

ВОЗДЕЙСТВИЕ УФ-Б ЛУЧЕЙ НА *IN VITRO* КУЛЬТУРЫ ЛЬНА-ДОЛГУНЦА И НАКОПЛЕНИЕ В НИХ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Е.А. Гончарук

к.б.н., ст. науч. сотрудник,
Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук (Москва)
E-mail: goncharuk.ewgenia@yandex.ru

Л.В. Назаренко

к.б.н., доцент,
ГАОУ ВО Московский городской педагогический университет, Институт естествознания и спортивных технологий (Москва)
E-mail: nlv.mgpu@mail.ru

Н.В. Загоскина

д.б.н., профессор,
Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук (Москва)
E-mail: biophenol@gmail.com

Изучено воздействие УФ-Б лучей на физиолого-биохимические характеристики штаммов каллусных культур, инициированных из проростков двух сортов льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.), контрастных по устойчивости к стрессовым воздействиям. Выявлены изменения в морфологии каллусов. Отмечено увеличение содержания в них фенольных соединений. Исходя из полученных данных, можно рекомендовать использовать выращивание клеточных культур растений в условиях действия УФ-Б лучей как потенциальных «кандидатов» для повышения накопления в них фенольных соединений – биологически активных веществ с антиоксидантной активностью.

Ключевые слова: лен-долгунец, *Linum usitatissimum* L., каллусная культура, УФ-Б лучи, фенольные соединения.

Для цитирования: Гончарук Е.А., Назаренко Л.В., Загоскина Н.В. Воздействие УФ-Б лучей на *in vitro* культуры льна-долгунца и накопление в них фенольных соединений. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2019;22(10):37–41. <https://doi.org/10.29296/25877313-2019-10-06>

Одним из важных аспектов сохранения жизнедеятельности растений является их устойчивость к стрессовым воздействиям, в том числе коротковолновому ультрафиолетовому излучению (УФ-Б). Установлено, что данная область солнечной радиации (280–320 нм) оказывает воздействие на их рост и развитие, формирование листового аппарата, гормональный статус, а также биосинтез фенольных соединений [1].

Фенольные соединения относятся к веществам вторичного метаболизма, которые наиболее распространены в растительных тканях. Для них характерна полифункциональность, высокая биологическая активность, а также способность ингибировать реакции, протекающие по свободно-радикальному механизму, характерному для клеток, находящихся в стрессовых условиях [3]. Кроме того, известно, что фенилпропаноиды и флавоноиды защищают фотосинтетический и генетический аппараты клеток от повреждения коротковолновым УФ-Б излучением [4]. Однако полученные данные о его регуляторном действии на фенольный метаболизм растений до сих пор фрагментарны.

Биотехнологические подходы, в том числе использование культур клеток и тканей, сохраняющих в условиях *in vitro* многие свойства интактных растений, открывают большие перспективы в изучении регуляторных и антиоксидантных функций растительного организма [5]. Именно они не только дают возможность изучить механизмы регуляции отдельных метаболических процессов, но и получать ценные вторичные растительные метаболиты [6].

Биологически ценной и перспективной культурой является лен долгунец (*Linum usitatissimum* L.), который относится к растениям широкого спектра применения. Его уникальной особенностью является образование различных фенольных соединений, в том числе лигнанов – веществ, проявляющих высокую биологическую активность и используемых в фармакологии [7]. Преимущественными направлениями работ с *in vitro* культурами льна являются исследования по соматическому эмбриогенезу, клональному микроразмножению, получению трансгенных растений и ряд других направлений [8]. Однако малоизвестно об их ответных реакциях на УФ-Б излучение.

Цель работы – изучение воздействия УФ-Б лучей на морфофизиологические характеристики контрастных по устойчивости к стрессовым воздействиям штаммов каллусных культур льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.) и накопление в них фенольных соединений.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили два штамма каллусных культур льна долгунца (*Linum usitatissimum* L.) сортов Ленок и Славный 82 (ЛН и СЛ соответственно), контрастных по устойчивости. Сорт Ленок относился к высоковолокнистым культурам, устойчивым к полеганию и фитопатогенам, а сорт Славный 82 – к низковолокнистым и менее устойчивым к стрессовым воздействиям [9]. Для получения стерильных проростков семена обрабатывали 0,1%-ным раствором сулемы (8 мин), промывали стерильной дистиллированной водой (3 раза) и помещали на агаризованную питательную среду Мурасиге–Скуга без регуляторов роста и содержащую сахарозу (2%). Для получения каллусной ткани гипокотили 10-дневных стерильных проростков помещали на питательную среду Мурасиге–Скуга, содержащую сахарозу (2%) и 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (1 мг/л). Каллусные культуры льна выращивали в факторостатной камере (Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Россия) при температуре 25 °С, относительной влажности воздуха 70% и 16-часовом фотопериоде (интенсивность освещения 5000 лк). Длительность пассажа составляла 30 дней.

При проведении опытов каллусные культуры льна подвергали действию УФ-Б лучей, используя лампу ДРЛФ-400 с удаленной внешней колбой (эквивалент бактерицидной ртутной лампы высокого давления типа ПРК-2). Интенсивность облучения составляла 0,74 Вт/м² по УФ-Б, время облучения – два часа ежедневно (с 16:00 до 18:00), что было подобрано в предварительных экспериментах. Контролем служили каллусы, выращиваемые в стандартных условиях. Для исследования использовали каллусы 30-дневного возраста (конец пассажа).

Оценивали интенсивность роста каллусов и их морфофизиологические характеристики – цвет, плотность и консистенцию.

Содержание воды в каллусах определяли стандартным методом после высушивания до постоянной массы в термостате при температуре 70 °С.

Фенольные соединения извлекали 96%-ным этанолом из замороженного жидким азотом растительного материала. Гомогенат выдерживали при 50 °С, через 45 мин центрифугировали (16000 об/мин, 15 мин) и надосадочную жидкость использовали для спектрофотометрического определения содержания суммы фенольных соединений с реактивом Фолина-Дениса при длине волны 725 нм [10]. Калибровочную кривую строили по рутину.

Эксперименты проводили в 5-кратных биологических и аналитических повторностях. Корреляционный и факторный (ANOVA) анализ осуществляли в программе SigmaPlot. В таблицах представлены средние арифметические значения полученных величин (M) и их стандартные ошибки (\pm SEM). Надстрочные символы обозначают статистическую значимость различий средних значений по тесту Тьюки при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Штаммы каллусных культур льна отличались по морфофизиологическим характеристикам. Каллусы ЛН имели преимущественно светло-зеленый цвет, тогда как каллусы СЛ – светло-бежевый (рис. 1, таблица). Следовательно, для культуры ЛН характерно формирование хлорофилл-содержащих клеток, как это отмечалось и для других каллусных тканей растений, выращиваемых в световых условиях [5]. При этом у обоих штаммов льна наблюдалась одинаковая скорость роста, которая не превышала 150% к концу пассажа.

Таблица. Морфофизиологические характеристики двух штаммов* каллусных культур *Linum usitatissimum*, выращиваемых в нормальных условиях (К) или при действии УФ-Б лучей (УФ)

Показатель	Вариант	Штамм ЛН	Штамм СЛ
Цвет каллуса	К	Светло-зеленый	Светло-бежевый
	УФ	Бежевый, с зелеными участками	Темно-бежевый
Прирост сырой биомассы, %	К	150 \pm 10	140 \pm 8
	УФ	138 \pm 7	124 \pm 6
Содержание воды, %	К	92,83 \pm 0,98	94,31 \pm 0,39
	УФ	91,93 \pm 0,17	91,14 \pm 0,28

Примечание: * – штамм ЛН и СЛ получен из льна долгунца сортов Ленок и Славный 82 соответственно.

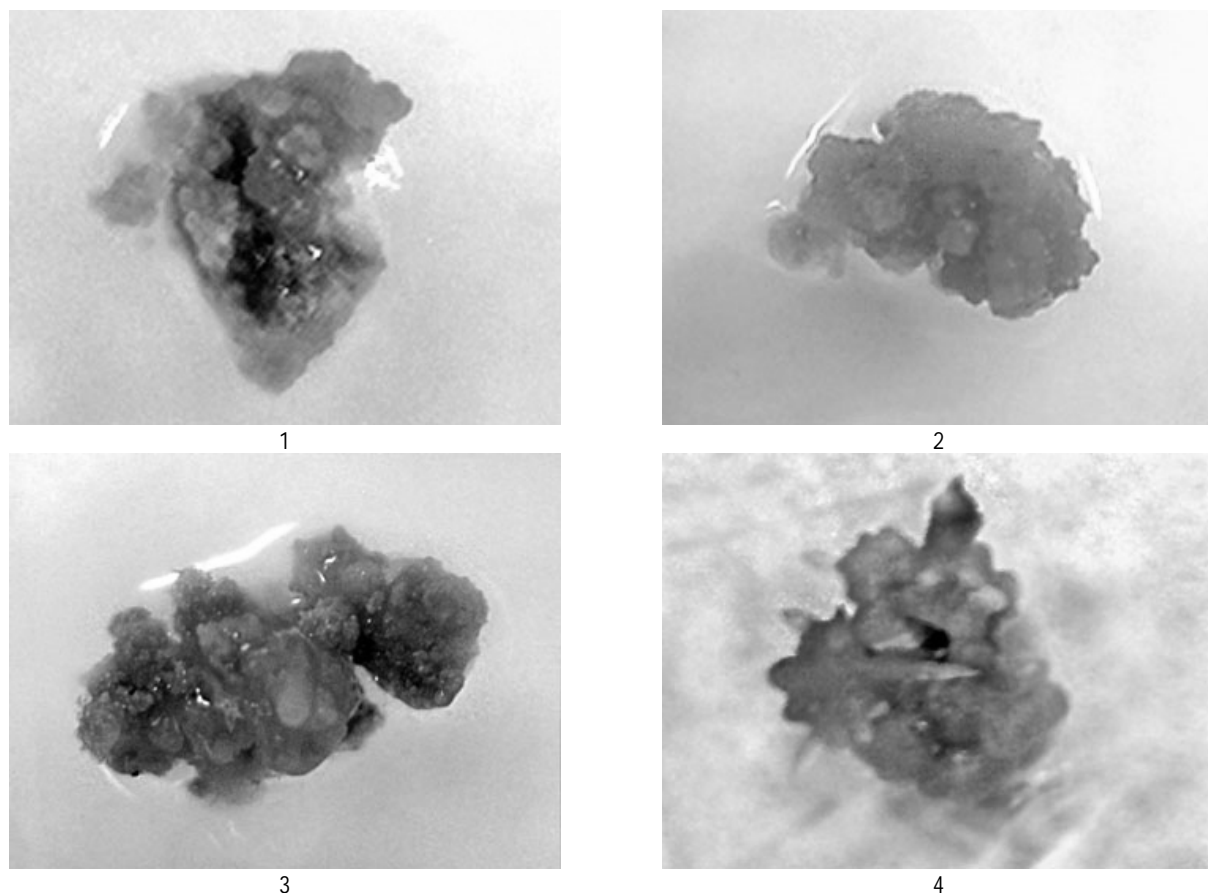


Рис. 1. Внешний вид двух штаммов каллусных культур, полученных из сортов льна-долгунца Ленок (1 и 3) и Славный 82 (2 и 4) и растущих в нормальных условиях (1 и 2) или при действии УФ-Б лучей (3 и 4)

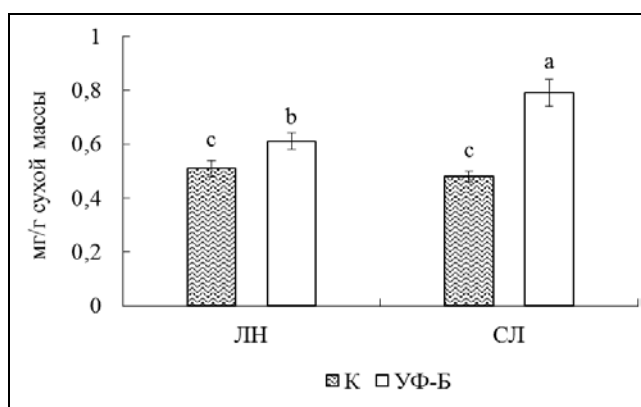


Рис. 2. Содержание фенольных соединений в двух штаммах каллусных культур, полученных из сортов льна-долгунца Ленок (ЛН) и Славный 82 (СЛ) и растущих в нормальных условиях (К) или при действии УФ-Б лучей (УФ-Б)

Воздействие УФ-Б лучей на культуры льна приводило к изменениям их морфологических характеристик (рис. 2). У каллуса ЛН уменьшалось формирование хлорофилл-содержащих клеток и, как следствие, его цвет становился зеленовато-бежевым. Каллус СЛ приобретал темно-бежевый

цвет. В обоих случаях на поверхности каллусов отмечалось формирование некротизованных участков с клетками темно-коричневого цвета, изменялась и плотность каллусных тканей. Они становились более рыхлыми по сравнению с контрольными вариантами, что в большей степени было выражено у культуры СЛ. Следует также отметить незначительное снижение прироста обеих культур – на 10–13% по сравнению с контролем.

Важным показателем *in vitro* выращиваемых клеток и тканей растений является определение содержания в них воды. Оно было практически равным у обоих штаммов, хотя для культуры СЛ можно отметить тенденцию к его более высоким значениям (см. таблицу). При действии УФ-Б лучей содержание воды в каллусах ЛН и СЛ также было одинаковым, но более низким, чем в контрольных вариантах (более выражено у каллуса СЛ).

Результаты исследования свидетельствуют о том, что в условиях действия УФ-Б лучей в культурах льна долгунца происходит незначительное подавление роста, изменение структуры и морфо-

логии клеток. Более выраженная ответная реакция на стрессовое воздействие характерна для клеток СЛ по сравнению с ЛН. Это может свидетельствовать о том, что при введении клеток и тканей интактных растений в культуру *in vitro* «специфика» их метаболических процессов сохраняется [5].

Ответные реакции растений на абиотические стрессы являются динамическими и сложными. К их числу относится образование соединений фенольной природы, ответственных за защиту клеток от повреждающего действия негативных факторов окружающей среды [2, 11]. Исследование накопления этих вторичных метаболитов в двух штаммах каллусных культур льна, выращиваемых в нормальных условиях, показало одинаковый их уровень (рис. 2). Это свидетельствует об отсутствии различий в образовании фенольных соединений у этих культур. Иная тенденция наблюдается при действии на них стрессового фактора (УФ-Б радиации).

При действии УФ-Б лучей в двух штаммах каллусных культур льна отмечалось увеличение содержания фенольных соединений. У каллуса ЛН на 20% по сравнению с контролем, у каллуса СЛ – почти на 200%. Столь значительные различия в их ответной реакции на уровне фенольного метаболизма могут быть следствием «уровня» исходной стресс-устойчивости сортов льна долгунца. Так, у культуры СЛ, инициированной из менее устойчивого генотипа льна, активация образования фенольных соединений проявляется в значительно большей степени, чем у культуры ЛН, инициированной из высокоустойчивого генотипа. О «зависимости» ответа клеток растений на стрессовое воздействие от их генетических характеристик сообщалось в литературе [4, 9].

Увеличение содержания фенольных соединений при действии УФ-Б лучей может быть обусловлено активацией биосинтеза фенилпропаноидов, служащих предшественниками при образовании лигнанов – вторичных метаболитов, характерных для растений льна [12]. Все эти соединения являются важными антиоксидантами, защищающими клетки растений от активных форм кислорода, количество которых значительно возрастает при действии такого стрессового фактора, как УФ-Б лучей [4, 11].

Выводы

В каллусных культурах льна-долгунца в ответ на действие УФ-Б излучения происходит активация процессов адаптации. Это отражается на их

морфофизиологических характеристиках и сопровождается повышением содержания фенольных соединений, характеризующихся адаптогенной активностью и защищающих клетки растений от активных форм кислорода, количество которых значительно возрастает в стрессовых условиях. Все эти изменения в большей степени проявляются у культуры, полученной из растений сорта льна долгунца с пониженной стресс-устойчивостью.

Исходя из этих данных, можно рекомендовать использовать выращивание клеточных культур растений в условиях действия УФ-Б лучей как потенциальных «кандидатов» для повышения накопления в них фенольных соединений – биологически активных веществ с антиоксидантной активностью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dotto M., Casati P. Developmental reprogramming by UV-B radiation in plants // *Plant Science*. 2017. V. 264. P. 96–101.
2. Запрометов М.Н. Фенольные соединения: распространение, метаболизм и функции в растениях. М.: Наука. 1993. 272 с.
3. Bidel L.P., Coumans M., Baissac Y., Doumas P., Jay-Allemand C. Biological activity of phenolics in plant cells // *Recent advances in polyphenol research*. United Kingdom: Blackwell Publishing Ltd. 2010. V. 2. P. 163–205.
4. Santin M., Lucini L., Castagna A., Rocchetti G., Hauser M.T., Ranieri A. Comparative “phenol-omics” and gene expression analyses in peach (*Prunus persica*) skin in response to different postharvest UV-B treatments // *Plant physiology and biochemistry*. 2019. V. 135. P. 511–519.
5. Бутенко П.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М.: ФБк-Пресс. 1999. 160 с.
6. Nosov A.M. Application of cell technologies for production of plant-derived bioactive substances of plant origin // *Applied biochemistry and microbiology*. 2012. V. 48. P. 609–624.
7. Толкачев О.Н., Жученко А.А.-мл. Биологически активные вещества льна: использование в медицине и питании // *Химико-фармацевтический журнал*. 2000. № 7. С. 23–28.
8. Тутюк В.В., Лемеш В.А., Хотылева Л.В. Лен культурный. Классификация, ботаническая и хозяйственная характеристика, генетика, физиология, биохимия и биотехнология. Saarbrücken: LAP LAMBERT Academic Publishing. 2012. 268 с.
9. Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию. Т. 1. Сорта растений <https://reestr.gossort.com/reestr>.
10. Zagoskina N.V., Goncharuk E.A., Alyavina A.K. Effect of cadmium on the phenolic compounds formation in the callus cultures derived from various organs of the tea plant // *Russian Journal of Plant Physiology*. 2007. V. 54. P. 237–243.
11. Mierziak J., Kostyn K., Kulma A. Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment // *Molecules*. 2014. V. 19. P. 16240–16265.
12. Ahmad W., Zahir A., Nadeem M., Garros L., Drouet S., Renouard S., Abbasi B.H. Enhanced production of lignans and neolignans in chitosan-treated flax (*Linum usitatissimum* L.) cell cultures // *Process biochemistry*. 2019. V. 79. P. 155–165.

Поступила 16 августа 2019 г.

UV-B RAYS ACTION ON FLAX CULTURE *IN VITRO* AND THE ACCUMULATION OF PHENOLIC COMPOUNDS IN THEM

© Authors, 2019

E.A. Goncharuk

Ph.D. (Biol.), Senior Research Scientist,
K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology Russian Academy of Sciences (IPP RAS, Moscow)
E-mail: goncharuk.ewgenia@yandex.ru

L.V. Nazarenko

Ph.D. (Biol.), Associate Professor, Moscow City University, Institute of Natural Sciences and Sports Technologies (MGPU, Moscow)
E-mail: nlv.mgpu@mail.ru

N.V. Zagorskina

Dr.Sc. (Biol.), Professor, K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology Russian Academy of Sciences (IPP RAS, Moscow)
E-mail: biophenol@gmail.com

The flax possesses the ability to biosynthesis of secondary metabolites, including phenolic compounds, which have high biological activity. Methods of biotechnology allow us to research the influence of various stressors on plants. The aim of the work was to study the effect of UV-B rays on the morphophysiological characteristics of the contrast resistance to stress strains of callus cultures of flax (*Linum usitatissimum* L.) and the accumulation of phenolic compounds in them.

A feature of callus was evaluated by morphological characteristics and water content. Phenolic compounds were extracted with 96% ethanol and their total content was determined spectrophotometrically. It was found that in response to the action of UV-B radiation in flax callus cultures occurs activation of adaptation processes.

The studied parameters change to a greater measure in flax culture with reduced stress resistance. Thus, the influence of UV-B rays on plant cell cultures leads to an increase in the accumulation of phenolic compounds in them.

Key words: flax, *Linum usitatissimum* L., callus culture, UV-B rays, phenolic compounds.

For citation: Goncharuk E.A., Nazarenko L.V., Zagorskina N.V. UV-B rays action on flax culture *in vitro* and the accumulation of phenolic compounds in them. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2019;22(10):37–41. <https://doi.org/10.29296/25877313-2019-10-06>

REFERENCES

1. Dotto M., Casati P. Developmental reprogramming by UV-B radiation in plants // Plant Science. 2017. V. 264. P. 96–101.
2. Zaprometov M.N. Fenol'nye soedineniya: rasprostraneniye, metabolizm i funktsii v rasteniyah. M.: Nauka. 1993. 272 s.
3. Bidet L.P., Coumans M., Baissac Y., Doumas P., Jay-Allemand C. Biological activity of phenolics in plant cells // Recent advances in polyphenol research. United Kingdom: Blackwell Publishing Ltd. 2010. V. 2. P. 163–205.
4. Santin M., Lucini L., Castagna A., Rocchetti G., Hauser M.T., Ranieri A. Comparative “phenol-omics” and gene expression analyses in peach (*Prunus persica*) skin in response to different postharvest UV-B treatments // Plant physiology and biochemistry. 2019. V. 135. P. 511–519.
5. Butenko R.G. Biologiya kletok vysshih rastenij *in vitro* i biotekhnologii na ih osnove. M.: FBk-Press. 1999. 160 s.
6. Nosov A.M. Application of cell technologies for production of plant-derived bioactive substances of plant origin // Applied biochemistry and microbiology. 2012. V. 48. P. 609–624.
7. Tolkachev O.N., Zhuchenko A.A. ml. Biologicheski aktivnye veshchestva l'na: ispol'zovanie v medicine i pitanii // Himiko-farmaceuticheskij zhurnal. 2000. № 7. S. 23–28.
8. Titok V.V., Lemesh V.A., Hotyleva L.V. Len kul'turnyj. Klassifikatsiya, botanicheskaja i hozjajstvennaja harakteristika, genetika, fiziologija, biokhimiya i biotekhnologija. Saarbrücken: LAP LAMBERT Academic Publishing. 2012. 268 s.
9. Gosudarstvennyj reestr selekcionnyh dostizhenij, dopushhennyh k ispol'zovaniju. T. 1. Sorta rastenij <https://reestr.gossort.com/reestr>.
10. Zagorskina N.V., Goncharuk E.A., Alyavina A.K. Effect of cadmium on the phenolic compounds formation in the callus cultures derived from various organs of the tea plant // Russian Journal of Plant Physiology. 2007. V. 54. P. 237–243.
11. Mierziak J., Kostyn K., Kulma A. Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment // Molecules. 2014. V. 19. P. 16240–16265.
12. Ahmad W., Zahir A., Nadeem M., Garros L., Drouet S., Renouard S., Abbasi B.H. Enhanced production of lignans and neolignans in chitosan-treated flax (*Linum usitatissimum* L.) cell cultures // Process biochemistry. 2019. V. 79. P. 155–165.