

Антс ТОХВЕР, Юлле РЕЙН

УДК 581.1

ОБРАЗОВАНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В КУЛЬТУРЕ ТКАНИ ГРЕЧИХИ *FAGOPYRUM ESCULENTUM* MOENCH

Культуру клеток и тканей высших растений, которая представляет собой относительно однородную популяцию, можно рассматривать как удобную модель для изучения различных биосинтезов, их регуляции и взаимосвязи на клеточном уровне. В культуре клеток и тканей отсутствуют сложные системы взаимодействий, наблюдаемые между органами и дифференцированными тканями интактного растения. Кроме того, можно избежать также осложнений, связанных с процессами морфогенеза. Клетки в культуре растут в стерильных условиях в контролируемой среде, и их можно ввести в непосредственный контакт с различными веществами. Клеточные и тканевые культуры уже нашли весьма широкое применение при изучении различных аспектов биосинтеза и метаболизма флавоноидов и родственных соединений (Skoog, Montaldi, 1961; Fritig и др., 1970; Grisebach, Hahlbrock, 1974; Hahlbrock, 1976).

В лаборатории вторичного обмена Института экспериментальной биологии получен обширный материал по регуляции биосинтеза и катаболизма флавоноидов в проростках гречихи (Margna и др., 1973, 1974; Маргна, Вайнъярв, 1976; Margna, 1977). В связи с вышеуказанными преимуществами тканевой культуры было бы перспективным использовать ее в аналогичных исследованиях в качестве модельного объекта. В литературе отсутствуют сведения о введении в культуру тканей гречихи (*Fagopyrum esculentum* Moench). Задачей настоящей работы было получение каллусных культур разных органов гречихи и предварительное изучение образования фенольных соединений в них.

Методика

Для получения первичного каллуса из конуса нарастания стебля и семядолей 5—6-дневного этиолированного проростка использовалась модифицированная среда О. Л. Гамборга PRL-4-C (Gamborg, 1966), состав которой приведен ниже.

Макросоли	мг/л	Физиологически активные вещества и витамины	мг/л
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	90	Никотиновая кислота	1,0
Na_2HPO_4	30	Тиамин HCl	10,0
KCl	300	Пиридоксин HCl	1,0
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	200	Миоинозит	100,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250	2,4-Д	2,0
KNO_3	1000	Кинетин	1,0
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	150		

Микросоли

KJ	0,75	Сахароза	30 000
MnSO ₄ ·H ₂ O	10,0	Гидролизат казеина	1 000
H ₂ BO ₃	3,0	Агар	6 000
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	3,0		
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25		
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,25		
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,25		
Na ₂ EDTA	18,6		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	13,9		

Дальнейшие пересадки каллуса (вес трансплантата 0,5 г) проводили на той же среде. Ткань выращивали в 100-миллилитровых конических колбах (объем питательной среды 40 мл) при 26 °С и 80%-ной влажности воздуха, в темноте.

Для определения прироста биомассы и содержания фенольных соединений использовали каллусную ткань 6-го пассажа. Опыты проводили в течение 36 дней. Начиная с 3-го дня выращивания колбы с каллусом делили на две группы: одну часть оставляли в темноте, а другую переносили на свет (люминесцентные лампы ЛДЦ-20, 30 Вт/м²). Остальные условия выращивания в обоих вариантах опыта были одинаковыми. Пробы ткани брали из 4—6 колб. Определяли сырой и сухой вес. Сухой вес здесь — вес ткани, высушенной лиофильно, а затем дополнительно в эксикаторе над CaCl₂ в течение 3 сут.

Фенольные соединения извлекали 96%-ным этанолом из сухого порошка ткани при комнатной температуре. Сумму фенольных соединений определяли с помощью реактива Фолина-Дениса. Калибровочную кривую строили по хлорогеновой кислоте. Содержание лейкоантоцианов определяли по У. С. Говиндараяну и А. М. Матю (Govindarajan, Mathew, 1965; Margna, и др., 1975) с использованием значения $2,7 \cdot 10^7$ см²/моль для удельного коэффициента экстинкции цианидина (Jurd, Asen, 1966). Все определения проведены в 3 повторностях.

Результаты и обсуждение

Во время опытов были сделаны многочисленные попытки получить каллусные культуры из разных органов и частей как взрослого растения, так и молодого проростка с применением нескольких вариантов питательной среды. Первичный каллус получили только из конуса нарастания и из семядольных листочков проростка. В остальных случаях мы, по-видимому, не смогли устранить инфекцию у исходных эксплантатов. В случае семядольных листочков полезным оказалось облучение проростков дальним красным светом ($\lambda > 700$ нм) в течение 1—2 сут для стимулирования роста и их быстрого освобождения от семенной кожуры.

Первичный каллус и каллус первых пересадок конуса нарастания были медленно растущими и гетерогенными с темно-серыми и желтыми участками. Без изменения состава питательной среды и в результате отбора светлых быстрорастущих участков для пересадки получена бледно-желтая гомогенная довольно быстрорастущая ткань. В линейной фазе роста средний прирост сырой биомассы культуры за 24 ч составлял на свету 0,33 и в темноте 0,21 г (рис. 1).

Каллус семядолей развивался примерно в три раза медленнее, отличался темно-серым цветом и имел склонность к органогенезу. Очевидно, для него необходима дальнейшая оптимизация питательной среды.

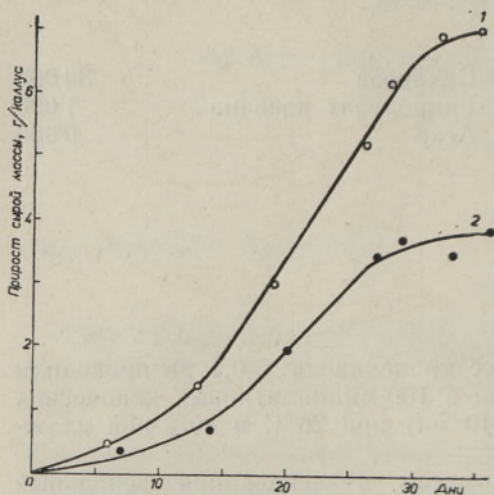


Рис. 1. Кривая роста каллусной ткани конуса нарастания стебля гречихи: 1 — на свету, 2 — в темноте.

Таким образом, основное внимание в настоящей работе было уделено изучению тканевой культуры конуса нарастания.

Свет, как видно из рис. 1, значительно стимулирует прирост биомассы, хотя в литературе часто отмечается его тормозящее действие (Бутенко, 1964; Корецкая, Запрометов, 1975).

Поскольку при освещении не образовалось хлорофилла, то фотосинтез как возможная причина стимуляции роста исключается. В связи с этим представляют интерес данные о действии света на жизнедеятельность растения через фитогормонную систему (Lockhart, 1959; Бутенко, 1964; Black, Vlitos, 1970). Если в данном случае стимулирующее действие света связано с фитогормонами, то, очевидно, определенное значение имеет и состав питательной среды, в первую очередь содержание физиологически активных веществ в ней (Бутенко, 1964).

Параллельно с наблюдениями за ростом проводились определения общего содержания фенольных соединений и содержания антоцианов и лейкоантоцианов в каллусах. Прежде чем приступить к рассмотрению результатов отметим, что набор фенольных соединений у культуры ткани был значительно беднее, чем у интактного растения или его отдельных органов. Так, в семядольных листочках обнаружено 4 гликофлавона, рутин, антоцианы и лейкоантоцианы, дающие при обработке с кислотой цианидин (Magna и др., 1975). В соответствующем каллусе мы обнаружили только лейкоантоцианы и в малом количестве антоцианы. Не было найдено также сложных эфиров кофейной и *n*-кумаровой кислоты, которые наблюдаются во всех органах интактного растения. Нам не известно, образуются перечисленные соединения во всех клетках семядольного листочка или только в каких-то определенных. Например, накопление антоцианов происходит в субэпидермальном клеточном слое. В то же время мы не знаем, какие клетки стали началом нашей культуры, и поэтому не можем сказать, потеряли ли клетки в культуре способность к накоплению этих соединений или это следствие дифференцировки исходных клеток, т. е. эпигенетическая особенность данного штамма.

Сопоставление кинетики содержания фенольных соединений (рис. 2 и 3) с кривой роста каллуса (см. рис. 1) показывает, что количество фенольных соединений на 1 г сухого веса ткани относительно мало зависит от возраста данного каллуса. Значительное повышение содержания фенольных соединений, в том числе и лейкоантоцианов, наблюдается лишь с наступлением замедления роста. После пересадки, наоборот, наблюдается уменьшение содержания фенольных соединений на 1 г сухого веса ткани. Это в основном происходит в первые дни после пересадки и может быть связано с переходом фенольных соединений в питательную среду. Известно, например, что из каллуса табака

фенольные соединения в весьма большом количестве переходят в агаровую среду (Skoog, Montaldi, 1961).

В то время как относительное количество фенольных соединений изменяется сравнительно мало, абсолютное количество их непрерывно возрастает в течение всего цикла выращивания каллуса (см. рис. 3). При выращивании каллуса на свету увеличение абсолютного содержания фенольных соединений является особенно значительным, но отмечается также при расчете на 1 г сухого веса (см. рис. 2 и 3). По окончании опыта в световом варианте абсолютное количество фенольных соединений было примерно в три раза больше, чем в темновом.

Итак, нет однозначного соответствия между скоростью роста ткани и накоплением фенольных соединений в ней. Усиленное накопление фенольных соединений в каллусе в конце цикла выращивания, когда наблюдается замедление роста ткани, и усиленное накопление их на свету, когда происходит ускорение роста ткани, обусловлены, очевидно, разными механизмами. В первом случае представляют интерес данные о взаимосвязи основного, белкового обмена с биосинтезом фенольных соединений. В конце цикла выращивания содержание питательных компонентов, в том числе источников азота, сильно снижается (Hahlbrock, 1975), что, несомненно, влечет за собой и уменьшение биосинтеза белка. Как известно, подавление роста ткани и биосинтеза белка обычно сопровождается усиленным образованием фенольных соединений (Margna, и др., 1974; Margna, 1977). Ускорение роста ткани и накопление фенольных соединений на свету, вероятно, связаны с действием его на регуляторные системы клеток. Известно, что метаболизм и физиологическое действие фитогормонов и некоторых фенольных соединений (т. н. регуляторов роста фенольной природы) тесно переплетены (Кефели, Турецкая, 1977). Установлено также, что свет влияет на биосинтез и обмен как фенольных соединений, так и фитогормонов (Stickland, Sunderland, 1972; Black, Vlitos, 1972; Бутенко, 1964). В то же время

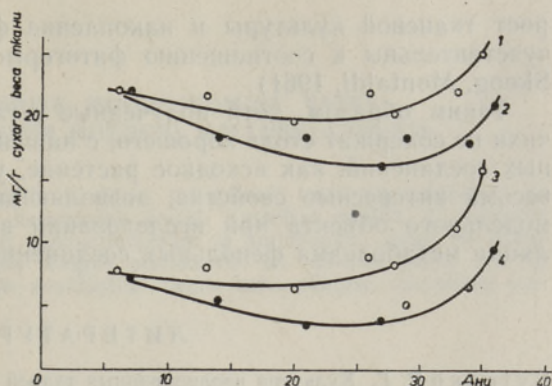


Рис. 2. Изменение содержания фенольных соединений в каллусной ткани конуса нарастания стебля гречихи на свету (1, 3) и в темноте (2, 4). 1, 2 — сумма фенольных соединений, 3, 4 — лейкоантоцианы.

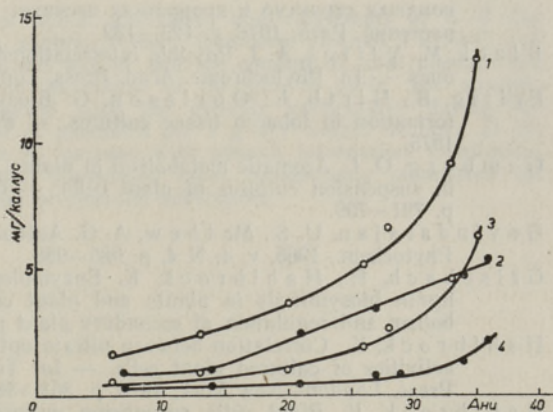


Рис. 3. Изменение абсолютного количества фенольных соединений в одном каллусе конуса нарастания стебля гречихи на свету (1, 3) и в темноте (2, 4). 1, 2 — сумма фенольных соединений, 3, 4 — лейкоантоцианы.

рост тканевой культуры и накопление фенольных соединений весьма чувствительны к соотношению фитогормонов в ткани (Бутенко, 1964; Skoog, Montaldi, 1961).

Таким образом, хотя полученные штаммы тканевой культуры гречихи не содержат столь хорошего, с нашей точки зрения, набора фенольных соединений, как исходное растение, у них все же обнаруживаются весьма интересные свойства, позволяющие применять их в качестве модельного объекта при исследовании вопросов координации и регуляции метаболизма фенольных соединений.

ЛИТЕРАТУРА

- Бутенко Р. Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М., 1964.
- Кефели В. И., Турецкая Р. Х. Природные ингибиторы роста — основные физиологические аспекты действия. — В кн.: Рост растений и природные регуляторы, М., 1977, с. 234—256.
- Корецкая Т. Ф., Запрометов М. Н. Фенольные соединения в культуре ткани чайного растения (*Camellia sinensis*) и влияние света на их образование. — Физиол. растений, 1975, т. 22, вып. 5, с. 941—946.
- Маргна У. В., Вайнъярв Т. Р. О скорости катаболического расщепления флавоноидных структур в проростках гречихи. — В кн.: Регуляция роста и питание растений. Рига, 1976, с. 125—132.
- Black, M., Vlitos, A. J. Possible interrelationships of phytochrome and plant hormones. — In: Phytochrome. Acad. Press, London—New York, 1972, p. 517—550.
- Fritig, B., Hirth, L., Ourisson, G. Biosynthesis of the coumarins: scopoletin formation in tobacco tissue cultures. — Phytochem., 1970, v. 9, N 9, p. 1963—1975.
- Gamborg, O. L. Aromatic metabolism in plants. II. Enzymes of the shikimate pathway in suspension cultures of plant cells. — Canad. J. Biochem., 1966, v. 44, N 5, p. 791—799.
- Govindarajan, U. S., Mathew, A. G. Anthocyanidins from leucoanthocyanidins. — Phytochem., 1965, v. 4, N 4, p. 985—988.
- Grisebach, H., Hahlbrock, K. Enzymology and regulation of flavonoid and lignin biosynthesis in plants and plant cell suspension cultures. — In: Metabolism and regulation of secondary plant products. New York, 1974, p. 1—19.
- Hahlbrock, K. Correlation between nitrate uptake, growth and changes in metabolic activities of cultured plant cells. — In: Tissue culture and plant science. Acad. Press, London—New York, 1975, p. 363—368.
- Hahlbrock, K. Plant cells suspension cultures as a model system for studying coordinated changes in the enzyme activities of flavonoid biosynthesis. — Nova acta Leopold., 1976, Suppl. N 7, p. 311—318.
- Jurd, L., Aсен, S., 1966 (цит. по Margna и др., 1973).
- Lockhart, J. A. The hormonal mechanism of growth inhibition by visible radiation. — In: Plant growth regulation. IV Intern. Conf. Plant Growth Regulation. The Iowa State University Press, Ames, 1959, p. 543—557.
- Margna, U., Laanest, L., Margna, E., Otter, M., Vainjärv, T. The influence of temperature on the accumulation of flavonoids in buckwheat and some other plant seedlings. — ENSV TA Toimet. Biol., 1973, v. 22, N 2, p. 163—175.
- Margna, U., Laanest, L., Margna, E., Otter, M., Vainjärv, T. Sugar effects on the formation of buckwheat flavonoids: some new aspects and concluding remarks. — ENSV TA Toimet. Biol., 1974, v. 23, N 1, p. 19—29.
- Margna, U. Accumulation pattern of flavonoids: quantitative phenomenology and some speculations. — ENSV TA Toimet. Biol., 1977, v. 26, N 4, p. 302—315.
- Skoog, F., Montaldi, E. Auxin-kinetin interaction regulating the scopoletin and scopolin levels in tobacco tissue cultures. — Proc. Natl. Acad. Sci., 1961, v. 47, N 1, p. 36—49.
- Stickland, R. G., Sunderland, N. Photocontrol of growth and of anthocyanin and chlorogenic acid production in cultured callus tissue of *Haplopappus gracilis*. — Ann. Bot. (London), 1972, v. 36, N 147, p. 671—685.

Ants TOHVER, Ülle REIN

**FENOOLSETE ÜHENDITE MOODUSTUMINE TATRA
(*FAGOPYRUM ESCULENTUM* MOENCH) KALLUSKULTUURIS**

Artiklis on käsitletud fenoolsete ühendite sisaldust tatraidandi varre kasvukuhikust ja idulehtedest saadud kalluskultuurides kasvutsükli kestel. Katsetest nähtub, et kallustes leidub flavonoidsetest ühenditest ainult leukoantotsüaani ja antotsüaani, seega on nende valik tunduvalt väiksem kui idandites. Valgus stimuleerib nii kalluste kasvu kui ka fenoolsete ühendite akumulatsiooni. On analüüsitud nende kahe nähtuse võimalikke seoseid ja põhjusi.

Ants TOHVER, Ülle REIN

**PHENOLIC PRODUCTION IN CULTURED CALLUS TISSUES OF
BUCKWHEAT (*FAGOPYRUM ESCULENTUM* MOENCH)**

Callus was initiated from explants of apical meristems and cotyledons of 5–6 day old etiolated buckwheat seedlings on slightly revised Gamborg medium PRL-4-C and subcultured on the same medium. The wet weight and the content of total phenols and leucoanthocyanidins was determined in the course of the growth cycle. The absolute amount of phenolic substances increased with the growth, particularly during the phase of retarded growth. The content of phenolics per 1 g dry weight declined at the outset of the growth cycle and began to increase with growth retardation. Continuous illumination of $30 \text{ Jm}^{-2}\text{s}^{-1}$ with white fluorescent tubes considerably stimulated the growth of calluses and the accumulation of phenolic substances.