

ВЛИЯНИЕ ФОТОПЕРИОДА И ИНТЕНСИВНОСТИ ОБЛУЧЕНИЯ НА РАЗВИТИЕ ПОБЕГОВ *STEVIA REBAUDIANA* BERTONI IN VITRO И СИНТЕЗ В НИХ СТЕВИОЛ-ГЛИКОЗИДОВ

Н.И. БОНДАРЕВ, к. б. н.; О.В. РЕШЕТНЯК, к. фарм. н.; А.М. НОСОВ*, д. б. н.

Исследовано влияние интенсивности облучения и фотопериода на развитие побегов стевии (*Stevia rebaudiana* Bertoni) in vitro и синтез в них стевиол-гликозидов (СГ). Выявлено, что оптимальная интенсивность лучистого потока для роста и развития побегов стевии, культивируемых в условиях in vitro, а также для накопления в них стевиол-гликозидов, находится в пределах 35–45 Вт/м². Это примерно в 2,5–3 раза ниже, чем для интактных растений. Оптимальная продолжительность фотопериода составляет для диплоидного генотипа 16 ч, для тетраплоидного генотипа — около 20 ч.

Как известно, побеги стевии (*Stevia rebaudiana* Bertoni) — эндемика Парагвая принадлежит к семейству *Asteraceae* и содержат ряд уникальных соединений — дитерпеновых стевиол-гликозидов. Это низкокалорийные и нетоксичные вещества с высокой подслащивающей способностью (примерно в 300 раз слаще сахарозы) [16, 19]. Максимальное количество СГ накапливается в надземных вегетативных органах растений, в первую очередь в листьях стевии [1, 15]. Основными по содержанию (мажорными) СГ являются стевиозид, ребаудиозид А и ребаудиозид С [12]. В последнее время широкий интерес вызывает исследование культур стевии in vitro, во-первых, с целью получения альтернативного источника стевиол-гликозидов, а во-вторых, в качестве модели для изучения вторичного метаболизма дитерпеноидов. Одним из направлений, интересующих многих исследователей во всем мире, является изучение влияния различных факторов на накопление СГ в культурах стевии in vitro. Успехи в этой области могут представлять интерес не только для фундаментальной науки,

но и будут иметь широкие практические перспективы.

Ранее нами было исследовано влияние компонентов питательной среды на развитие побегов стевии в биореакторе и накопление в них СГ [14]. Хорошо известно, что свет (фотопериод и интенсивность светового потока) оказывает существенное влияние на процессы роста и развития, а также синтез веществ специализированного обмена как у интактных растений, так и в культурах in vitro [3, 4, 9]. Эти эффекты могут проявляться в более быстром и качественном развитии меристем и целых растений, повышении их продуктивности как по биомассе, так и по содержанию в тканях веществ вторичного обмена, устойчивости к неблагоприятным факторам среды и др. [2, 6, 9]. По полученным нами ранее сведениям, условия освещения являются наиболее значимыми факторами культивирования, воздействующими на синтез СГ, так как его интенсивность зависит от развития и активности функционирования хлоропластов [17]. Это вполне ожидаемо, так как стевиол-гликозиды, по нашему предположе-

* (Институт физиологии растений имени К.А. Тимирязева, Российская Академия Наук)

нию, синтезируются именно в хлоропластах по альтернативному 1-деокси-D-ксилозу-5-фосфатному пути синтеза изопреноидов, открытому около 10 лет назад, в т.ч. и у высших растений [18].

К настоящему времени влияние интенсивности облучения и фотопериода на развитие побегов *Stevia rebaudiana* in vitro и синтез в них стевииол-гликозидов практически не изучены. Опубликовано лишь несколько работ, в которых исследовалось влияние фотопериода и интенсивности освещения на развитие интактных растений стевии и накопление СГ в их листьях [5, 7, 21]. Было установлено, что оптимальная для роста интактных растений стевии продолжительность освещения составляет около 16 ч, а интенсивность светового потока — около 100 Вт/м². Изучение воздействия света на ростовые процессы в культурах стевии in vitro и образование в них СГ особенно актуально в связи с тем, что в последние годы находит широкое применение массовое микрклональное размножение стевии [11]. Перспективно также и выращивание биомассы стевии в биореакторах непосредственно для получения СГ.

Целью нашего исследования было изучение влияния интенсивности светового потока и фотопериода на ростовые параметры побегов стевии in vitro и синтез в их листьях дитерпеновых стевииол-гликозидов.

Методика

Объектами исследования служили побеги стевии in vitro двух генотипов: 0 (диплоид) и 1 (тетраплоид), которые получали как описано ранее [13] и выращивали в пробирках на безгормональной агаризованной среде Мурашиге и Скуга [20]. В качестве микрокультур использовали фрагменты стебля пробирочных растений длиной около 1,5 см, с одной парой листьев. Культивирование проводили при температуре 26±1°C и влажности воздуха 70%. В эксперименте использовали лампы

ЛБ-80. В связи с тем, что культуры более чувствительны к световому излучению, чем интактные растения, интенсивность светового потока в экспериментах составляла 8, 30 и 60 Вт/м² при 16 и 20-часовом фотопериоде. В качестве контроля был выбран стандартный режим выращивания: интенсивность светового потока — 8 Вт/м², фотопериод — 16 ч.

Определяли число и длину побегов, число пар листьев на побегах, число и длину корней, содержание сырой и сухой массы, а также содержание СГ в листьях, основного места их накопления [12, 15]. Исследования проводили в течение 3 лет, в каждом эксперименте было 15 биологических повторностей. На рисунках представлены средние арифметические и стандартные отклонения.

Определение состава и содержания СГ в очищенных экстрактах растительных образцов проводили методом ВЭЖХ на приборе фирмы LKB-Produkter AB, Bromma (Швеция). Детектирование — UV-210 нм, объем калибровочной петли — 10 мкл. В работе использовали стальную колонку Ultro Pac column TSK-OH-120, 4,6 × 250 мм, с размером частиц 5 мкм. Разделение проводили в системе растворителей ацетонитрил : вода (85 : 15) при скорости потока 0,5 мл/мин. Подробное описание экстрагирования образцов и их очистки приведено в [12]. Методом ВЭЖХ определяли три мажорных СГ (стевииозид, ребаудиозид А и ребаудиозид С). Стандарты-метчики стевииол-гликозидов были получены из института органической и физической химии имени А.Е. Арбузова КНЦ РАН (г. Казань). Величины стандартных ошибок при определении содержания СГ не превышали 3%.

Результаты и их обсуждение

В результате проведенных исследований было установлено, что основные параметры роста побегов стевии in vitro (длина побегов и корней, число пар

листьев на побегах, содержание сухой массы растений) при 16-часовом фотопериоде были наиболее высокими при интенсивности светового потока 30 Вт/м², хотя достоверное отличие от контроля отмечено только для двух последних параметров роста (рис. 1). Так, число пар листьев на побегах и длина корней при этом режиме освещения была примерно в 1,5–2 раза больше, чем в контроле (8 Вт/м²), а содержание сухой массы листьев — в 2,5–3,5 раза. При интенсивности облучения 60 Вт/м² практически все ростовые параметры побегов были существенно ниже, чем при интенсивности 30 Вт/м². Оптимальная интенсивность светового потока для роста побегов *in vitro*, вычисленная по кривой, построенной по экспериментальным значениям, составляет около 35–40 Вт/м².

Несколько другую картину наблюдали при 20-часовом периоде, когда изменение интенсивности светового потока с 8 до 30 Вт/м² не приводило к достоверному увеличению параметров роста побегов стевии *in vitro* (рис. 2).

Содержание СГ в листьях побегов стевии при увеличении интенсивности лучистого потока с 8 до 30 Вт/м², при 16-часовом фотопериоде, увеличивалось в 5,7 раз (диплоид) и в 1,6 раза (тетраплоид) (рис. 3А). Однако в связи с тем, что при контрольных условиях тетраплоид накапливал почти в 4 раза больше СГ, их содержание в листьях этих двух генотипов в данном эксперименте почти выравнивалось. Дальнейшее увеличение освещенности до 60 Вт/м² приводило к снижению накопления СГ у диплоида, тогда как их содержание в листьях тетраплоида

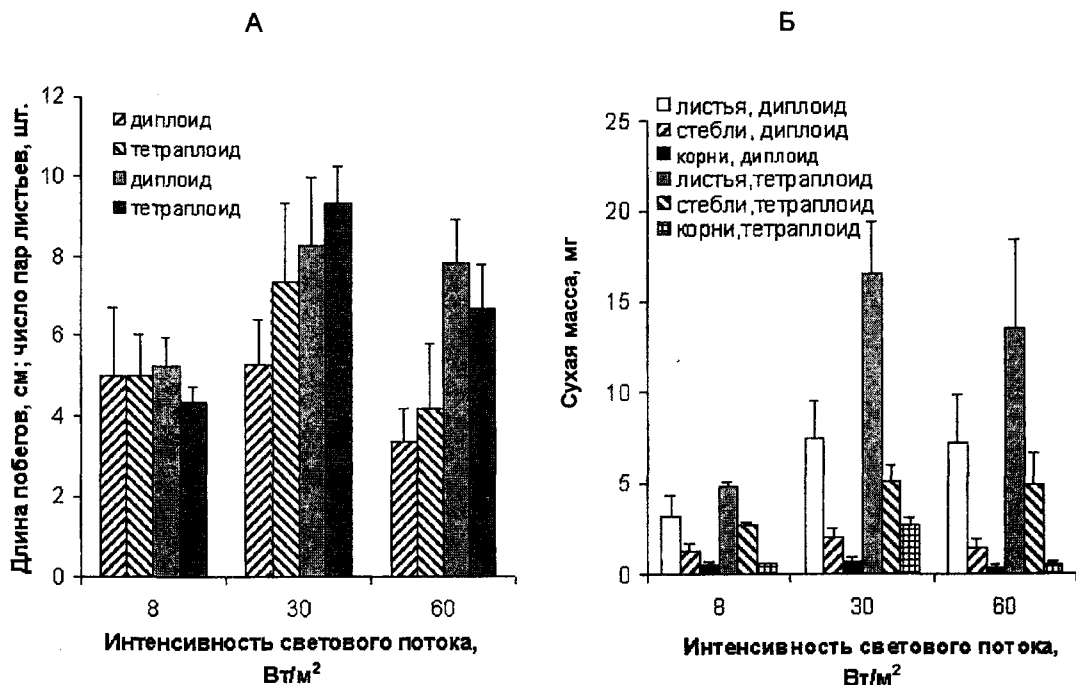


Рис. 1. Влияние интенсивности светового потока на развитие побегов стевии *in vitro* при фотопериоде 16 ч. А — длина побегов и число пар листьев на побеге (заштрихованные столбики — длина побегов, незаштрихованные столбики — число пар листьев), Б — сухая масса листьев, стеблей и корней

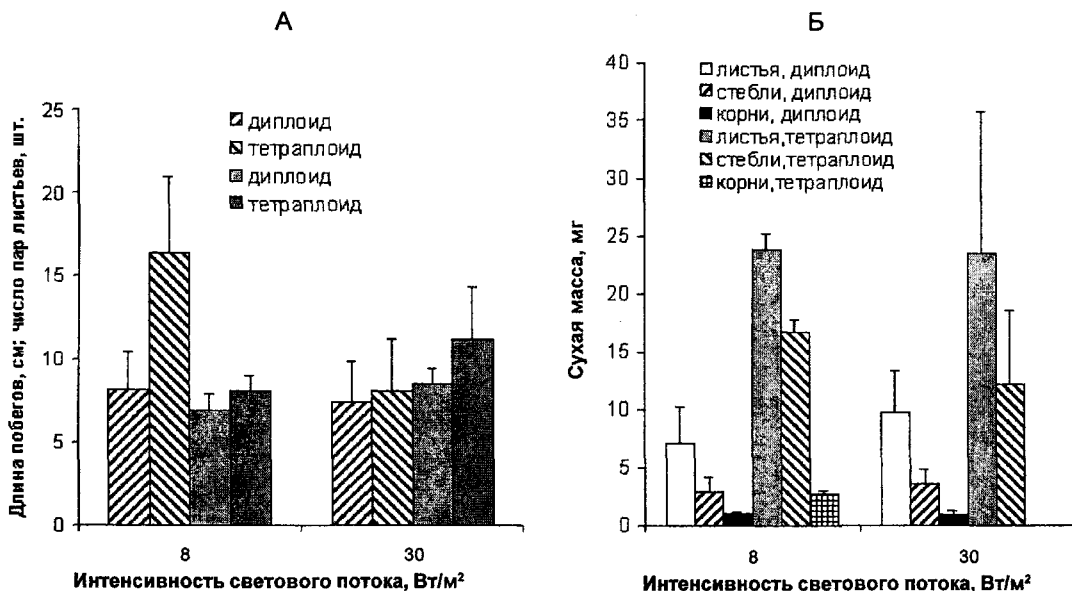


Рис. 2. Влияние интенсивности светового потока на развитие побегов стевии *in vitro* при фотопериоде 20 ч. А — длина побегов и число пар листьев на побеге (заштрихованные столбики — длина побегов, незаштрихованные столбики — число пар листьев), Б — сухая масса листьев, стеблей и корней

несколько повышалось, но на фоне небольшого снижения содержания сухой массы листьев общий выход этих ценных вторичных метаболитов не увеличивался. Оптимальная интенсивность светового потока для накопления СГ, вычисленная по экспериментальным кривым, для диплоида также составляет около 35–45 Вт/м², в то время как для тетраплоида она была несколько выше.

Повышение накопления СГ при увеличении интенсивности света с 8 до 30 Вт/м² наблюдали и при 20-часовом фотопериоде. Содержание СГ в этом случае возрастало в листьях диплоида в 2,2, а в листьях тетраплоида — в 3,1 раза (рис. 3Б).

Следует отметить, что при изучении влияния интенсивности светового потока данные о накоплении сухой массы и содержании в ней стевииола-гликозидов, как правило, всегда между собой положительно коррелировали, за исключением результатов опыта с ге-

нотипом 1 при увеличении освещенности с 30 до 60 Вт/м².

Удлинение светового дня с 16 до 20 ч, несколько существеннее сказывалось на накоплении сухой биомассы, особенно у тетраплоида, чем увеличение интенсивности светового потока до 30 Вт/м², по сравнению с контролем (см. рис. 1, 2). По сути, для накопления биомассы побегов стевии *in vitro* биологически более рациональным является удлинение светового дня, а не увеличение интенсивности облучения. Это известная закономерность, характерная для большинства интактных растений [8, 10], имеет место и для побегов стевии *in vitro*. Однако при удлинении светового дня до 20 ч и интенсивности облучения 30 Вт/м² увеличение длины побегов, числа пар листьев и сухой биомассы не было достоверным (см. рис. 2).

Необходимо отметить, что при исследовании влияния фотопериода, какой-либо четкой корреляции между

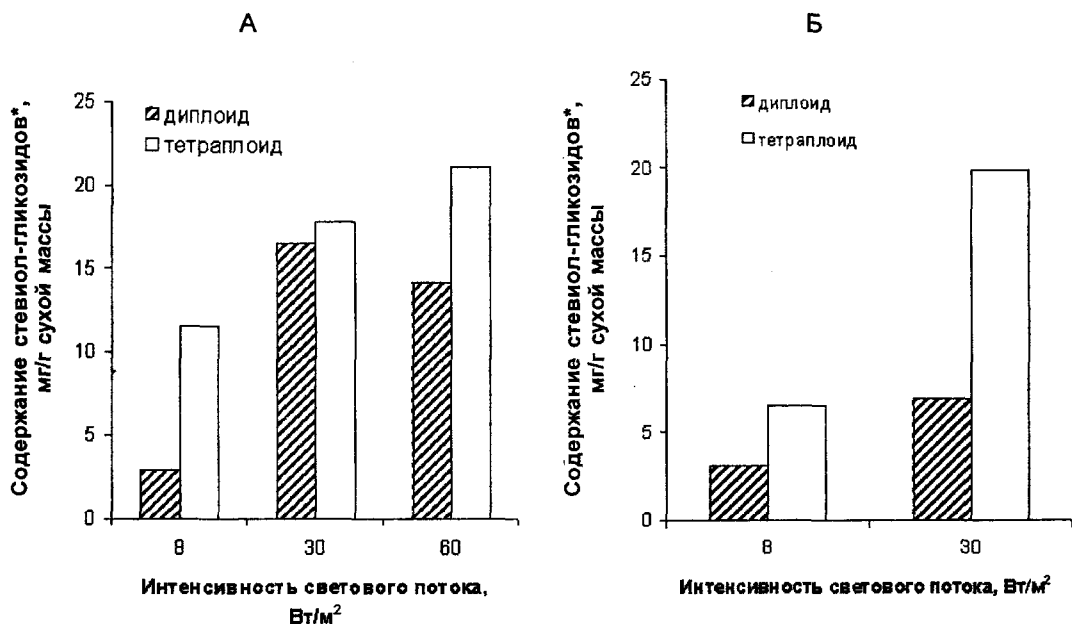


Рис. 3. Влияние интенсивности светового потока и фотопериода на содержание стевиио-гликозидов в листьях побегов стевии *in vitro*. А — фотопериод 16 ч, Б — фотопериод 20 ч. *Величины стандартных ошибок при определении содержания СГ не превышали 3%

накоплением сухой массы и содержанием в ней стевиио-гликозидов мы не отметили. Так, при увеличении длины светового дня с 16 до 20 ч и интенсивности светового потока 8 и 30 Вт/м², на фоне повышения накопления сухой массы листьев для обоих генотипов, содержание СГ либо несущественно повышалось, либо резко падало (примерно в 2–2,5 раза) (см. рис. 3А, Б). Продуктивность по СГ при удлинении светового дня до 20 ч с учетом накопления биомассы увеличивалась для тетраплоида как при интенсивности светового потока 8 Вт/м², так и 30 Вт/м², а для диплоида продуктивность возрастала только при интенсивности светового потока 8 Вт/м². Следует отметить, что при удлинении светового дня с 16 до 20 ч повышение продуктивности по СГ было в 3–4 раза менее эффективным, чем при увеличении интенсивности светового потока с 8 до 30 Вт/м².

В целом, по результатам эксперимента было выявлено, что для наи-

большого накопления СГ в листьях тетраплоида необходима более высокая интенсивность светового потока и удлиненный фотопериод, чем для диплоида.

Заключение

Таким образом, оптимальная интенсивность лучистого потока для роста растений стевии и накопления стевиио-гликозидов в листьях, культивируемых в условиях *in vitro*, находится в пределах 35–45 Вт/м², что примерно в 2,5–3 раза ниже, чем для интактных растений. Оптимальная продолжительность светового дня для диплоида составляет 16 ч, для тетраплоида — около 20 ч.

Библиографический список

1. Бондарев Н.И., Суханова М.А., Решетняк О.В., Носов А.М. Состав и содержание стевиио-гликозидов в надземных и подземных органах *Stevia rebaudiana* Bertoni и их динамика в течение он-

тогенеза. V съезд Общества физиологов растений (ОФР) России и Межд. конф. Физиология растений — основа фитобиотехнологии. Пенза, 2003. — 2. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений in vitro и биотехнология на их основе. М.: ФБК Пресс, 1999. — 3. Головацкая И.Ф., Карначук Р.А. Свет и растение. Томск: Изд-во Томского гос. ун-та, 1999. — 4. Данилова М.Ф., Кашина Т.К. Структурные основы актиноритмической регуляции цветения. СПб.: Наука, 1999. — 5. Ермаков Е.И., Кочетов А.А. Рост и продуктивность стевии в регулируемых условиях в зависимости от фотопериода и интенсивности света // Докл. РАСХН, 1994. № 6. С. 7–8. — 6. Кашина Т.К., Шаварда А.Л. Влияние фотопериода на содержание эфирного масла в надземных частях целого растения и изолированных пельтатных железках *Perilla osuroides* (Lamiaceae) // Бот. журн., 1994. Т. 79. С. 76–83. — 7. Кочетов А.А., Гогичайшвили Н.Е. Накопление сухой надземной массы и сладких гликозидов у растений *Stevia rebaudiana* Bertoni на разных световых режимах в регулируемых условиях. IV Межд. конф. Селекция, экология, технология возделывания и переработка нетрадиционных растений. Симферополь, 1996. С. 94–96. —

8. Леман В.М. Культура растений при электрическом свете (светокультура растений). М.: Колос, 1971. — 9. Чайлахян М.Х., Макеев А.В., Аксенова Н.П. и др. // Физиол. раст., 1992. Т. 39. Вып. 2. С. 216–223. — 10. Шульгин И.А. Растение и солнце. Л.: Гидрометеиздат, 1973. — 11. Akita M., Shigeoka T., Koizumi Y., Kawamura M. // Plant Cell Rep. 1994. V. 13. P. 180–183. — 12. Bondarev N., Reshetnyak O., Nosov A. // Plant Science, 2001 V. 161 (1) P. 155–163. — 13. Bondarev N.I. 9th Internat. Conf. of Horticulture. Lednice, 2001. V. 2. P. 431–433. — 14. Bondarev N.I., Reshetnyak O.V., Nosov A.M. // Plant Sci., 2003. V. 165 (4). P. 845–850. — 15. Bondarev N.I., Sukhanova M.A., Reshetnyak O.V., Nosov A.M. // Biol. Plant. 47: 261–264, 2003/4. — 16. Kinghorn A.D., Soejarto D.D. // Crit. Rev. Plant Sci., 1986. V. 4. P. 79–120. — 17. Ladygin V.G., Bondarev N.I., Semenova G.A. et al. // Biol. Plant., 2008. V. 52(1). P. 9–16. — 18. Lichtenthaler H.K. // Fett/Lipid., 1998. V. 100. P. 128–138. — 19. Matsui M., Matsui K., Kawasaki Y. et al. // Mutagenesis, 1996. V. 11. P. 573–579. — 20. Murashige T., Skoog F. // Physiol. Plant., 1962. V. 15. P. 473–495. — 21. Zaidan L.B.P., Dietrich S.M.C., Felipe G.M. // Jap. J. of Crop Science, 1980. V. 49. P. 569–574.

Рецензент — д. б. н. И.Г. Тараканов

SUMMARY

The effects of photoperiod and light intensity on shoots development and steviolglycosides synthesis in *Stevia rebaudiana* Bertoni in vitro were studied. From 35 to 45 W/m² of light were found to be optimal. The light intensity optimal for intact plants is 2.5–3 times higher. The optimal day length for diploid is 16 hours, for tetraploid — is 20 hours.