УДК 606.550.7

ЗАБЕЙДА О.Ф., ЖУК В.П., НАУМЕНКО В.Д.
Інститут харчової біотехнології та геноміки, Національна академія наук України, Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а, e-mail: e-mail: elzabeida@gmail.com

ВВЕДЕННЯ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* РІЗНИХ СОРТІВ СОЇ (*GLYCINE MAX* (L.) MERR.), СТЕРИЛІЗАЦІЯ ТА ДИНАМІКА КАЛЮСОУТВОРЕННЯ

Соя (*Glycine max* (L.) Merr.) належить до родини *Leguminance* і містить цілий ряд сполук з високою біологічною активністю. Серед них слід виділити білковий склад рослини, що вміщує всі незамінні амінокислоти, поліненасичені жирні кислоти (олеїнова, лінолева, ліноленова), фосфоліпіди тощо. Окрім цього, компонентами сої є легко засвоювані вуглеводи, вітаміни, рослинні волокна та біологічно активні речовини, такі як сапоніни та ізофлавони [1–4]. Особливий інтерес викликають ізофлавони. Це підклас рослинних флавоноїдів, які продукуються виключно представниками цієї родини бобових, та є важливою складовою рослинної ризосфери. Ізофлавони проявляють антиоксидантну, незначну естрогенну та антиестрогенну дію завдяки структурної близькості до естрогенних гормонів [5]. Дослідженнями антиоксидантного та естрогенного впливу ізофлавонів на організм людини і тварин було виявлено нормалізуючий вплив ізофлавонів на вміст холестерину, тригліцеридів, на ліпідний обмін загалом, відмічено зменшення ризику розвитку серцево-судинних захворювань [6, 7]. Інгібуюча дія ізофлавонів на тирозинкіназу, топоізомеразу, орнітиндекарбоксилазу, диференціювальний та антипроліферативний ефекти обмежує індукцію та розвиток новоутворень, що свідчить про значний протипухлинний потенціал ізофлавонів.

Найбільший вміст ізофлавонів встановлено в рослинах сої (*Glucine max* L.), червоній конюшині (*Trifolium pratense* L.) та в корінні пуерарії волосянистої (*Pueraria lobata*, кудзу). Основний вміст ізофлавонів сої представлений даідзеіном, геністеіном та, в меншій кількості, гліцитеіном. В необробленій сої та в червоній конюшині ізофлавони накопичуються як 7-О-в-глюкозиди та 6ґґ-О-малоніл-7-О-в-глюкозиди [8].

В якості сільськогосподарської сировини соя є досить цінною культурою, яка успішно вирощується на території України та привертає підвищену увагу виробників рослинної продукції. Використання рослин сої реалізується в дієтичному харчуванні та тваринництві тощо. На сьогоднішній день постійне розширення фармацевтичної, харчової, косметичної промисловості та сільського господарства потребує заміни традиційних технологій видобутку та обробки рослинної сировини. Альтернативою таким технологіям, які б дали змогу здешевити процес отримання та оброблення сировини, є використання біомаси культивованих клітин, які здатні ефективно продукувати цільові сполуки (вторинні метаболіти) в достатній кількості. Рівень синтезу конкретних вторинних метаболітів можна значно підвищувати за рахунок оптимізації середовища культивування, клонування, мутагенезу, використання елісіторів біотичної/абіотичної природи, скринінгу метаболітів, генетичної та метаболічної інженерії [9]. У випадку сої застосування такої стратегії вимагає дослідження впливу фізичних, біохімічних та генетичних факторів на отримання бажаних рослин-продуцентів. Це в значній мірі залежить від обраного сорту, оскільки різні генотипи сої за однакових умов здатні регенерувати по-різному.

Метою даної роботи був підбір умов введення в культуру *in vitro* декількох сортів сої, що культивуються в Україні. Окрім цього, вивчали динаміку калюсогенезу у різних типів експлантів обраних сортів. У процесі досліджень необхідно було встановити тип експлантів, що дає найвищий приріст калюсної тканини.

Матеріали і методи

Об’єктом досліджень були різні сорти сої (*Glycine max*): «Хорол», «Танаїс», «Кубань», «Терек», «Черемош граніт», надані Українською асоціацією виробників і переробників сої.

Стерилізацію насіння обраних сортів сої здійснювали в ламінарному боксі за наступною схемою: насіння обробляли 70 %-вим розчином спирту протягом 5 хв та залишали в 100 %-вому гіпохлориті натрію (комерційний відбілювач «Білизна») протягом 30 хв. Оброблений матеріал промивали стерильною дистильованою водою тричі по 10 хв. Після промивання стерилізоване насіння висаджували в пробірки та лабораторні банки з поживним середовищем Мурасіге і Скуга (MS) [10].

© ЗАБЕЙДА О.Ф., ЖУК В.П., НАУМЕНКО В.Д.

Насіння культивували при температурі 23 ± 1 °С , фотоперіоді 16/8 год (день/ніч) та інтенсивністю освітлення 2000–3000 люкс. Пророщування рослинного матеріалу досліджуваних сортів спостерігали на 6–8 тиждень культивації. Для мікроклонального розмноження використовували апекс 1,5–2-місячних рослин кожного з досліджуваних сортів. Підтримання отриманих культур *in vitro* відбувалось на живильних середовищах MS.

Поживні середовища для пророщування матеріалу готували з використанням солей MS («Sigma», США) з додаванням відповідних вітамінів, 2 %-вої сахарози та 8 %-вого агару («Sigma», США) з pH 5,6–5,8. Приготовані середовища стерилізували в автоклаві при 120 °С протягом 20 хв. Після зниження температури в камері автоклаву до 50–60 °С середовища розподіляли у відповідний стерильний посуд.

З метою дослідження здатності до калюсогенезу різних сортів сої в якості експлантів використовували стеблові частини рослин, такі як гіпокотиль 5–10 мм довжиною та міжвузля, які відбирали на 4–6 тиждень пророщування насіння, а також зародки.

Для індукції калюсогенезу використовували середовища MS з додаванням 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти (2,4-Д), нафталіноцтової кислоти (НОК), кінетину (Кін), 6-бензил-амінопурину (БАП), pH 5,6–5,8.

Аналіз ростової реакції калюсу здійснювали за допомогою виміру швидкості росту клітинної маси та ростового індексу. Для достовірності отриманих результатів усі досліди проводили у трьох повтореннях для кожного сорту сої, по 10 чашок Петрі для кожного досліджуваного фітогормону.

Морфологічно калюси розрізняли за кольором, структурою поверхні та щільністю. Для рахунку ростової реакції проводили визначення площі калюсів на 10, 20, 30, 40,50 і 60 добу культивації [11].

Статистичну обробку результатів проводили, розраховуючи середні величини, їхні середньоквадратичні відхилення та похибки. Для визначення вірогідних відмінностей між середніми використовували критерій Стьюдента. Розбіжності вважали статистично достовірними за $P < 0,05$ [12].

Результати та обговорення

У культуру були введені 5 сортів сої (*Glycine max* (L.)): «Хорол», «Танаїс», «Кубань», «Терек», «Черемош граніт». Вихідним матеріалом слугувало насіння сої. Для отримання асептичних проростів насіння стерилізували розчином етилового спирту (5 хв), гіпохлоритом натрію (15, 20, 25, 30 хв) та промиванні (тричі) у стерильній воді. Серед декількох розроблених схем стерилізації матеріалу нами було встановлено, що при обробці насіння 70 %-вим розчином етилового спирту (5 хв), гіпохлоритом натрію (30 хв) та промиванні (тричі) у стерильній воді ефективність стерилізації виявилась найвищою (100 %). Надалі оброблений матеріал висаджували на поживні безгормональні середовища MS

Пророщування насіння спостерігалось на 6–8 тиждень. Отримані таким чином рослини мікроклонально розмножували в стерильних умовах. Було встановлено, що оптимальний вік рослин для мікроклонального розмноження складав чотири – шість тижнів. Однак при подальшому культивуванні спостерігали інгібування процесу калюсогенезу, калюс поступово гинув. Слід відзначити, що 70 % мікроклонально розмножених шести-восьмитижневих рослин не укорінювались. Після отримання стерильної культури для кожного з сортів сої відбирали матеріал для наступного калюсогенезу.

Для дослідження впливу різних фітогормонів на динаміку калюсогенезу різних сортів сої у різних типах експлантів нами було використано 2,4-Д, НОК, Кін, БАП в наступних концентраціях та комбінаціях (табл. 1).

Таблиця 1

Концентрації фітогормонів у поживних середовищах для калюсоутворення

№	Склад середовища мг/л	Позначення
1	MS+НОК 5 + БАП 5+2,4 – Д 5	S1
2	MS+НОК 3 + Кін 3	S2
3	MS+2,4 – Д 0,5 + Кін 0,5	S3
4	MS+НОК 5 + БАП 0,25	S4
5	MS+НОК 1 + БАП 0,25	S5
6	MS+НОК 1	S6

У результаті проведеної роботи було встановлено, що на середовищах S1, S2, S3 спостерігався найбільш ефективний приріст калюсу на зародках та гіпокотилях у порівнянні з міжвузлями. Максимальна частота калюсоутворення спостерігалася у таких експлантів сої, як гіпокотиль та зародки у сортів «Хорол», «Танаїс», «Кубань» на середовищі S1. Інтенсивне утворення калюсної тканини встановлено для експлантів сої сортів «Хорол», «Танаїс», «Кубань» на середовищі S2 та S3. На середовищах S4, S5, S6 приріст калюсу не відбувався.

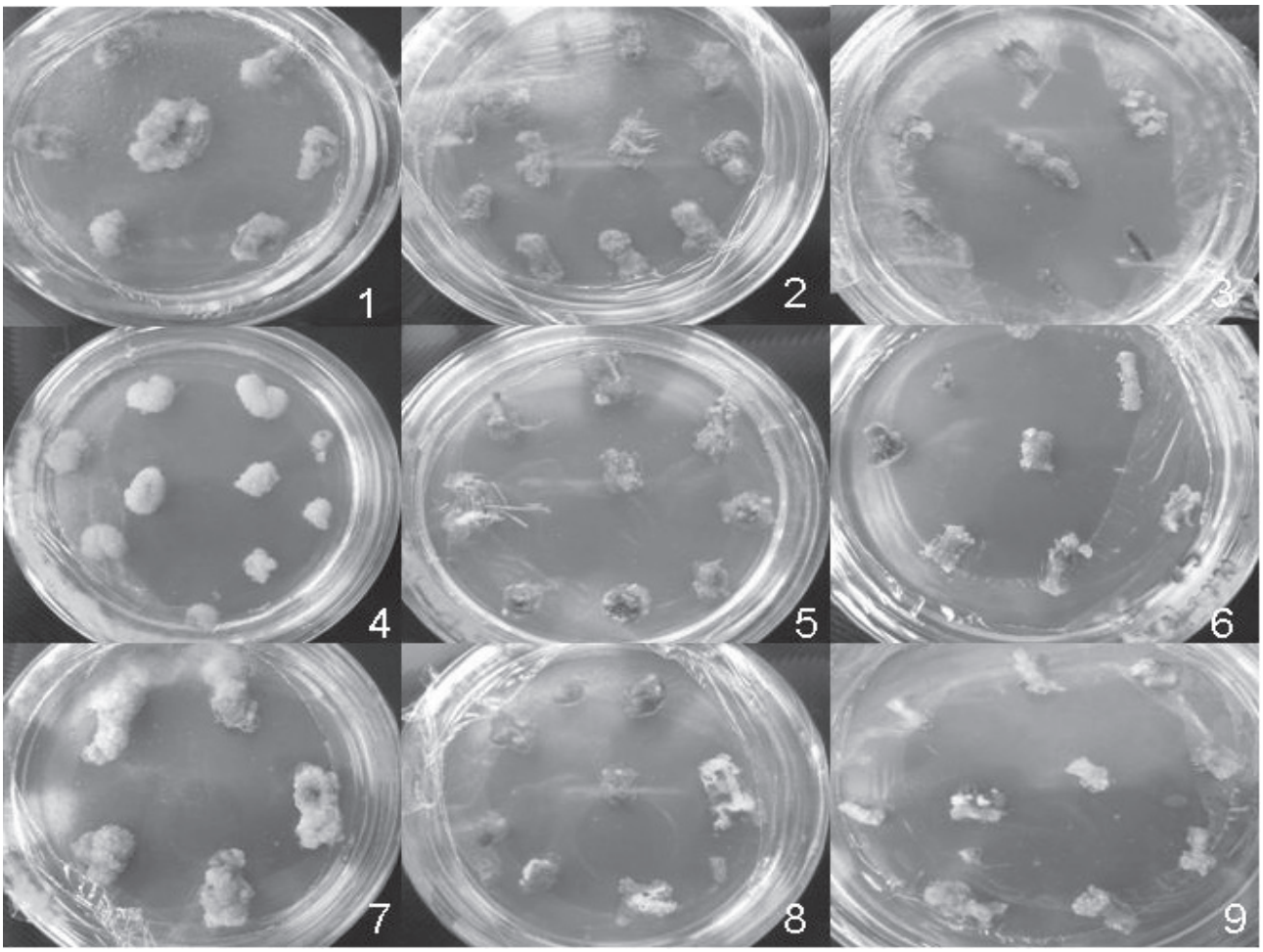

Рис. 1. Калюсоутворення таких сортів сої: сорт «Хорол» 1) зародки; 2) гіпокотиль; 3) міжвузля; сорт «Танаїс»; 4) зародки; 5) гіпокотиль; 6) міжвузля; сорт «Кубань»; 7) зародки; 8) гіпокотиль; 9) міжвузля. Масштаб 9 см

Експланти витримували у термостаті при температурі 26 °С у темряві в чашках Петрі на поживних середовищах з певним складом фітогормонів. У результаті проведеного дослідження було встановлено, що на сортах «Терек» та «Черемош граніт» калюсоутворення майже не спостерігалось. Появу первинного калюсу спостерігали на 8–10 день на сортах «Хорол», «Танаїс», «Кубань». Калюс розвивався у значної більшості експлантів, введених в культуру. В якості найкращого експланту було обрано зародки, тому що вони давали найбільш ефективний приріст калюсної маси для всіх досліджуваних сортів сої (рис. 1). Гіпокотиль давав значний приріст калюсної маси порівняно з міжвузлями, але не достатньо швидко в порівнянні з зародками (рис. 1). Міжвузля виявили меншу інтенсивність калюсоутворення (рис. 1). При пересадці калюсу на свіже середовище його зростання продовжувалось.

Морфологічно калюси розрізняли за кольором, структурою поверхні та щільністю. Калюс зародків на всіх сортах мав світло-жовте забарвлення та пухлу консистенцію поверхні. Калюс гіпокотилів характеризувався жовто-коричневим кольором, був щільної консистенції, в той час як калюс, що утворювався на міжвузлях був світло-зеленого кольору, дуже м'який та водянистий за структурою, нежиттєздатний.

У цілому, укорінення всіх регенерантів спостерігали на шостий-восьмий тиждень культивування на відповідному середовищі.

Динаміку приросту біомаси калюсу сої вивчали на середовищі MS з додаванням NAA–5 мг/л+BAP-5 мг/л+2,4 D–5 мг/л (S1), MS з додаванням а НОК 3 мг/л + Кін 3 мг/л (S2), MS з додаванням 2,4-Д 0,5 мг/л + Кін – 0,5 мг/л (S3). Крива зростання калюсу на трьох досліджуваних середовищах представлена на рис. 2.

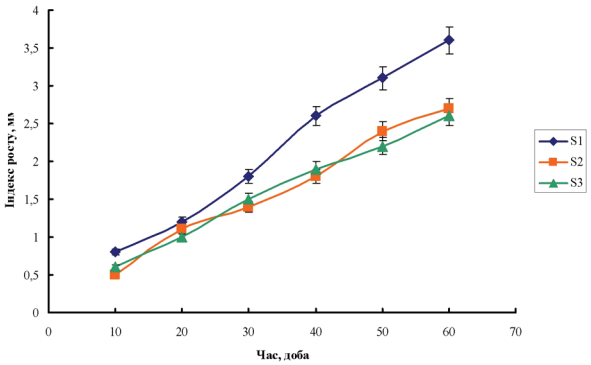

Рис. 2. Динаміка приросту біомаси калюсу зародків. Усі результати є достовірними ($P < 0,05$)

Висновки

З'ясовано особливості та умови проростання насіння, індукції калюсоутворення на різних типах експлантів та тривалого вирощування культури тканин сої. Досліджено періодичність проростання насіння, його схожість, залежність цих процесів від різних чинників; в умовах *in vitro* отримано життєздатні морфологічно нормальні рослини, які використовували в якості вихідного матеріалу для подальших досліджень.

Виявлено, що ефективність калюсоутворення залежала від мінерального і фітогормонального складу живильного середовища, типу експланта та місця зростання рослини-донора експланта. Оптимальним поживним середовищем для індукції структурованого та щільного калюсу виявилося середовище S1 (MS + НОК 5 мг/л + БАП 5 + 2,4 мг/л – Д 5 мг/л). Калюсогенна активність на гіпокотилі та зародках була вища, ніж у міжвузлях.

ЛІТЕРАТУРА

1. Delmonte P., Rader J.I. Analysis of Isoflavones in Foods and Dietary Supplements // AOAC Int. – 2006. – 4. – P. 1138–1146.
2. Rostagno M.A., Villaresa A., Guillamyna E., Garcia-Lafuente A, Martinez J.A. Sample preparation for the analysis of iso avones from soybeans and soy foods // J. Chromatogr. – 2009. – 1. – P. 2–29.
3. Luthria D.L., Natarajan S.S. Influence of sample preparation on the assay of isoflavones // Planta Med. – 2009. – 75, N 7. – P. 704–710.
4. Setchell K.D.R, Brown N.M., Desai P., Zimmer-Nechemias L., Wolfe B.E., Brashear W.T., Kirschner A.S., Cassidy A., Heubi J.E. Bioavailability of Pure isoflavones in Healthy Humans and Analysis of commercial soy isoflavone supplements // J. Nutr. – 2001. – 54. – P. 1362–1375.
5. Birt D.F., Hendrich S., Anthony M., Alekel D.L. Soybeans and the prevention of chronic human disease. Soybeans: Improvement, Production and Uses. J. Specht and R. Boerma, Eds. 3rd ed. pp. 1047–1117 American Society of Agronomy, Madison, WI; Науменко В.Д.
6. An J., Tzagarakis-Foster C., Scharschmidt T.C., Lomri N., Leitman D.C. Estrogen receptor beta-selective transcriptional activity and recruitment of coregulators by phytoestrogens // J. Biol. Chem. – 2001. – 276. – P. 17808–17814.
7. Абдрахимова Й.Р., Валиева А.И. Вторичные метаболиты растений: физиологические и биохимические аспекты (часть 3. Фенольные соединения): Уч.-метод. пособие, под ред. Багаевой Т.В. – Казань: Казанский федеральный университет, 2010. – 41 с.
8. Dixon R.A., Ferreira D. Molecules of Interest Genistein // Phytochem. – 2002. – 60. – P. 205–211.
9. Fernie A.R., Trethewey R.N., Krotzky A.J., Willmitzer L. Metabolite profiling: from diagnostics to systems biology // Nat. Cell Biol. – 2004. – 9. – P. 763–769.
10. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // Phys Pla. – 1962. – 15, N 3. – P. 473–497.
11. Носов А.М. Методы оценки характеристики роста культур клеток высших растений // Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. – С. 386–403.
12. Gubler E.V., Genkin A.A. Nonparametric yardstick of statistics using in biomedical research. – Leningrad: Medicina, 1973. – 144 p.

ZABEIDA O.F., ZHUK V.P., NAUMENKO V.D.

Institute of Food Biotechnology and Genomics, Nat. Acad. of Sciences of Ukraine,
Ukraine, 04123, Kyiv-143, Osipovskogo str., 2a, e-mail: elzabeida@gmail.com

INTRODUCTION *IN VITRO* CULTURE DIFFERENT VARIETIES OF SOYBEAN (*GLYCINE MAX* (L.) MERR.), STERILIZATION AND DYNAMICS OF CALLUS FORMATION

Aims. The aim of this study was the selection of the optimal culture conditions for introduction *in vitro* of different ukrainian soybean varieties ("Horol", "Tanais", "Terek", "Kuban", "Cheremosh granit") and the investigation of callus formation on different types of explants. ***Methods***. Hypocotyls, internodes and embryos as explants were used. The highest frequency of callus formation was observed for soybean explants such as hypocotyls and embryos (varieties "Horol", "Tanais", "Kuban") on the medium S1, S2, S3. Callus growth did not occur on the medium S4, S5, S6. ***Results***. The highest frequency for induction of callus was observed for soybean varieties «Horol», «Tanais», «Kuban» on the culture medium S1, S2, S3. ***Conclusions***. It was found that the effectiveness of callus formation depended of the mineral and phytohormonal medium composition, type of explants and explants growth place Hypocotyls and embryos as explants were more effective for callus induction than internodes. Medium S1 was the best medium for callus induction.

Keywords: Glycine max (L.) Merr., *in vitro* culture, callus induction.