

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ УЛЬТРАЗВУКА НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ СТЕРИЛИЗАЦИИ ЭКСПЛАНТОВ СОИ, СКОРОСТЬ РОСТА И СОДЕРЖАНИЕ ОБЩЕГО БЕЛКА И ЛИГНИНА В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ IN VITRO

М.Э. Ламберова, Е.П. Маркина, А.А. Ламберова, А.С. Косолапова

При введении в культуру клеток и тканей эксплантов, изолированных из зародышевых листков, апикальных меристем и гипокотилия корня проростков семян сои сорта «Алтом» на стадии их стерилизации, кроме традиционных химических методов, применили ультразвук. Это повысило эффективность стерилизации для эксплантов из зародышевых листков – на 15 %. При этом эффективность каллусообразования увеличилась на 16 %, а прирост биомассы – на 36%. содержание общего белка в ней возросло на 14,6 мкг/мл, содержание лигнина – на 1,23 мг/г биомассы.

Соя в промышленных количествах перерабатывается на предприятиях Алтайского края для получения масла и большого ассортимента белковых продуктов. Традиционно соя произрастает в других климатических зонах. Одним из немногих сортов, районированных в Алтайском крае, является сорт «Алтом». Урожайность и качество его можно повысить, придав устойчивость к неблагоприятным климатическим воздействиям с помощью современного биотехнологического метода культуры клеток и тканей in vitro, не меняя его генетически. Метод предполагает изоляцию зон роста в виде различных эксплантов из исходного растения, стерилизацию их и помещение в стерильных условиях на питательную среду Мурасиге-Скуга (МС) с заданным составом всех нативных ростовых факторов.

Для накопления биомассы (каллуса), на котором отрабатывают запланированные свойства, использовали первичные экспланты в виде зародышевых листков, апикальных меристем и гипокотилия корня проростков семян сои сорта «Алтом».

При обработке их дезинфицирующими растворами с ультразвуком в оптимальных, заранее подобранных условиях и без него, определяли эффективность стерилизации по количеству выживших неинфицированных эксплантов на среде инициации каллусообразования с кинетином и 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой). Кроме того, определяли содержание общего белка в исходных эксплантах и биомассе из них, чтобы оценить возможные изменения питательной ценности клеточной биомассы после воздействия ультразвуком. На исходных эксплантах были отработаны оптимальные режимы экстрагирования общего белка и ульт-

развуковой обработки без разрушения белков сои. Показателем устойчивости к неблагоприятным воздействиям считается содержание в клетках лигнина, с которым связаны оксикоричные кислоты, определяющие такую устойчивость. Поэтому было также оценено содержание лигнина в исходных эксплантах и биомассе из них до и после обработки ультразвуком. На различных исходных эксплантах сначала также установили оптимальные режимы экстрагирования лигнина и ультразвуковой обработки, которые затем использовали для культуры клеток и тканей из них in vitro.

Обработка ультразвуком осуществлялась ультразвуковым технологическим аппаратом «Муза»-0,4/22-М, который обеспечивает интенсификацию в технологических процессах в жидких средах за счет введения в них ультразвуковых колебаний высокой интенсивности и реализации оптимального режима развитой кавитации. Аппарат предназначен для фармацевтических производств и позволяет устанавливать режимы, не приводящие к разрушению извлекаемых биологически активных соединений растительного сырья.

Оптимизация экстрагирования из корней, стеблей, листьев по различным внешним факторам (соотношение сырья и экстрагента, содержание этилового спирта в водно-спиртовом экстрагенте, мощность и длительность ультразвуковой обработки) приведена на диаграммах (рис. 1 и 2).

По результатам (рис. 1) лучшим для экстрагирования общего белка из корней, стеблей и листьев проростков семян сои был вариант 4 с применением ультразвука мощностью 200 Вт. Обработка дольше 12 минут повышала температуру до величин, приводящих к коагуляции белков. Содержание обще-

го белка определяли по стандартной методике Лоури.

Затем содержание лигнина (рис. 2) определяли в корнях, стеблях и листьях проростков семян сои. Для приготовления экстрактов сырье измельчали в ступке, а затем заливали водным экстрагентом. Экстракт обрабатывался ультразвуком мощностью 200 Вт с разной продолжительностью. На предыдущем этапе в опыте по определению содержания общего белка установили, что для водных экстрактов из листьев и корней оптимальным является соотношение сырья и экстрагента 1:100, а для стеблей-1:60. Экстракты обрабатывали ультразвуком мощностью 200Вт с длительностью 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 минут. Экстрагирование проводили при постоянном перемешивании и температуре 30°C. По окончании экстрагирования раствор отфильтровали через бумажный фильтр и определили содержание лигнина по стандартной методике.

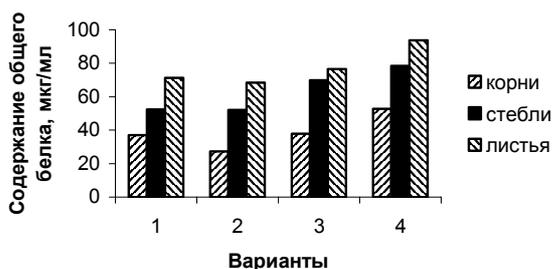


Рисунок 1 – Сравнительная диаграмма по влиянию внешних факторов на содержание общего белка в экстрактах из проростков семян сои: постоянное перемешивание; t =30°C; 1 - соотношение сырья к экстрагенту: корни - 1:100, стебли -1:60, листья -1:100; 2 - содержание этилового спирта в водно-спиртовом экстрагенте: корни - 10%, стебли - 60%, листья - 60%; 3 - мощность УЗ 200Вт, время -1 мин; 4 - мощность УЗ 200Вт, время -12 мин.

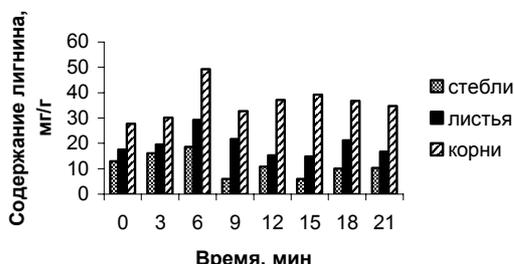


Рисунок 2 – Зависимость содержания лигнина в водном экстракте из листьев, стеблей и корней проростков сои от продолжительности обработки ультразвуком: постоянное перемешивание; t=30°C; мощность УЗ – 200 Вт

Содержание лигнина в водных экстрактах из листьев, стеблей и корней, обработанных ультразвуком мощностью 200 Вт, достигает максимума при обработке в течение 6 минут. При дальнейшем воздействии ультразвуком на экстракты содержание лигнина уменьшается. Минимальное содержание лигнина в экстрактах из листьев при обработке ультразвуком 15 минут, в экстрактах из стеблей растения при воздействии в течение 9 и 15 минут, а из корней сои – 3 минут.

Содержание лигнина (рис. 2) показало, что для культуры клеток и тканей сои *in vitro* можно считать оптимальной обработку ультразвуком мощностью 200 Вт в течение 6 минут.

На следующем этапе исследовали влияние ультразвука на эффективность стерилизации, каллусообразования и прирост биомассы при размножении культуры клеток и тканей сои *in vitro*.

Для опыта с применением ультразвука и для контрольного опыта было взято по 40 пробирок с питательной средой МС и эксплантами. Эксплантами являлись зародышевые листки, в которых содержалось больше общего белка.

Эффективность стерилизации (Э) оценивали по количеству неинфицированных эксплантов в пробирках после стерилизации (С), выраженная в процентах от исходного количества стерилизуемых эксплантов (Х):

$$\text{Э}=(\text{С}/\text{Х})\cdot 100\%.$$

Эффективность каллусообразования определяли по количеству стерильных эксплантов, образовавших каллус в пробирках с питательной средой (к), выраженную в процентах, от исходного количества вводимых в культуру эксплантов

$$(\text{x}) \text{Э}=(\text{k}/\text{x})\cdot 100\%.$$

В контрольном опыте 15 эксплантов оказались инфицированными, эффективность стерилизации составила 63%. 8 эксплантов образовали каллус, эффективность каллусообразования составила 32 %.

В следующем опыте экспланты в пробирках с питательной средой МС обрабатывали ультразвуком мощностью 200 Вт в течение 6 минут. В результате 9 эксплантов оказались инфицированными, эффективность стерилизации составила 78 %.

15 эксплантов образовали каллус, эффективность каллусообразования составила

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ УЛЬТРАЗВУКА НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ СТЕРИЛИЗАЦИИ ЭКСПЛАНТОВ СОИ, СКОРОСТЬ РОСТА И СОДЕРЖАНИЕ ОБЩЕГО БЕЛКА И ЛИГНИНА В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ IN VITRO

48 %. Затем определили прирост биомассы (в %). По максимальным значениям построили сравнительную диаграмму (рис. 3).

Из диаграммы (рис. 3) видно, что ультразвуковая обработка в оптимальном режиме повысила эффективность стерилизации эксплантов с 63 до 78 %, интенсифицировала размножение культуры клеток и тканей сои in vitro как по эффективности каллусообразования среди стерильных эксплантов с 32 до 48 %, так и по приросту их биомассы с 58 до 94 %.

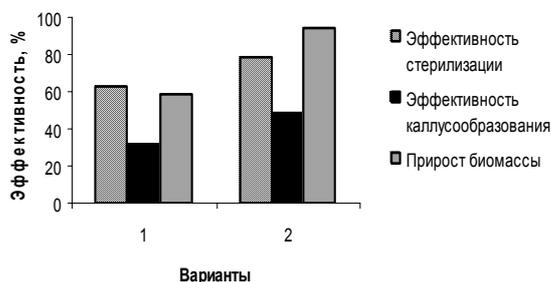


Рисунок 3 – Сравнительная диаграмма по влиянию ультразвуковой обработки на эффективность стерилизации эксплантов сои, каллусообразования и прироста биомассы in vitro: $t=26^{\circ}\text{C}$; влажность – 70%; в темноте; 1- вариант без ультразвука; 2- обработка ультразвуком: мощность 200Вт, длительность 6 мин.

В размножаемой биомассе затем оценили биосинтетическую активность по общему белку (в мкг/л) и лигнину (в мг/л). Экстрагирование в оптимальных режимах, подобранных выше, проводили с применением ультразвука и без него. Результаты приведены в сравнительной диаграмме (рис. 4).

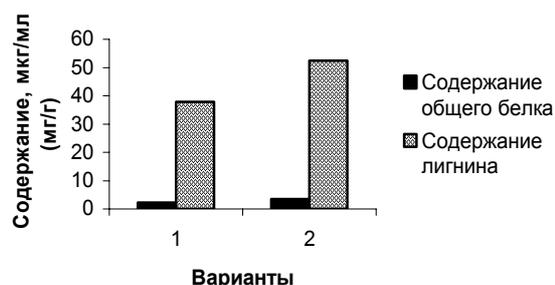


Рисунок 4 – Сравнительная диаграмма влияния ультразвука на содержание общего белка и лигнина в биомассе сои in vitro: $t=26^{\circ}\text{C}$; влажность – 70 %; в темноте; 1- без ультразвука; 2- с ультразвуком: мощность 200Вт, длительность 6 мин.

Сравнение результатов (рис. 4) показывает, что оптимально подобранная ультразвуковая обработка при более высоких скоростях размножения биомассы позволяет также повысить ее ценность по общему белку и устойчивости, судя по содержанию лигнина.