

УДК 57.017:57.085.23

ЗАКОНОМЕРНОСТИ ВЛИЯНИЯ ЭКЗОГЕННЫХ САХАРИДОВ НА МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ГЕТЕРОТРОФНОЙ КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ ПАЖИТНИКА ГРЕЧЕСКОГО

Д. Ю. ГЛУШАКОВА¹⁾, А. О. ЛОГВИНА¹⁾, В. М. ЮРИН¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь

Представлены результаты изучения влияния типа и концентрации углеводного компонента питательной среды на скорость роста клеток каллусной культуры пажитника греческого (*Trigonella foenum-graecum* L.), их морфологию и уровень накопления сапонинов. Протестированы восемь углеводов в концентрациях 2; 4 и 6 %: моносахариды – глюкоза и галактоза; олигосахариды – сахароза, рафиноза, мальтоза и лактоза; полисахариды – крахмал и инулин. Обнаружена различная реакция каллуса на указанные сахара. Характер изменения удельной скорости роста и общего содержания сапонинов в клеточной культуре не зависит от концентрации и типа углевода. Морфология клеток определяется активностью прироста биомассы каллусной ткани. Высокая удельная скорость роста наблюдается при выращивании каллуса в присутствии 6 % глюкозы или 4 % сахарозы. Максимальные значения общего содержания сапонинов обнаружены на среде, дополненной инулином во всех исследуемых концентрациях. Среди протестированных вариантов питательной среды наиболее приемлемой для культивирования каллуса пажитника греческого в целях получения значительных объемов клеточной биомассы с достаточно высоким содержанием сапонинов является среда, включающая 4 % сахарозы.

Ключевые слова: *Trigonella foenum-graecum*; пажитник греческий; каллусная культура; питательная среда; моносахариды; олигосахариды; полисахариды; удельная скорость роста; морфология клеток; общее содержание сапонинов.

Благодарность. Работа выполнена при финансировании Белорусским республиканским фондом фундаментальных исследований (проект № Б13МС-028 от 16.04.2013 г.).

THE REGULARITY OF INFLUENCE OF EXOGENOUS SACCHARIDE ON THE MORPHOPHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL INDICES OF HETEROTROPHIC CALLUS CULTURE OF FENUGREEK

D. Y. HLUSHAKOVA^a, H. O. LOHVINA^a, V. M. YURIN^a

^aBelarusian State University, Nezavisimosti avenue, 4, 220030, Minsk, Republic of Belarus

Corresponding author: dasha.glushakova@gmail.com

The article presents results of studying the influence of the type and concentration of the carbohydrate component of the culture medium on the growth rate of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) callus culture, their cell

Образец цитирования:

Глушакова Д. Ю., Логвина А. О., Юрин В. М. Закономерности влияния экзогенных сахаридов на морфологические и биохимические показатели гетеротрофной каллусной культуры пажитника греческого // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 1. С. 13–22.

For citation:

Hlushakova D. Y., Lohvina H. O., Yurin V. M. The regularity of influence of exogenous saccharide on the morphophysiological and biochemical indices of heterotrophic callus culture of fenugreek. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 1. P. 13–22 (in Russ.).

Авторы:

Дарья Юрьевна Глушакова – ассистент кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.

Анна Олеговна Логвина – кандидат биологических наук; старший преподаватель кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.

Владимир Михайлович Юрин – доктор биологических наук; профессор кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.

Authors:

Darya Hlushakova, assistant at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology.

dasha.glushakova@gmail.com

Hanna Lohvina, PhD (biology); senior lecturer at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology.

hanna.lohvina@gmail.com

Vladimir Yurin, doctor of science (biology); professor at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology.

yurin@bsu.by

morphology and total saponins. Eight carbohydrates have been tested at concentrations of 2; 4 and 6 %: monosaccharides glucose and galactose, oligosaccharides sucrose, raffinose, maltose and lactose, polysaccharides inulin and starch. It was shown different reaction of the callus on the saccharides addition. The nature of changes of specific growth rate and total saponins in fenugreek cell culture did not depend on the concentration and type of carbohydrate. The morphology of cells was determined by the growth activity of the callus tissue. High specific growth rate is observed when growing the callus in the presence of 6 % glucose, or 4 % sucrose. Maximum total saponins was found on the nutrient medium supplemented with inulin in all tested concentrations. Among tested variants, the nutrient medium comprising 4 % of sucrose was the most suitable for culturing of fenugreek callus to produce significant amounts of cell biomass with relatively high content of saponins.

Key words: *Trigonella foenum-graecum*; fenugreek; callus culture; nutrient medium; monosaccharides; oligosaccharides; polysaccharides; specific growth rate; cell morphology; total saponins.

Acknowledgements. This work was funded by the Belarusian Republican Foundation for Basic Research (project No. Б13МС-028 from 16.04.2013).

Введение

Пажитник греческий (*Trigonella foenum-graecum* L.) – одно из древнейших растений, используемых человеком в терапевтических и пищевых целях. Пажитник и в настоящее время находит применение в различных отраслях промышленности и сельского хозяйства благодаря уникальным ароматическим и лекарственным свойствам [1]. Его надземная масса содержит комплекс разнообразных биологически активных соединений, включающих продукты как первичного, так и вторичного синтеза. Наиболее ценные вторичные метаболиты, производимые данным растением, – сапонины. Высокая рыночная стоимость последних, наряду с ограниченным числом растений, служащих их естественными источниками, объясняет и обуславливает возрастающий интерес к пажитнику греческому [1; 2].

Однако территория естественного произрастания и полевого культивирования пажитника греческого ограничена регионами с теплым климатом, что делает практически невозможным его широко-масштабное использование. Экономически целесообразным альтернативным способом получения фармакологически ценного лекарственного сырья *Trigonella foenum-graecum* является использование культуры его клеток [3].

Перспективность применения данной клеточной технологии определяется рядом преимуществ, среди которых полная независимость культивирования от климатических условий и вредителей, а также возможность контролировать все этапы производства [4; 5]. При этом промышленное применение клеточных культур становится возможным только после детализированной оптимизации условий их выращивания, направленной на получение максимального объема биомассы растительных клеток, характеризующихся высокой продуктивностью в отношении целевых метаболитов. Соответственно, чрезвычайно важный этап исследования клеточных культур *in vitro* – оценка влияния различных факторов (химических и физических) на их морфофизиологические и биохимические показатели [6; 7].

Качественное и количественное варьирование можно осуществлять с любыми компонентами питательных сред, в частности с углеводами. Внесение в состав среды сахаридов является необходимым условием для поддержания роста клеточных культур, а также оказывает выраженное влияние на производство ими биологически активных веществ.

Цель настоящей работы – изучение влияния ряда экзогенных сахаридов на активность ростовых процессов, морфологию клеток и уровень накопления сапонинов гетеротрофной каллусной культурой пажитника греческого.

Материалы и методы исследования

Объектом изучения служила каллусная культура листового происхождения пажитника греческого ярового сорта Ovarі 4. Культивирование каллуса осуществляли на вариантах питательных сред, фитогормональный состав которых был оптимизирован ранее [8]. Минеральная основа питательного раствора соответствовала среде Мурасиге и Скуга (МС) [9]. Среду МС дополняли регуляторами роста – 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой, кинетином, индолил-3-уксусной кислотой в концентрации 2 мг/л. Каллусная культура выращивалась в темноте в условиях микробиологического термостата при температуре 24 °С. Для оценки активности ростовых процессов каллусных культур пажитника греческого определяли удельную скорость роста [10]. Для установления морфологических особенностей клеток проводили окрашивание фрагментов каллусной ткани нейтральным красным с последующим приготовлением временных давленных препаратов, которые изучались под микроскопом. Общее содержание стероидных сапонинов в 30 % водно-спиртовых экстрактах каллусов определяли

с использованием спектрофотометрической методики [11] и выражали в миллиграммах на грамм сухой массы в эквиваленте дигитонина.

Исследование влияния источника углевода на указанные показатели каллуса пажитника греческого включало тестирование сред, дополненных глюкозой, галактозой, сахарозой, мальтозой, лактозой, рафинозой, инулином и крахмалом в концентрациях 2; 4 и 6 %.

Результаты исследований и их обсуждение

Углеводы являются обязательными составляющими питательных сред наряду с фитогормонами и минеральными веществами. Наиболее часто для культивирования клеточных культур применяется сахароза [6, с. 164; 12]. Реже культуры выращивают в присутствии глюкозы, фруктозы, лактозы, мальтозы, галактозы, крахмала и т. д., но эти соединения во многих случаях хуже усваиваются клетками по сравнению с сахарозой, что негативно сказывается на показателях роста клеток [13]. Данному вопросу посвящено много экспериментальных работ и ряд обзоров [14–18].

В связи с отсутствием в литературе сведений о влиянии углеводов на рост и биохимические показатели каллусных культур пажитника греческого нами протестирован широкий спектр сахаридов, которые можно дифференцировать на три группы: моносахариды (глюкоза, галактоза), олигосахариды (дисахариды – сахароза, мальтоза и лактоза, трисахарид рафиноза) и полисахариды (инулин и крахмал).

На первом этапе исследования было установлено влияние сахаридов на рост гетеротрофной каллусной культуры пажитника греческого.

Тестирование моносахаридов показало, что при дополнении питательной среды глюкозой увеличение ее концентрации в среде культивирования с 2 до 6 % сопровождалось небольшой стимуляцией ростовых процессов каллуса (рис. 1, б). Максимальное значение удельной скорости роста зафиксировано в присутствии 6 % глюкозы – $0,146 \pm 0,012$ сут⁻¹. При культивировании каллусной ткани на среде, дополненной 2 и 4 % галактозы, удельная скорость роста различалась незначительно, составляя всего $0,053 \pm 0,006$ и $0,052 \pm 0,009$ сут⁻¹ соответственно. Увеличение концентрации галактозы до 6 % привело к значительному повышению интенсивности прироста биомассы. Удельная скорость роста для данного варианта среды была равна $0,083 \pm 0,005$ сут⁻¹, что тем не менее на 40 % ниже по сравнению со средой, включающей глюкозу в той же концентрации.

Ранее упоминалось, что исследование влияния олигосахаридов включало тестирование сахарозы, рафинозы, лактозы и мальтозы. Из данных, представленных на рис. 1, а, можно сделать вывод о наличии схожих закономерностей изменения ростовых показателей каллуса пажитника греческого на средах, дополненных сахарозой и рафинозой. Так, для обоих углеводов наиболее высокие значения удельной скорости роста каллуса наблюдаются в присутствии их в концентрации 4 %: $0,145 \pm 0,007$ сут⁻¹ – для сахарозы, $0,068 \pm 0,010$ сут⁻¹ – для рафинозы. Уменьшение содержания данных сахаридов в среде до 2 %, как и повышение до 6 %, приводит к существенному снижению скорости роста – в 4–5 раз по сравнению с вариантом среды с 4 % каждого из углеводов. Также общая зависимость, однако противоположного вида, обнаруживается для двух других олигосахаридов – лактозы и мальтозы. Относительно высокая активность ростовых процессов каллуса, в целом сопоставимая со скоростью его роста под влиянием 4 % рафинозы, наблюдается на среде с 2 и 6 % лактозы и 6 % мальтозы. Самые низкие показатели роста фиксируются при их содержании в размере 4 %.

Наряду с исследованием влияния моно- и олигосахаридов на рост каллусной культуры был установлен характер действия полисахаридов крахмала и инулина. Полученные данные представлены на рис. 1, в. Показано, что при внесении в состав среды крахмала в качестве углеводного компонента обнаруживалась концентрационная зависимость, аналогичная для олигосахаридов сахарозы и рафинозы. Так, максимальная удельная скорость роста, равная $0,035 \pm 0,002$ сут⁻¹, была характерна для среды со средней концентрацией крахмала (4 %). Одновременно с этим инулин продемонстрировал концентрационную зависимость, идентичную наблюдаемой в случае галактозы, с максимальным значением удельной скорости в варианте с 6 % содержанием ($0,023 \pm 0,001$ сут⁻¹).

Из литературных данных известно, что после сахарозы – компонента большинства питательных сред [12; 13] – наиболее употребимым источником углерода и энергии для культур *in vitro* является глюкоза. Установлено, что данный углевод можно успешно использовать для выращивания клеточных культур яблони, кокосовой пальмы, апельсина, моркови, кукурузы и др. [15]. Нами также показана перспективность применения глюкозы для поддержания высокой активности прироста биомассы гетеротрофной каллусной культуры пажитника греческого.

Геринг и Рекин (1968) систематизировали большое число исследований по действию галактозы на растительные объекты и показали, что из клеточных культур 28 видов растений лишь три (культуры явора, яблони и апельсина) удовлетворительно усваивают данный моносахарид. Для остальных

протестированных культур *in vitro* галактоза оказалась токсичной. Галактоза в свободном состоянии в растениях практически не встречается. Обнаруживается главным образом в составе полисахаридов клеточных стенок, а также галактолипидах мембран [19]. Поэтому, возможно, ее негативное воздействие на рост большинства клеточных культур объясняется отсутствием или низкой активностью ферментов, ответственных за ее утилизацию, – галактокиназы, галакто-1-фосфатуридилтрансферазы и др. [19].

В нашем случае выраженного токсического эффекта (приводящего к полному подавлению роста клеточной культуры) от введения в среду галактозы не наблюдается. Однако активность роста каллуса пажитника греческого в ее присутствии более чем в два раза ниже по сравнению со средами, дополненными глюкозой.

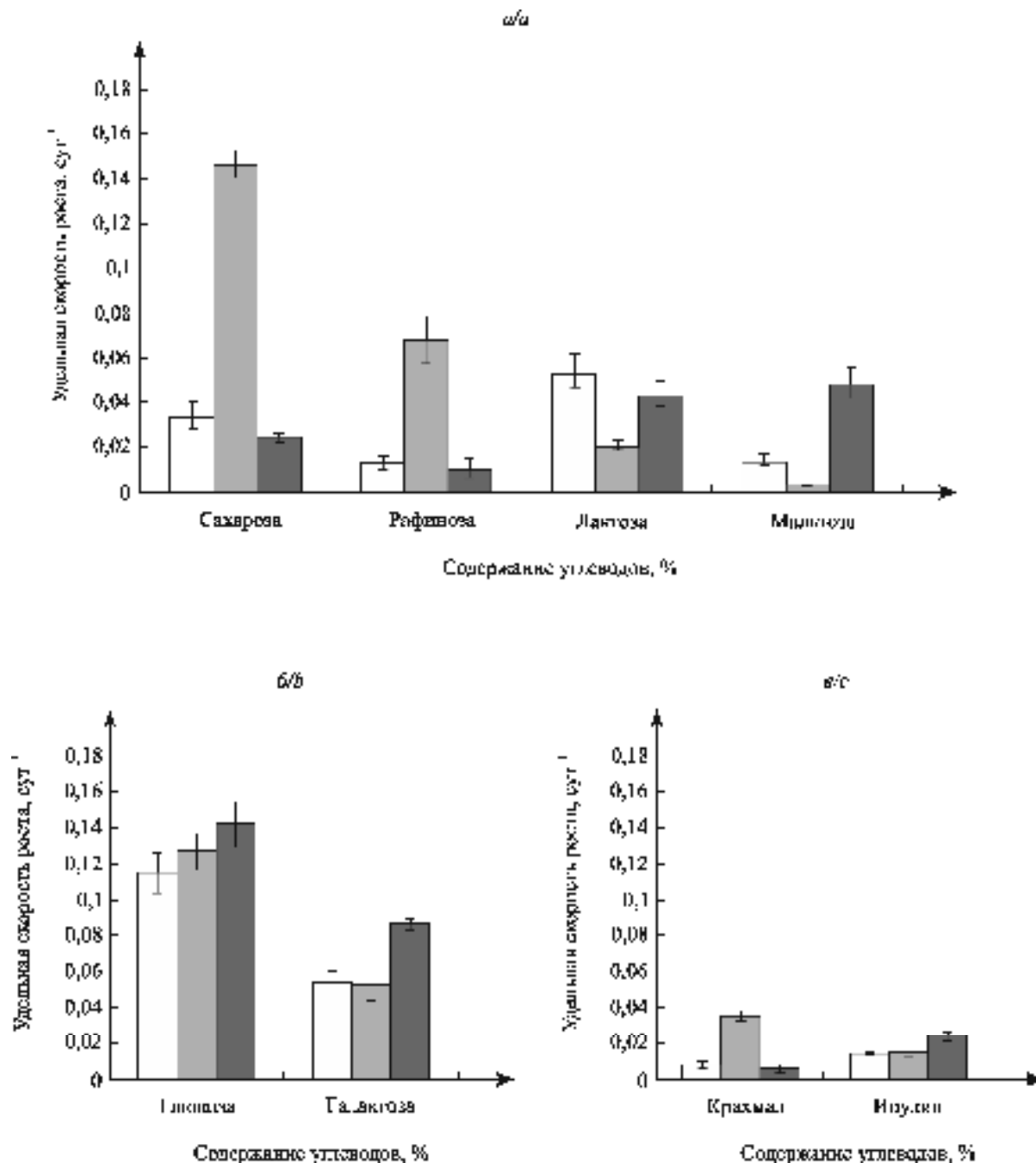


Рис. 1. Влияние олигосахаридов (а), моносахаридов (б) и полисахаридов (в) на удельную скорость роста каллусной культуры пажитника греческого. Содержание углеводов в среде: □ – 2 %; ▒ – 4 %; ■ – 6 %

Fig. 1. Effect of oligosaccharides (a), monosaccharides (b) and polysaccharides (c) on specific growth rate of callus culture of fenugreek. Carbohydrate content in the nutrient medium: □ – 2 %; ▒ – 4 %; ■ – 6 %

Из олигосахаридов наиболее высокая ростовая активность каллусной ткани пажитника греческого обнаруживается на средах, дополненных сахарозой в концентрациях 4 и 6 %. Ввиду того что сахароза представляет собой первый свободный продукт фотосинтеза и основную транспортную форму сахаров для интактных растений, она, вероятно, является также наиболее подходящим сахаридом для выращивания большинства культур тканей высших растений, что находит отражение в составе используемых питательных сред [4, с. 157; 20].

При культивировании каллуса пажитника греческого на среде с 2 % рафинозы наблюдалась средняя активность ростовых процессов. Из литературных данных известно, что рафинозу можно успешно применять для роста культур огурца, яблони, апельсина и др. Данный сахар, содержащий галактозный, фруктозный и глюкозный остатки, является резервным углеводом многих растений, в том числе перечисленных. Вероятно, это также объясняет возможность роста изучаемой нами каллусной культуры на среде, включающей рафинозу.

Применение олигосахаридов лактозы и мальтозы для поддержания роста каллуса пажитника греческого было гораздо менее эффективным по сравнению с сахарозой, однако в целом соизмеримым с действием рафинозы. Непригодность использования лактозы, показанная для многих культур, возможно, определяется наличием в составе ее молекулы (помимо глюкозного) галактозного остатка, освобождаемого в результате расщепления и токсичного для многих растений. Только культура винограда успешно растет на среде с лактозой. Мальтоза, состоящая из двух остатков глюкозы, больше подходит для внесения в питательные среды и применяется в качестве источника углерода для культур явора, моркови, топинамбура [21, с. 22].

Внесение в состав питательных сред полисахаридов крахмала, состоящего из остатков глюкозы, и инулина, образованного фруктозными мономерами, хотя и обеспечивало при определенных концентрациях небольшой прирост биомассы каллуса пажитника греческого, оказалось наиболее неэффективным среди всех протестированных углеводов. Возможность использования крахмала в качестве углеродного питания культур проверялась многими авторами, вероятно, по причине его высокой доступности. Хороший рост показали культуры явора, яблони и тростника [21, с. 31]. Пригодность применения полисахаридов связана главным образом с гидролизом полимерных молекул до мономеров в результате высокотемпературного воздействия в ходе стерилизации питательных сред путем автоклавирования.

Анализ представленных выше данных по влиянию сахаридов на рост гетеротрофной каллусной культуры пажитника греческого позволяет заключить следующее. Как и для большинства клеточных культур, наиболее оптимальными субстратами для поддержания высоких показателей прироста биомассы изучаемого нами каллуса являются моносахарид глюкоза и олигосахарид сахароза в концентрациях 6 и 4 % соответственно. Удельная скорость роста каллуса в присутствии данных углеводов достоверно не различается. Средние показатели роста каллусной ткани пажитника греческого характерны для сред, включающих 4 % рафинозы и 6 % галактозы. Наименее подходящими для выращивания объекта наших исследований являются среды, дополненные олигосахаридами лактозой и мальтозой и особенно полисахаридами – крахмалом и инулином.

Важно отметить, что ни для одного из протестированных углеводов не наблюдается абсолютного ростоингибирующего эффекта в отношении каллуса пажитника греческого, что указывает на более или менее выраженную способность к их усвоению в качестве источников углерода и энергии. Объяснением этому в случае токсичных для большинства клеточных культур галактозы, рафинозы и лактозы, содержащих в своем составе галактозный остаток, видимо, является наличие в клетках каллуса соответствующих ферментов, ответственных за утилизацию галактозы. Способность же каллуса поддерживать рост, хотя и с низкой скоростью, в присутствии полисахаридов обусловлена частичным их гидролизом во время автоклавирования с образованием более простых по структуре сахаридов, доступных для клеток каллуса.

Углеводный состав среды может оказывать выраженное влияние на физиолого-биохимические процессы в культивируемых клетках, приводя к изменению не только активности их роста, но и морфологии, также отражающей состояние культуры *in vitro* под действием изменяющихся условий выращивания (рис. 2).

Проведенные нами исследования позволили установить, что каллусная культура *Trigonella foenum-graecum* на всех вариантах питательных сред состояла только из клеток, относящихся к двум основным морфологическим типам. Первый тип – клетки меристематического типа. Они располагались крупными локальными скоплениями либо состояли из небольшого числа клеток, имели преимущественно небольшие размеры и округлую форму. Второй тип – клетки паренхимного типа, отличающиеся значительной вариабельностью формы и размеров. В присутствии глюкозы во всех концентрациях, сахарозы и рафинозы – 4 %,

галактозы – 6 % каллус имел рыхлую однородную структуру. Равномерно расположенные в толще каллусной ткани меристематические очаги были окружены клетками паренхимного типа, имеющими в большинстве своем округлую или овальную форму, и характеризовались средними и крупными размерами. Важно отметить, что каллус на данных вариантах демонстрировал высокие и средние показатели роста.

Дополнение среды протестированными олигосахаридами в ингибирующих рост концентрациях, крахмалом и инулином во всех вариантах концентраций привело к уплотнению каллусной ткани, уменьшению размеров клеток, упрочнению межклеточных контактов даже в клеточных скоплениях, образованных клетками паренхимного типа, повышению разнообразия их формы – клетки были овальными, червеобразными, вытянутыми или неправильной формы. Причем чем ниже были показатели роста, тем более выраженными были изменения в структуре каллусной ткани.

Таким образом, в соответствии с полученными данными можно заключить, что структура каллуса и морфологические характеристики клеток не зависят от типа экзогенного сахара. Общей для углеводов концентрационной зависимости также не обнаружено. Одновременно с этим прослеживается четкая закономерность изменения структуры ткани и морфологии составляющих ее клеток от интенсивности ростовых процессов каллусной культуры.

Как было отмечено выше, культуры растительных клеток находят применение в качестве источников ценных соединений, имеющих важное значение для пищевой и фармацевтической промышленности. При этом в литературных источниках часто появляются сведения о том, что инициированные культуры демонстрируют более низкое содержание целевого соединения по сравнению с интактными растениями [22]. Хорошо известно, что варьирование состава питательной среды может в значительной степени повысить выход продуктов вторичного метаболизма [23]. В частности, тип источника углерода в среде способен оказывать выраженное влияние на уровень биологически активных веществ в культурах

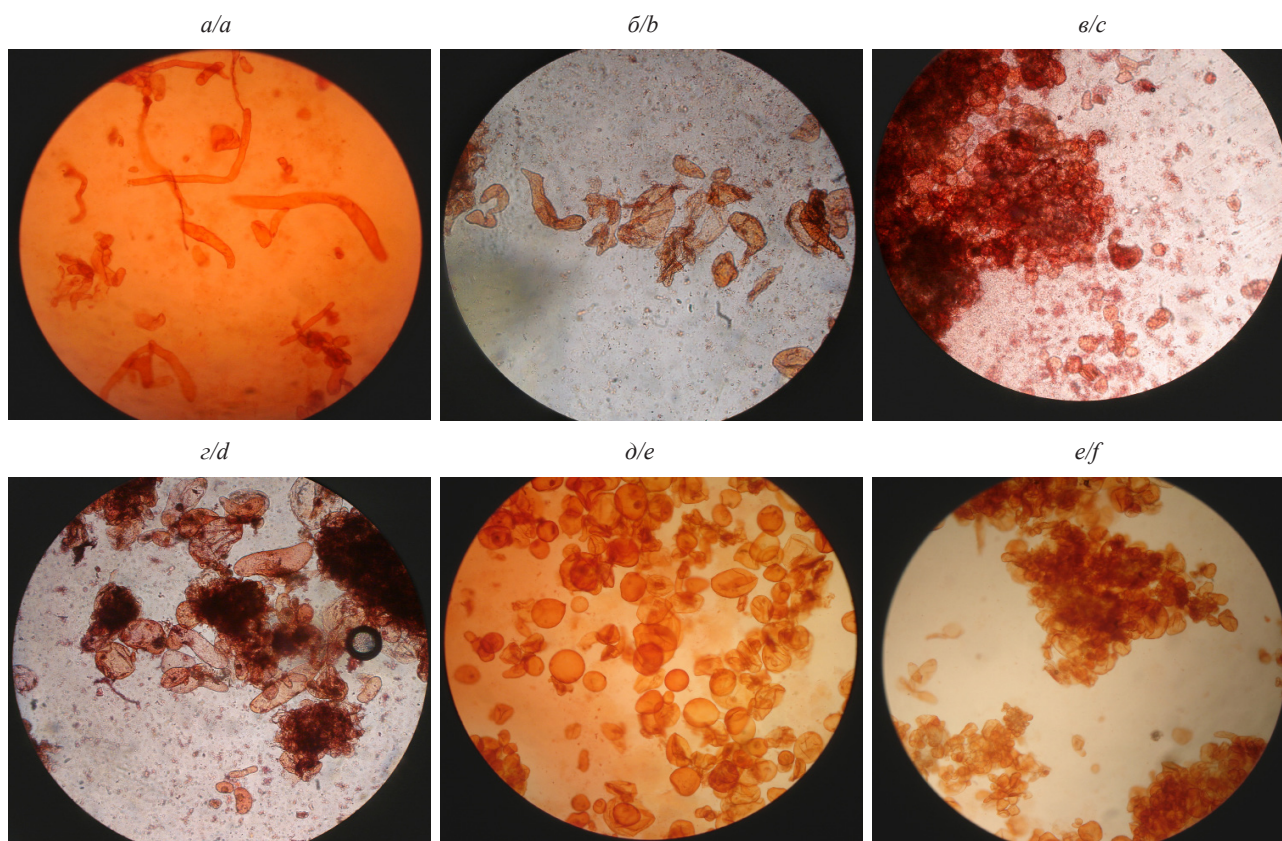


Рис. 2. Морфология клеток каллусной культуры пажитника греческого, культивируемой на питательных средах, содержащих различные сахарады:

a – крупные червеобразные клетки в присутствии 6 % крахмала; *б* – червеобразные клетки в присутствии 2 % мальтозы; *в* – скопления клеток меристематического типа в присутствии 6 % галактозы; *з* – большие червеобразные и округлые клетки вокруг скопления клеток меристематического типа в присутствии 6 % глюкозы; *д* – крупные округлые и вытянутые клетки в присутствии 4 % лактозы; *е* – меристематические очаги в присутствии 2 % крахмала

Fig. 2. The morphology of fenugreek callus cells in the presence of various saccharides:

a – large vermiform cells in the presence of 6 % starch; *b* – vermiform cells in the presence of 2 % maltose; *c* – clusters of meristematic cells in the presence of 6 % galactose; *d* – large vermiform and rounded meristematic cells in the presence of 6 % glucose; *e* – large round and elongated cells in the presence of 4 % lactose; *f* – meristematic centers in the presence of 2 % starch

in vitro [13]. Действие сахаров на биосинтез вторичных продуктов может быть результатом поглощения только специфического источника углерода или отражать изменения в метаболизме, вызванные смещением общего баланса углерод/азот в зависимости от типа углеводов [21]. В связи с этим следующим этапом работы стало изучение влияния типа сахара в среде на уровень накопления сапонинов гетеротрофным каллусом пажитника греческого (рис. 3).

Исследование влияния моносахаридов на общее содержание сапонинов в каллусе, результаты которого отражены на рис. 3, б, показало, что при внесении в состав среды глюкозы в концентрации 6 % наблюдалось наиболее высокое значение указанного биохимического показателя – 83 ± 7 мг/г сухой массы. Выращивание каллуса в присутствии 2 и 4 % глюкозы оказалось практически в два раза менее

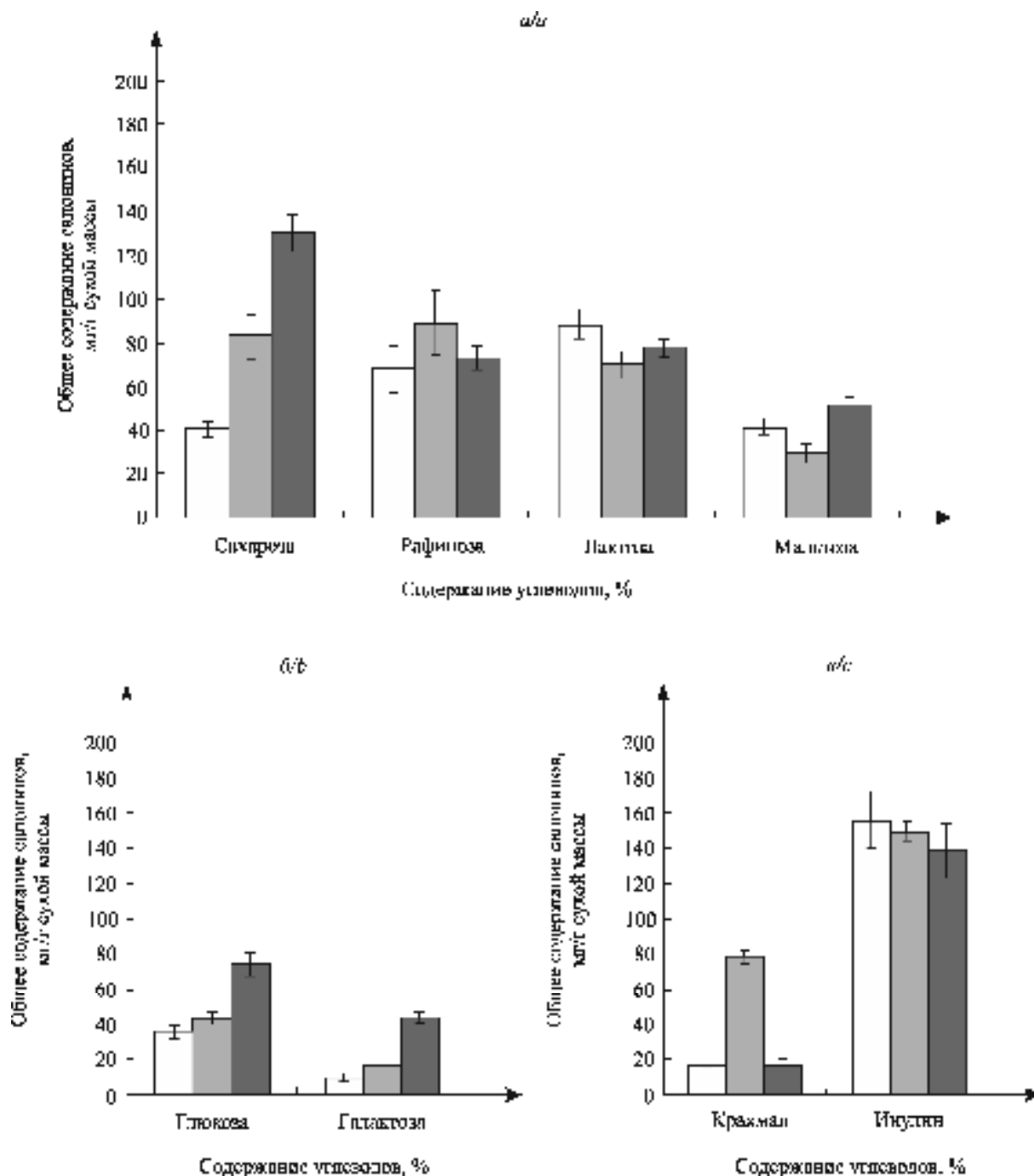


Рис. 3. Влияние олигосахаридов (а), моносахаридов (б) и полисахаридов (в) на общее содержание сапонинов в каллусной культуре пажитника греческого. Содержание углеводов в среде: □ – 2 %; ▒ – 4 %; ■ – 6 %

Fig. 3. Effect of oligosaccharides (a), monosaccharides (b) and polysaccharides (c) on total saponins in callus culture of fenugreek. Carbohydrate content in the nutrient medium: □ – 2 %; ▒ – 4 %; ■ – 6 %

эффективным. На средах, дополненных галактозой, прослеживалась схожая концентрационная зависимость. Наиболее высокое общее содержание сапонинов также обнаруживалось в присутствии 6 % галактозы, но составляло всего 48 ± 3 мг/г сухой массы.

В ходе тестирования влияния олигосахаридов обнаружено, что повышение содержания сахарозы в питательной среде приводило к постепенному росту уровня сапонинов в каллусной ткани, достигшему значения 129 ± 3 мг/г сухой массы в присутствии 6 % углевода. В случае рафинозы не выявлено достоверных различий между содержанием сапонинов на средах с разными ее концентрациями. Однако можно отметить, что значения определяемого биохимического показателя варьировали от 67 ± 10 мг/г сухой массы в присутствии 2 % рафинозы до 88 ± 14 мг/г сухой массы при внесении 4 % данного сахара. При добавлении в среду лактозы наиболее высокий уровень сапонинов характерен для ее содержания в размере 2 %, как и в случае рафинозы, показатель равен 88 ± 6 мг/г сухой массы. Каллусная ткань на среде, дополненной мальтозой, демонстрировала самый низкий уровень исследуемых вторичных метаболитов по сравнению с другими олигосахаридами: максимальное общее содержание сапонинов обнаруживалось в присутствии мальтозы в концентрации 6 %, составляя 50 ± 4 мг/г сухой массы.

Введение в состав среды полисахарида крахмала показало, что наиболее высокое значение суммарного содержания сапонинов наблюдалось в присутствии 4 % указанного углевода – 89 ± 4 мг/г сухой массы, что в четыре раза выше, чем для двух других тестируемых его концентраций. В случае второго применяемого в исследовании полисахарида – инулина – продемонстрировано, что независимо от его содержания в питательной среде уровень накопления сапонинов был одинаково высоким, составляя в среднем 170 ± 11 мг/г сухой массы.

Примечательно, что наиболее высокое содержание интересующих нас вторичных метаболитов было найдено в присутствии сахара, в наибольшей степени проявляющего ростоингибирующее действие среди всех вносимых в среду углеводов – инулина во всех концентрациях и сахарозы в концентрации 6 %, также подавляющей рост в данной концентрации. Такая же закономерность была выявлена при изучении зависимости накопления диосгенина от ростовых показателей культурой *Dioscorea deltoidea* [4, с. 207]. Как было отмечено в [24], накопление вторичных метаболитов зачастую интенсифицируется при существенном замедлении роста клеточных культур. Подобная реакция каллуса пажитника греческого при добавлении в питательную среду 6 % сахарозы, скорее всего, объясняется осмотическим стрессом, испытываемым клетками в результате сильного повышения осмотического потенциала среды в присутствии высоких концентраций углеводов [21].

В случае инулина осмотический стресс может объяснять полученные результаты только для его наиболее высокой концентрации, равной 6 %. Однако с учетом низких показателей роста с очень высоким уровнем сапонинов в присутствии 2 и 4 % данного полисахарида более вероятным объяснением является отсутствие ферментативных систем, обеспечивающих усвояемость инулина в чистом виде, и недостаточное количество более доступных углеводов, появившихся в среде в результате ее высокотемпературной стерилизации. Видимо, угнетение роста обусловлено дефицитом энергетического и углеродсодержащего субстрата.

Для подавляющего большинства вариантов опыта со средними показателями роста обнаруживались и средние по значениям уровня накопления сапонинов. Кроме этого, в ходе тестирования влияния глюкозы, галактозы, рафинозы, лактозы, мальтозы и крахмала показано, что максимальные для каждого отдельного сахара значения скорости роста каллуса и общего содержания сапонинов приходятся на одну и ту же концентрацию. В данных случаях, вероятно, наблюдается баланс между ростовыми процессами и активностью вторичного синтеза.

Заключение

Таким образом, представленные результаты позволяют сделать следующие выводы. Изменение углеводного состава питательной среды оказывает выраженное влияние на рост, морфологию клеток и содержание сапонинов в гетеротрофной каллусной культуре пажитника греческого. В отношении данных показателей каллусная ткань демонстрирует индивидуальную реакцию на протестированные сахара. Зависимости определяемых параметров от принадлежности углеводов к классам моно-, олиго- или полисахаридов, как и общей концентрационной закономерности, не выявлено. При этом характер изменения морфологии каллусных клеток под воздействием различных углеводов коррелирует с активностью прироста биомассы. Так, на вариантах сред, характеризующихся низкой удельной скоростью роста каллуса, обнаруживаются преимущественно небольшие клетки со значительной вариабельностью формы. Высокие же показатели роста сопровождаются увеличением размеров клеток и повышением их однородности по форме с преобладанием округлых клеток. При дополнении питательного раствора протестированными углеводами – глюкозой, галактозой, сахарозой, рафинозой, мальтозой, лактозой,

крахмалом, инулином – в концентрациях 2; 4 и 6 % одновременной интенсификации роста и накопления сапонинов каллусом не наблюдается ни в одном из опытных вариантов. Тем не менее внесение в состав питательной среды 4 % сахарозы или 6 % глюкозы обеспечивает увеличение объема клеточной биомассы. Наиболее высокий выход сапонинов наблюдается на средах, дополненных инулином в любой из протестированных концентраций, однако чрезвычайно низкий прирост биомассы в этих случаях делает использование данных вариантов среды нецелесообразным. В наибольшей степени продуктивной является среда, содержащая в качестве источника углерода и энергии 4 % сахарозы. На данной питательной среде средние значения содержания сапонинов сочетаются с высокими показателями роста гетеротрофной каллусной культуры пажитника греческого.

Библиографические ссылки

1. Nadkarni A. K. Indian Materia Medica. Bombay, 1982. P. 1240–1243.
2. Rajagopalan M. S. Fenugreek, what this herb can offer? // *Naturally*. 1998. Vol. 1. P. 1–4.
3. Kaviarasan S., Viswanathan P., Anuradha C. V. Fenugreek seed (*Trigonella foenum-graecum*) polyphenols inhibit ethanol-induced collagen and lipid accumulation in rat liver // *Cell Biol. Toxicol.* 2007. Vol. 23, issue 6. P. 373–383.
4. Брежнева Т. А., Атаманова С. А., Сливкин А. И. и др. Особенности выделения сапонинов из корнеплодов растения *Beta Vulgaris* L. // *Вестн. Воронеж. гос. ун-та. Сер.: Химия. Биология. Фармация*. 2004. № 1. С. 152–155.
5. Волова Т. Г. Биотехнология. Новосибирск, 1999.
6. Курсанов А. Л. Транспорт ассимиляторов в растении. М., 1976.
7. Блажевич О. В. Культивирование клеток : курс лекций. Минск, 2005.
8. Lohvina H. O., Makai S., Ditchenko T. I., et al. Induction of callus from leaves and stems of *Trigonella foenum-graecum* varieties // *Acta Agron. Ovariensis*. 2012. Vol. 54, № 2. P. 29–37.
9. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* 1962. Vol. 15, № 3. P. 473–497.
10. Калинин Ф. Л., Сариацкая В. В., Полищук В. Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев, 1980.
11. Hiai S., Oura H., Nakajima T. Color reaction of some sapogenins and saponins with vanillin sulfuric acid // *Planta Med.* 1976. Vol. 29. P. 116–122.
12. Ong S. L., Ling A. P. K., Poosporagi R., et al. Production of flavonoid compounds in cell cultures of *Ficus deltoidea* as influenced by medium composition // *Int. J. Med. Arom. Plants*. 2011. Vol. 1, № 2. P. 62–74.
13. Chawla H. S. Introduction to plant biotechnology. 2nd ed. Enfield, 2002.
14. Холодова В. П. Рост и метаболизм углеводов в культуре тканей растений // *Культура клеток растений*. М., 1981. С. 17–36.
15. Bhojwani S. S., Razdan M. K. Plant tissue culture: theory and practice. Amsterdam, 1996.
16. Chae Hyun Yum, Hyun Ju You, Geun Eog Ji. Cytotoxicity of Dioscin and Biotransformed Fenugreek // *J. Korean Society Appl. Biol. Chem.* 2010. Vol. 53. P. 470–477.
17. Ching-Long Lai, Jui-Sen Yang. Production of crocin by fruit callus culture of gardenia jasminoides ellis // *Food Biotechnol.* 2009. Vol. 13. P. 209–216.
18. Masoumian M., Arbakariya A., Syahida A., et al. Flavonoids production in *Hydrocotyle bonariensis* callus tissues // *J. Med. Plants*. 2011. Vol. 5 (9). P. 1564–1574.
19. Feingold D. S. Aldo (and keto) hexoses and uronic acids // *Encyclopedia of Plant Physiol. New series*. 1982. Vol. 13. P. 3–77.
20. Schenk R. V., Hildebrandt A. C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures // *Can. J. Bot.* 1972. Vol. 50. P. 199–204.
21. Урманцева В. В. Особенности углеводного обмена разных штаммов культуры тканей сахарной свеклы. М., 1985. С. 9–45.
22. Васильева И. С., Пасеиниченко В. А. Стероидные гликозиды растений и культуры клеток диоскореи, их метаболизм и биологическая активность // *Успехи биол. химии*. 2000. Т. 40. С. 153–204.
23. Kim S. I., Choi H. K., Kim J. H., et al. Effect of osmotic pressure on paclitaxel production in suspension cell cultures of *Taxus chinensis* // *Microb. Technol.* 2001. Vol. 28. P. 202–209.
24. Логвина А. О., Глушакова Д. Ю., Дитченко Т. И. и др. Динамика накопления фенольных соединений и сапонинов каллусными культурами пажитника греческого в ходе ростового цикла // *Вестн. БГУ. Сер. 2, Химия. Биология. География*. 2014. № 1. С. 27–31.

References

1. Nadkarni A. K. Indian Materia Medica. Bombay, 1982. P. 1240–1243.
2. Rajagopalan M. S. Fenugreek, what this herb can offer? *Naturally*. 1998. Vol. 1. P. 1–4.
3. Kaviarasan S., Viswanathan P., Anuradha C. V. Fenugreek seed (*Trigonella foenum-graecum*) polyphenols inhibit ethanol-induced collagen and lipid accumulation in rat liver. *Cell Biol. Toxicol.* 2007. Vol. 23, issue 6. P. 373–383.
4. Brezhneva T. A., Atamanova S. A., Slivkin A. I., et al. Features of selection of saponins from the plants root crops *Beta Vulgaris* L. *Vestnik Voronezhskii gos. univ. Ser.: Khim. Biol. Farmatsiya*. 2004. No. 1. P. 152–155 (in Russ.).
5. Volova T. G. Biotechnology [Biotechnology]. Novosibirsk, 1999 (in Russ.).
6. Kursanov A. L. Transport assimilatorov v rastenii [Transport assimilators in the plant]. Moscow, 1976 (in Russ.).
7. Blazevic O. V. Kul'tivirovanie kletok [Cultivation of cells]. Minsk, 2005 (in Russ.).
8. Lohvina H. O., Makai S., Ditchenko T. I., et al. Induction of callus from leaves and stems of *Trigonella foenum-graecum* varieties. *Acta Agron. Ovariensis*. 2012. Vol. 54, No. 2. P. 29–37.

9. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1962. Vol. 15, No. 3. P. 473–497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
10. Kalinin F. L., Saryatskaya V. V., Polishchuk V. E. Metody kul'tury tkanei v fiziologii i biokhimii rastenii [Tissue culture techniques in plant physiology and biochemistry]. Kiev, 1980 (in Russ.).
11. Hiai S., Oura H., Nakajima T. Color reaction of some sapogenins and saponins with vanillin sulfuric acid. *Planta Med.* 1976. Vol. 29. P. 116–122. DOI: 10.1055/s-0028-1097639.
12. Ong S. L., Ling A. P. K., Poosporagi R., et al. Production of flavonoid compounds in cell cultures of *Ficus deltoidea* as influenced by medium composition. *Int. J. Med. Arom. Plants.* 2011. Vol. 1, No. 2. P. 62–74.
13. Chawla H. S. Introduction to plant biotechnology. 2nd ed. Enfield, 2002.
14. Kholodova V. P. Rost i metabolism uglevodov v kul'ture tkanei rastenii [The growth and metabolism of carbohydrates in the plant tissue culture]. In: *Culture of plant cells*. Moscow, 1981. P. 17–36 (in Russ.).
15. Bhojwani S. S., Razdan M. K. Plant tissue culture: theory and practice. Amsterdam, 1996.
16. Chae Hyun Yum, Hyun Ju You, Geun Eog Ji. Cytotoxicity of Dioscin and Biotransformed Fenugreek. *J. Korean Society Appl. Biol. Chem.* 2010. Vol. 53. P. 470–477.
17. Ching-Long Lai, Jui-Sen Yang. Production of crocin by fruit callus culture of gardenia jasminoides ellis. *Food Biotechnol.* 2009. Vol. 13. P. 209–216.
18. Masoumian M., Arbakariya A., Syahida A., et al. Flavonoids production in *Hydrocotyle bonariensis* callus tissues. *J. Med. Plants.* 2011. Vol. 5 (9). P. 1564–1574.
19. Feingold D. S. Aldo (and keto) hexoses and uronic acids. *Encyclopedia Plant Physiol. New series.* 1982. Vol. 13. P. 3–77.
20. Schenk R. V., Hildebrandt A. C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 1972. Vol. 50. P. 199–204.
21. Urmantseva V. V. Osobennosti uglevodnogo obmena raznykh shtamov kul'tury tkanei sakharnoi svekly [Features of different strains of carbohydrate metabolism of sugar beet tissue culture]. Moscow, 1985. P. 9–45 (in Russ.).
22. Vasilyeva I. S., Paseshnichenko V. A. Steroidal glycosides of plant and cell culture of *Dioscorea*, their metabolism and biological activity. *Uspekhi biol. khim.* 2000. Vol. 40. P. 153–204 (in Russ.).
23. Kim S. I., Choi H. K., Kim J. H., et al. Effect of osmotic pressure on paclitaxel production in suspension cell cultures of *Taxus chinensis*. *Microb. Technol.* 2001. Vol. 28. P. 202–209.
24. Logvina A. O., Glushakova D. Y., Ditchenko T. I., et al. Dynamics of accumulation of phenolics and saponins in the growth cycle of fenugreek calli. *Vestnik BGU. Ser. 2, Khim. Biol. Geogr.* 2014. No. 1. P. 27–31 (in Russ.).

Статья поступила в редколлегию 20.12.2016.
Received by editorial board 20.12.2016.