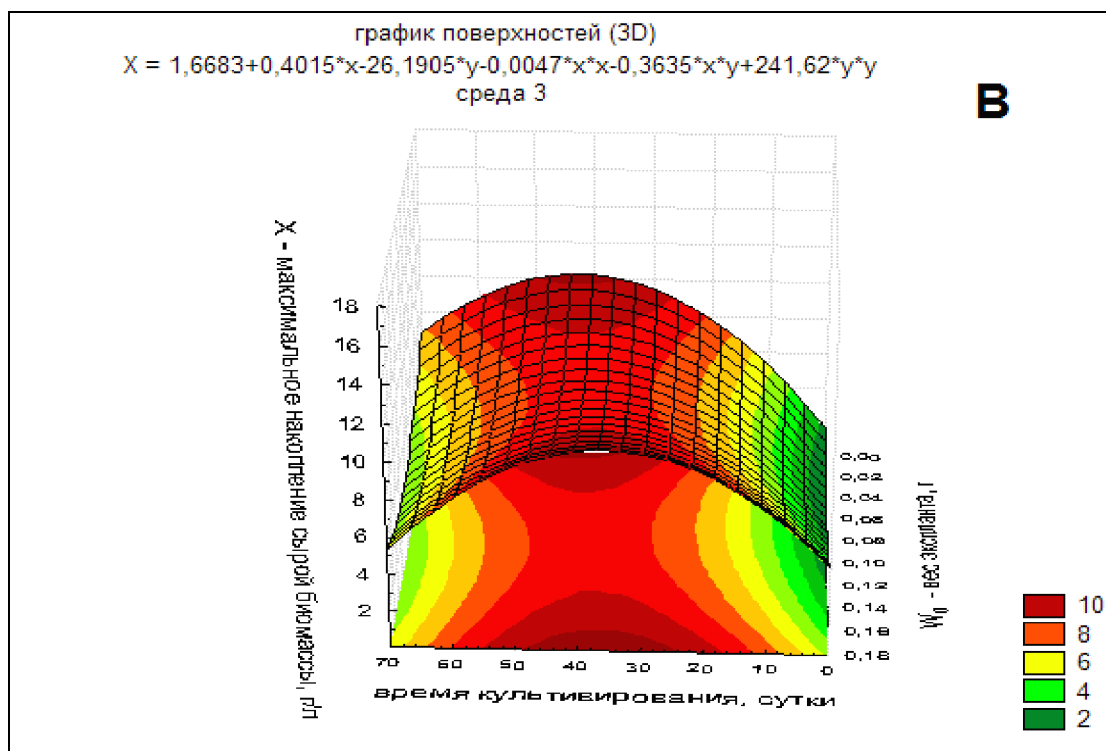


Рис. 2Б. Трехмерное моделирование зависимости максимального накопления сырой биомассы (X) каллуса от веса исходного экспланта и времени культивирования (Среда №2)

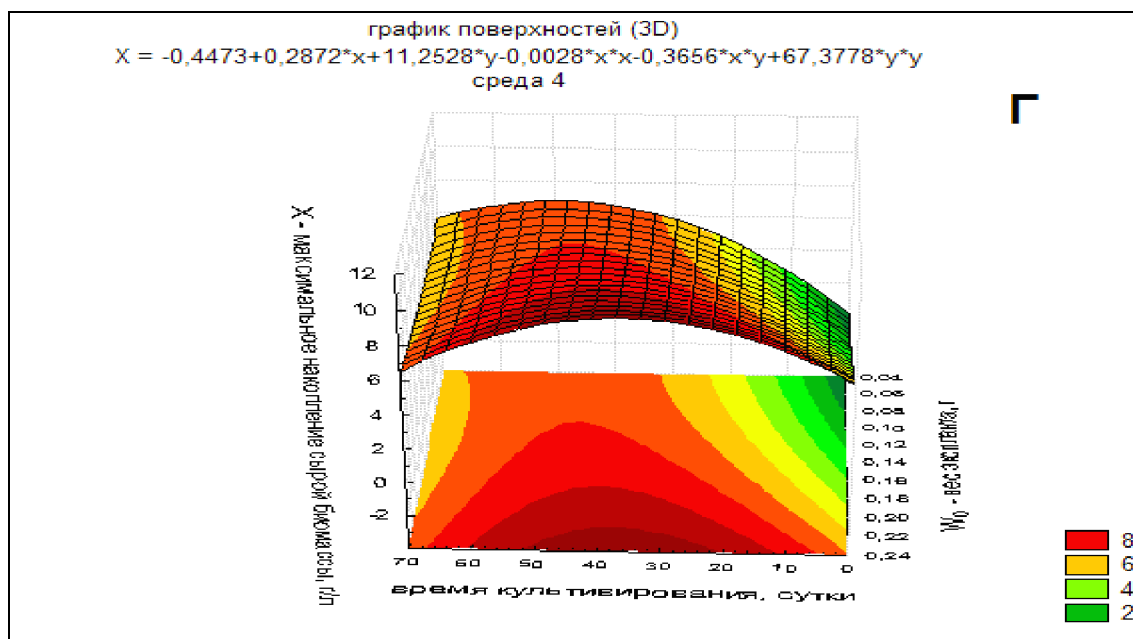


Рис. 2Г. Трехмерное моделирование зависимости максимального накопления сырой биомассы (X) каллуса от веса исходного экспланта и времени культивирования (Среда № 4).

По парное сравнение анализируемых показателей роста, полученных на разных средах, проведено с помощью t-критерия Стьюдента. Было установлено, что несмотря на казалось бы, достоверные результаты, принять их к рассмотрению по большей части следует считать некорректным. Об этом свидетельствуют ненадежные значения F-критерия Фишера. Резюмируя вышесказанное, можно утверждать, что для анализа показателей роста каллусной культуры, культивируемой на разных морфогенных средах, простое использование t-критерия Стьюдента явно недостаточно.

На клеточном уровне процессы пролиферации и морфогенеза, являясь выражением общебиологической закономерности высших растений, могут быть описаны различными параметрами характеризующих рост *in vitro*. Поэтому нами был предложен метод многомерного моделирования с помощью подбора дискриминантных функций. Чтобы уменьшить размерность комплекса признаков и таким образом значительно упростить модель, на первом этапе был проведен матричный корреляционный анализ. Этот анализ позволил выделить мультиколлениарные признаки (между которыми имеется сильная



прямая или обратная корреляционная связь). Снижение размерности комплекса показателей позволило отобрать для последующего анализа только те параметры, которые корреляционно не были связаны между собой.

После пошагового регрессионного анализа, путем постепенного насыщения модели в качестве наиболее и достаточно информативных были оставлены только показатели с наиболее значимой лямбдой Уилкса (таблица 1).

Таблица 1

**Информационная значимость показателей роста, включенных в модель**

показатели	лямбда Уилкса	частная лямбда Уилкса	F-критерий включения в модель	p - уровень значимости	толерантность	Информационная насыщенность модели
W <sup>t</sup>	0,056679	0,123710	75,55619	0,000000	0,049434	0,950566
M	0,027307	0,256770	30,87506	0,000000	0,026055	0,973945
Π <sub>t</sub>	0,017883	0,392098	16,53741	0,000001	0,050776	0,949224
G	0,009843	0,712358	4,30707	0,011639	0,144009	0,855991
μ	0,009570	0,732700	3,89137	0,017718	0,078830	0,921170

Таблица 2

**Классификационная матрица объектов наблюдения с оценкой корректных группировок**

Среды культивирования	процент корректных группировок	апостериорное распределение объектов наблюдения по средам культивирования			
		среда 1	среда 2	среда 3	среда 4
1	100,0000	10	0	0	0
2	100,0000	0	10	0	0
3	90,0000	0	0	9	1
4	80,0000	0	0	2	8
Всего	92,5000	10	10	11	9

Надежность полученной модели иллюстрируют таблица 2 и рисунок 3.

Как представлено в таблице 2 и на рисунке 3 модель в 100% случаев группирует объекты, выращенные на средах 1 и 2. На средах 3 и 4 доля правильность дифференцированных случаев наблюдения составила соответственно 90% и 80%. Математическое описание модели представлено в таблице 3.

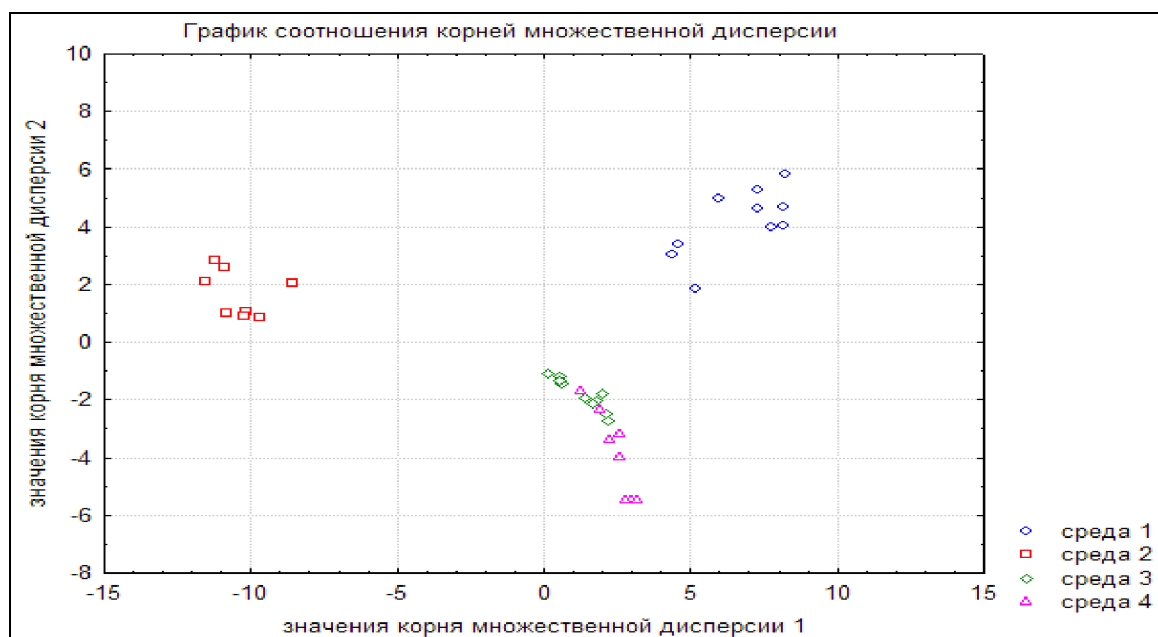


Рис. 3. График, апостериорного распределения объектов наблюдения по группам

Следует обратить внимание на то, что из последних двух сред ни один из объектов наблюдения не был отнесен к группам 1 и 2. Таким образом, среды 3 и 4, можно считать идентичными, которые могут быть описаны одним уравнением модели. Точность моделей можно оценить по малой вариативности параметров на каждом поперечном срезе динамики роста и отсутствием «выскакивающих» величин.

Таблица 3

**Дискриминантная функция модели роста на различных средах**

Показатели роста	Коэффициенты регрессии при переменных (показателя роста)			
	1 среда	2 среда	3 среда	4 среда
P	133,6	1055,4	517,1	496,2
$\Pi^t$	433,4	274588,8	127828,4	-127237,9
I	28,4	308,94	151,20	148,42
G	1,7	-1,36	-0,06	-0,14
$\mu$	2020,3	10764,4	2969,2	-2424,6
Constant	-154,9	-661,4	-225,6	-212,0

Поскольку в нашем случае мы имеем дело, по своей сути, с относительно замкнутой системой, которую, с позиций аутоэкологии, можно отнести к категории микрокосма с не пополняемыми и не регенерируемыми ресурсами, нами было представлено два типа модели. Первый тип – регрессионные модели

(двух- и трехмерные), которые характеризуют динамику роста культуры на различных средах в зависимости от фактора времени, а также от веса исходного экспланта.

Биологическая суть моделей отражает потенциал роста каллусной культуры и сроки его реализации в условиях, когда клетки испытывают воздействие фактора сопротивления среды за счет снижения ее ресурсов и накопления продуктов метаболизма. Общность модели в нашем исследовании подтверждается единым временем реализации репродуктивного потенциала каллуса для всех изученных сред, который приходится на 35-45 сутки культивирования, а также однотипностью моделей т.к. во всех случаях имели место полиномы высоких степеней.

Второй тип модели в наших исследованиях (дискриминантные функции) позволяет совершенно четко дифференцировать культуры, выращенные на разных средах. При этом следует особо подчеркнуть, что модель, как наиболее информативные, составили две группы показателей. Одна группа представлена показателями, которые характеризуют реализованный в условиях конкретной среды потенциал роста культуры каллуса. Сюда вошли показатели конечного веса ( $W_t$ ), увеличение сырого веса ( $M$ ) и прирост сырой массы ( $\Pi_t$ ). Другая группа показателей описывает динамические свойства каллуса – это удельная скорость роста ( $\mu$ ) и время удвоения биомассы ( $G$ ).

Таким образом, благодаря методу дискриминантных функций можно считать доказанным наличие специфических особенностей в динамике роста каллуса на средах, содержащих экзогенные фенольные соединения. Этот же метод позволяет считать среды 3 и 4 во многом идентичными по своим культуральным свойствам. Следует отметить, что такие показатели как максимальное накопление сырой биомассы, экономический коэффициент, продуктивность по биомассе и индекс скорости роста по сырой биомасса оказались для модели излишне информативными.

Высокая статистическая достоверность и информативная значимость модели позволяют считать ее надежным инструментом для апостериорных, так и априорных оценок динамики роста каллуса на разных морфогенных средах.

### **Заключение.**

С помощью математических моделей установлено:

1. При культивировании каллуса сирени листового происхождения сорта «М.Шолохов» на морфогенных средах, содержащих экзогенные фенольные соединения или их предшественники, наиболее продуктивной является среда, содержащая рутин (среда 2).

2. Нами предложен эффективный метод определения ростовых параметров каллуса при культивировании на разных морфогенных средах, который основан на современных принципах математического моделирования. При использовании предложенного метода отпадает необходимость в анализе всех ростовых параметров при изучении процессов морфогенеза.

### **Литература**

1. Бутенко, Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе / Р.Г. Бутенко. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
2. Тюкавкина, Н. А. Биофлавоноиды (Актовая речь) / Н. А. Тюкавкина. – М.: изд дом «Русский врач». – 2002. – 56 с.
3. Носов, А. М. Регуляция синтеза вторичных соединений в культуре клеток растений / А. М. Носов // Биология культивируемых и биотехнология растений / под. ред. Р. Г. Бутенко.– М.: Наука, 1991. – С. 5-20.
4. Plant Tissue Culture – A Potential Source of Medicinal Compounds / S. R. Bhalsing [et al.] // J. Sci. Indust. Res. – 1998. – Vol. 57. – P. 703-708.
5. Кунак А.П. Изменчивость растительного генома в процессе дифференцировки и каллусообразования *in vitro* / В. А. Кунак // Физиология растений. – 1999. – Т. 46. – С. 919-929.
6. Запрометов, М. Н. Фенольные соединения и их роль в жизни растения / М. Н. Запрометов // 56 Тимирязевские чтения. – М.: Наука, 1996. – 45 с.

7. Ranen, P. H. Biology of plants / P. H. Ranen, R. F. Evert, S. E. Eichhorn. – 4-th ed. – Washington: Worth Publ., 1986. – P. 351.
8. Role of cytoskeleton in cell shaping of developing mesophyll of wheat / G. Jung [et al.] // Eur. J. Cell Biol. – 1992. – Vol. 57. – P. 88-94.
9. Васильев, А.Б. Сравнительная структурно-функциональная характеристика цитоскелета животных и растений / А.Б. Васильев // Журн. общ. биологии. –1996. – Т. 57. – С. 293-325.
10. Ranen, P.H. Biology of plants / P.H. Ranen, R.F. Evert, S.E. Eichhorn. – 4-th ed. – Washington: Worth Publ., 1986. – P. 383.
11. Adventitious root growth and cell cycle induction in deepwater rice / R. Lorbiecke [et al.] // Plant Physiol. –1999. –Vol.119. – P. 21-29.
12. Ростовые и биосинтетические характеристики *Syringa vulgaris* L. сорта «М.Шолохов» стеблевого происхождения в культуре *in vitro* / Л. А. Любаковская [и др.] // Вестник ВГМУ. –2007. –Т. 6, № 1. – С. 105-113.
13. Боровиков, В. STATISTICA: искусство анализа данных на компьютере. Для профессионалов / В. Боровиков. – СПб.: Питер, 2001. – 656 с.
14. Бендат, Дж. Прикладной анализ случайных данных: пер с англ. / Дж. Бендат, А. Пирсол. – М.: Мир, 1989. – 540 с.