

УДК: 57.017:57.085.23

## **Характеристика роста клеток и накопления фенольных соединений в суспензионной культуре *Trigonella foenum-graecum* L.**

Логвина А. О., Емельянова П. А., Дитченко Т. И., Юрин В. М.

В данной статье представлена характеристика изменения параметров роста и активности синтеза фенольных соединений в ходе культивирования суспензии клеток *Trigonella foenum-graecum* L. Показано, что суспензионная культура характеризуется типичным S-образным типом роста, высокой жизнеспособностью, преобладанием одиночных клеток и мелких агрегатов. Отмечена способность культуры накапливать фенольные соединения, преимущественно фенолкарбоновые кислоты, на протяжении всего ростового цикла.

*Ключевые слова:* пажитник греческий, *Trigonella foenum-graecum* L., суспензионная культура, кривая роста, жизнеспособность, степень агрегированности, фенольные соединения, фенолкарбоновые кислоты.

## **Characterization of cell growth and accumulation of phenolic compounds in suspension culture of *Trigonella foenum-graecum* L.**

Lohvina N. O., Emeliyanova P. A., Ditchenko T. I., Yurin V. M.

The paper presents a characteristic of cell growth activity and synthesis of phenolic compounds in suspension culture of *Trigonella foenum-graecum* L. during its cultivation. It was shown that the suspension culture is characterized by the typical S-shaped type growth and high viability. Predominant types of fractions are single cells and small aggregates. The suspension culture accumulates phenolic compounds, mainly phenolic acids, throughout the growth cycle.

*Keywords:* fenugreek, *Trigonella foenum-graecum* L., suspension culture, growth curve, viability, degree of aggregation, phenolic compounds, phenolic acids.

### **Введение**

Использование клеточных культур растений в качестве источника ценных метаболитов может стать реальной альтернативой применения интактным растениям, что обусловлено, в первую очередь, экологичностью такого производства, не-

зависимостью культивирования от климатических условий и вредителей, автоматизацией производственного процесса [5]. Пажитник греческий (*Trigonella foenum-graecum* L.) — известное лекарственное растение, потенциальный источник многих биологически активных веществ, в том числе фенольных соединений [7], являющихся одним из важнейших классов природных биологически активных веществ. Обширный спектр терапевтических активностей при низкой токсичности даже при длительном использовании позволяет применять данные метаболиты в медицине в качестве действующих компонентов лекарственных средств [2]. Разработка технологии получения полифенолсодержащего комплекса пажитника греческого на основе культуры клеток *in vitro* представляется весьма перспективной задачей. Важным этапом исследования клеточных культур является изучение особенностей роста и накопления ими биологически активных соединений. Эти данные позволяют определить оптимальные сроки выращивания культур и установить каким образом изменяется их биосинтетический потенциал в ходе выращивания, поскольку активность синтетических процессов в культивируемых *in vitro* клетках может значительно варьировать на разных стадиях роста [4].

В этой связи целью представленной работы явилось исследование динамики роста и накопления фенольных соединений в ходе ростового цикла суспензионной культуры пажитника греческого.

### **Материал и методы исследования**

Объектом изучения служила суспензионная культура пажитника греческого, инициированная из гетеротрофного каллуса листового происхождения пажитника ярового сорта Ovarі 4 [8]. Для инициации суспензионной культуры помещали 6—7 г свежей рыхлой массы каллусных клеток в колбу на 500 мл с 200 мл стерильной жидкой питательной среды [3], соответствующей по составу среде, используемой для выращивания данной каллусной ткани. Среда, минеральная основа которой соответствовала среде Мурасиге и Скуга, дополняли регуляторами роста: 1,0 мг/л 2,4-дихлорфеноксисукусной кислоты, 2,0 мг/л кинетина и 2,0 мг/л индоллил-3-уксусной кислоты [8]. Суспензию культивировали в темноте при комнатной температуре на круговой качалке со скоростью 100—120 об/мин [3].

Определение ростовых и биосинтетических показателей суспензионной культуры пажитника греческого проводили на 4-е, 7-е, 11-е, 14-е, 18-е, 21-е, 24-е, 28-е сутки культивирования. Для получения кривой роста рассчитывали индекс роста культуры на разных этапах ростового цикла [6]. Определение степени агрегированности и жизнеспособности суспензии проводили после ее окрашивания нейтральным красным [3]. Рассчитывали процентное содержание различных фракций: одиночных клеток, мелких агрегатов (2—5 клеток), средних агрегатов (6—20 клеток), крупных агрегатов (21—50 клеток). Для каждого типа фракций

определяли процент живых (окрашенных в красный цвет) клеток и агрегатов. Общее содержание фенольных соединений и фенолкарбоновых кислот в суспензии клеток определяли в 70 % водно-спиртовых экстрактах методами Фолина-Чокальтеу [10] и прямой спектрофотометрии [1] соответственно.

Измерения проводили на протяжении трех пассажей. Все результаты обработаны статистически. Данные на графиках представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка средней.

### Результаты исследования и их обсуждение

Одной из важнейших характеристик роста клеточных культур, позволяющих оценить активность ростовых процессов на разных этапах выращивания и определить ее оптимальную продолжительность, является кривая ростового цикла. Из графика, представленного на рис. 1, видно, что латентная фаза роста суспензионной культуры пажитника греческого длилась до 4-х суток выращивания. С 5-х суток наблюдалось резкое повышение ростовой активности культуры, что свидетельствовало о переходе в логарифмическую фазу роста, продолжающуюся вплоть до 18-х суток, после чего рост суспендированных клеток замедлялся. После фазы замедления роста, продолжавшейся в течение 3-х суток, следовала стационарная фаза, где изменения массы клеток были незначительными.

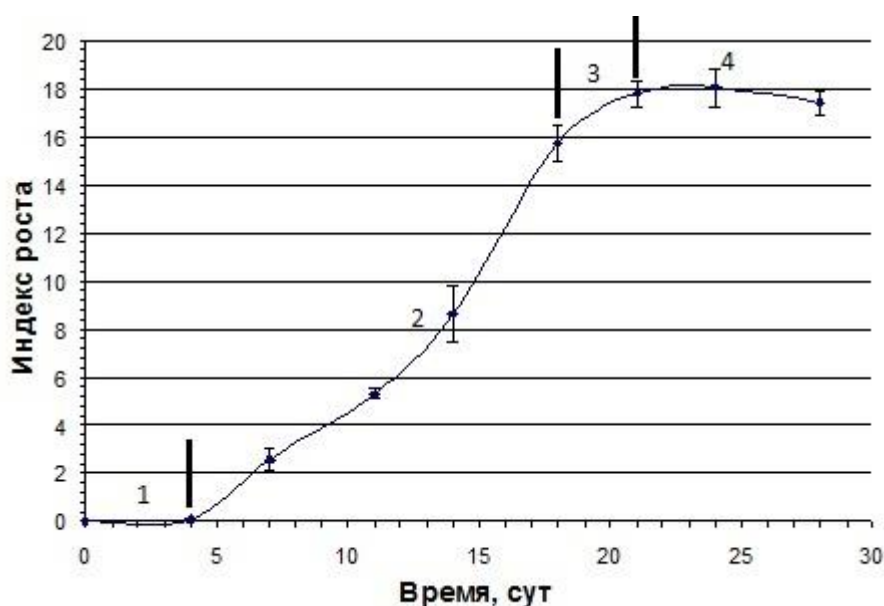


Рисунок 1 — Кривая роста суспензионной культуры пажитника греческого. Фазы роста: 1 — латентная, 2 — логарифмическая, 3 — замедления, 4 — стационарная

Кроме изучения динамики накопления биомассы, важным этапом исследования суспензионных культур является описание их морфофизиологических особенностей, в частности изменение степени их агрегированности, жизнеспособности и морфологии в ходе ростового цикла.

Из диаграмм, представленных на рис. 2, видно, что на протяжении роста суспензионной культуры преобладали одиночные клетки и мелкие агрегаты. Процентное содержание первых от общего числа фракций составляло 56 % в начале ростового цикла (4-е сутки). К 21-м суткам культивирования их количество уменьшилось до 37 %, но уже на 24-28-е сутки число одиночных клеток было сопоставимо с исходным уровнем, наблюдаемым в ходе латентной фазы. Процентное содержание мелких агрегатов от суммы всех типов фракций в ходе ростового цикла варьировало в относительно меньших пределах: возрастало от 26 % на 4-е сутки до 37 % на 14-е сутки культивирования, после чего снижалось до 31 %. Содержание средних агрегатов в культуре возрастало от 6 % на 4-е сутки до 18 % на 21-е сутки, после чего вплоть до 28-х суток выращивания изменялось несущественно. Тогда как процент крупных агрегатов от общего числа фракций повышался от 1,5 % в ходе латентной фазы роста (4-е сутки) до 7 % к 18-м суткам, но далее снижался до 0,4 % (28-е сутки).

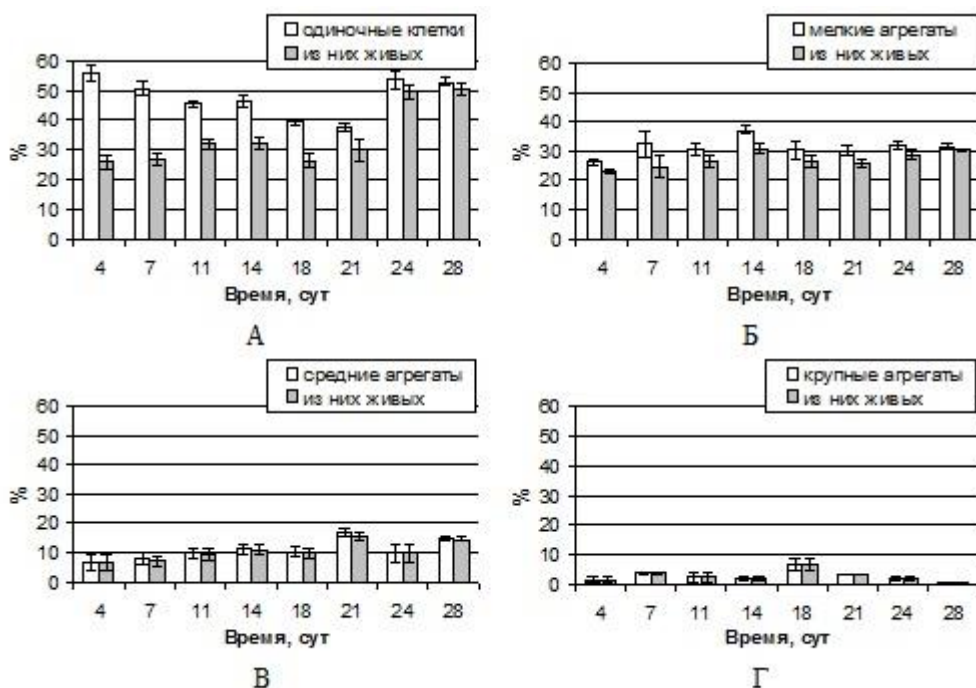
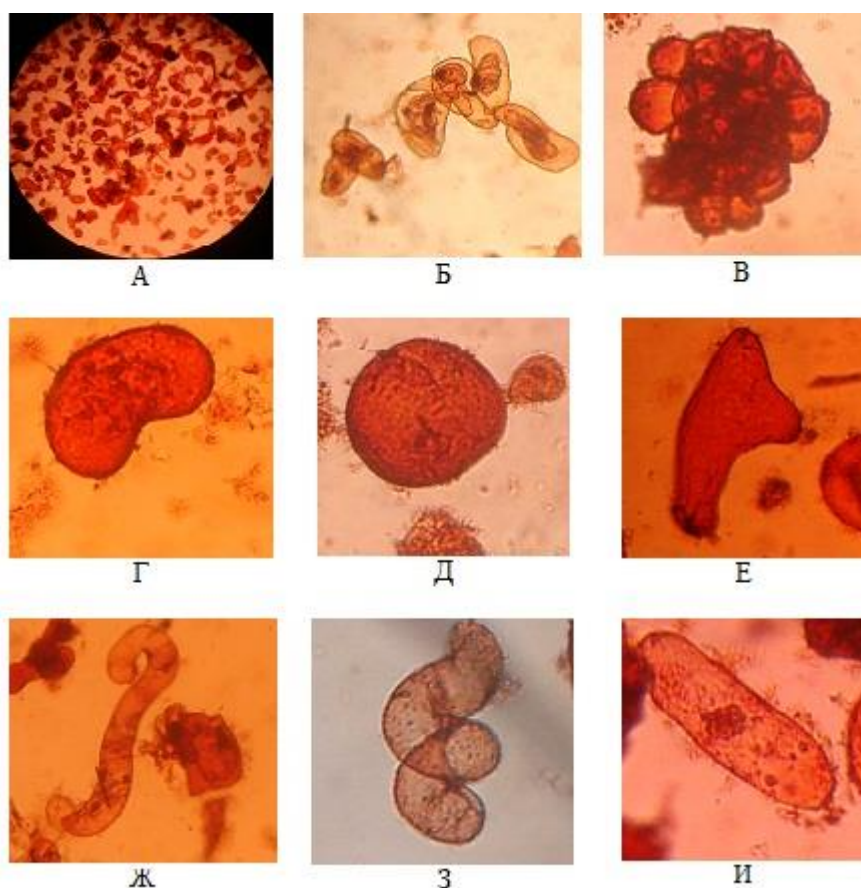


Рисунок 2 — Процентное содержание различных фракций клеток в ходе ростового цикла суспензионной культуры пажитника греческого:  
 А — одиночные клетки, Б — мелкие агрегаты, В — средние агрегаты, Г — крупные агрегаты

Анализ жизнеспособности культуры показал, что количество живых одиночных клеток в ходе латентной фазы (4-е сутки) ростового цикла составляло менее половины от их общего числа. Однако в процессе роста культуры процентное содержание живых одиночных клеток возрастало, что связано с их активным размножением в ходе экспоненциальной фазы. В итоге, во время стационарной фазы роста (24—28-е сутки) практически все одиночные клетки, присутствующие на тот момент в культуре, были живыми. Жизнеспособность всех типов агрегатов на протяжении роста культуры была высокой и изменялась незначительно.

Изучение морфологии суспендированных клеток пажитника греческого показало, что в культуре преобладали клетки округлой и неправильной формы, часто находящиеся в скоплениях по 6—8 клеток (рис. 3). Также встречались одиночные крупные клетки червеобразной, круглой, спиралевидной, овальной и бобовидной формы. Необходимо отметить, что перечисленные выше типы клеток присутствовали в суспензии клеток на всех этапах ростового цикла.



*Рисунок 3 — Морфология суспендированных клеток пажитника греческого: А — общий вид окрашенных клеток; Б — скопление клеток овальной и неправильной формы; В — средний агрегат, состоящий из клеток округлой формы; Г — бобовидная клетка; Д — гигантская круглая клетка;*

*Е* — клетка неправильной формы; *Ж* — червеобразная клетка;  
*З* — спиралевидная клетка; *И* — клетка овальной формы

Представленные результаты свидетельствуют о том, что ростовая кривая суспензионной культуры пажитника греческого имеет стандартную S-образную форму. Оптимальный срок выращивания данной культуры составляет от 21-х до 24-х суток. Показано, что в суспензионной культуре на всем протяжении роста преобладающими типами фракций являются одиночные клетки и мелкие агрегаты. В целом жизнеспособность культуры высокая и возрастает к стационарной фазе роста.

Ранее нами было показано, что основу полифенольного комплекса каллусных культур пажитника греческого составляют фенолкарбоновые кислоты [9]. Мы предположили, что суспензионная культура, инициированная из каллусной ткани пажитника греческого, может сохранить способность к преимущественному накоплению фенолокислот. В этой связи следующим этапом нашего исследования было определение динамики изменения общего содержания соединений фенольной природы и в частности фенолкарбоновых кислот в суспензии клеток пажитника греческого, и выявление связи между указанными биохимическими характеристиками.

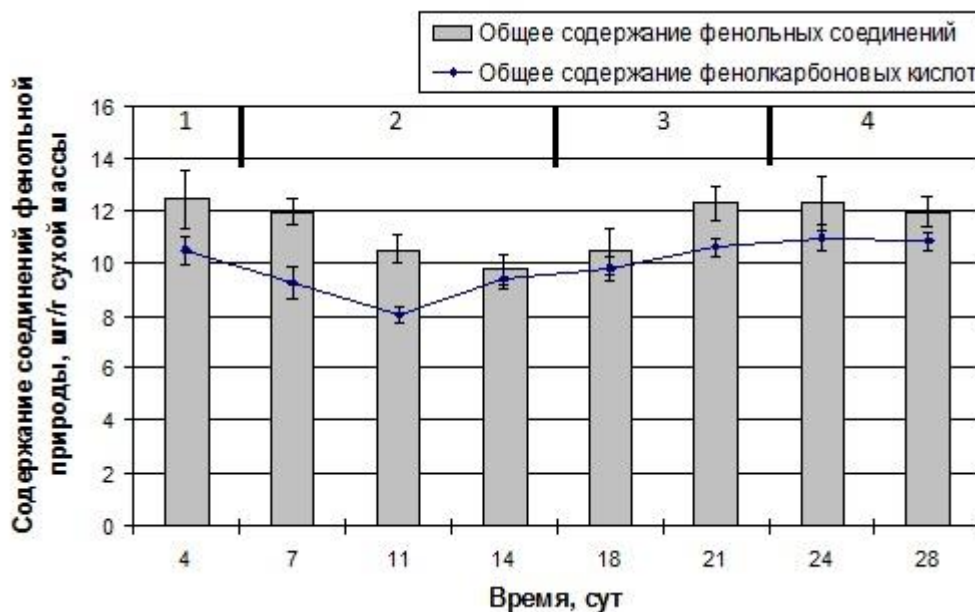


Рисунок 4 — Динамика накопления фенольных соединений и фенолкарбоновых кислот в ходе ростового цикла суспензионной культурой пажитника греческого. Фазы роста: 1 — латентная, 2 — логарифмическая, 3 — замедленная, 4 — стационарная



Показано, что общее содержание фенольных соединений в ходе латентной и начальной логарифмической фазах роста суспензионной культуры изменялось незначительно (рис. 4). К 11-м суткам уровень накопления полифенолов снизился и оставался практически неизменным до 18-х суток выращивания. Переход суспензии клеток в стационарную стадию ростового цикла (24-е сутки) сопровождался интенсификацией синтеза метаболитов до уровня, демонстрируемого на 4—7-е сутки культивирования. Что же касается фенолкарбоновых кислот, то к 11-м суткам ростового цикла культуры происходило снижение уровня их накопления, так же, как и содержание полифенолов в целом. Однако уже к 14-м суткам культивирования наблюдалось повышение активности биосинтеза фенолокислот, так, что к 24-м суткам их содержание существенно не отличалась от начального значения данного показателя.

Исходя из вышепредставленных данных, можно заключить, что в суспензии клеток пажитника греческого фенольные соединения накапливаются на протяжении всего ростового цикла, причем нет достоверных различий между содержанием данных метаболитов на начальных этапах ростового цикла (4-е сутки) и в ходе стационарной фазы роста (21—28-е сутки). Снижение интенсивности образования фенольных соединений, наблюдаемое в процессе логарифмической фазы ростового цикла, вероятно, является следствием активного наращивания биомассы суспендированных клеток, что приводит к торможению синтеза вторичных метаболитов фенольной природы [4].

Анализ изменения содержания фенольных соединений и фенокарбоновых кислот в суспензии клеток пажитника греческого в ходе ее ростового цикла позволяет судить о наличии положительной связи между данными биохимическими показателями. Для оценки взаимосвязи был определен коэффициент корреляции Пирсона. Установлена прямая, сильная и достоверная связь между исследуемыми параметрами:  $r_{xy} = 0,66$ ,  $p > 95\%$ . Так, с вероятностью безошибочного прогноза больше 95 % характер изменения содержания фенолкарбоновых кислот в суспензионной культуре пажитника греческого на разных стадиях роста соответствует характеру динамики накопления фенольных соединений в целом. Таким образом, в изучаемой нами суспензии клеток на всех этапах ее ростового цикла именно фенолкарбоновые кислоты составляют основную долю полифенольного комплекса.

## **Заключение**

Представленные результаты свидетельствуют о том, что суспензионная культура пажитника греческого характеризуется высокой жизнеспособностью и продуктивностью по биомассе, а также способностью на всём протяжении ростового цикла синтезировать соединения фенольной природы, основную долю которых составляют фенолкарбоновые кислоты. Это позволяет рассматривать ее как пер-

спективный альтернативный источник получения физиологически активных веществ фенольной природы в промышленных масштабах.

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

### Список литературы

1. Гаврилин М. В., Попова О. И., Губанова Е. А. Фенольные соединения надземной части шалфея мускатного (*Salvia sclarea* L.), культивируемого в Ставропольском крае // Химия растительного сырья. 2010. Вып. 4. — С. 99—104.
2. Георгиевский В. П., Комиссаренко П. Ф., Дмитрук С. Е. Биологически активные вещества лекарственных растений / Новосибирск. Наука, Сиб. отд-ние. 1990. — 333 с.
3. Дитченко Т. И. Культура клеток, тканей и органов растений: методические рекомендации к лабораторным занятиям / Мн. БГУ. 2007. — 22 с.
4. Калинин Ф. Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Киев. Наук. думка. 1980. — 448 с.
5. Chawla H. S. Introduction to plant biotechnology (2nd ed.) / Enfield. Science Publishers. 2002. — 538 p.
6. Godoy-Hernandez G., Vazquez-Flota F. A. Growth measurements: estimation of cell division and cell expansion // Plant Cell Culture Protocols. Series: Methods in Molecular Biology. 2006. V. 318 (2). — P. 51—58.
7. Kaviarasan S., Naik G. H., Gangabhagirathi R., Anuradha C. V., Priyadarsini K. I. In vitro studies on antiradical and antioxidant activities of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds // Food Chemistry. 2007. V. 103. — P. 31—37.
8. Lohvina H. O., Makai S., Ditchenko T. I., Reshetnikov V. N., Spiridovich E. V., Yurin V. M. Induction of callus from leaves and stems of *Trigonella foenum-graecum* varieties // Acta Agronomica Óváriensis. 2012. V. 54 (2). — P. 29—37.
9. Lohvina H. O., Yurin V. M. Phenolics and antioxidant potential of fenugreek cell cultures // Book of Abstracts of The 17th International Pushchino School Conference of Young Scientist «Biology — The Science of The XXI Century», Pushchino, Russia. April 21—26th. 2013. — P. 384—385.
10. Slinkard K., Singleton V. L. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods // American journal of enology and viticulture. 1977. V. 28. — P. 49—55.