

Bioaktyvių junginių kiekybinis įvertinimas liucernose (*Medicago L.*) ir jų kaliaus kultūrose *in vitro*

R. Laurinavičiūtė, I. Jonuškienė

Kauno technologijos universitetas

Radvilėnų pl. 19, LT-50254 Kaunas, Lietuva

El. paštas ruta_laurinaviciute@yahoo.com

crossref <http://dx.doi.org/10.5755/j01.ct.65.1.8717>

Gauta 2014 m. spalio 14 d.; priimta spaudai 2014 m. lapkričio 17 d.

Liucernos – tai vitaminų A, D, E ir K šaltinis. Augaluose taip pat yra daug fermentų, priešuždegiminių poveikį turinčių medžiagų, hormonų, β -karotino, vitamino B₆, vitamino C ir vitamino U. Liucerna turi taninų, pektino medžiagų, saponinų, aminų, kumarino darinių, triterpeno glikozidų, karotinoidų, purino bazių, augalų sterolių, fitoestrogenų, flavonų, izoflavonoidų ir fenolinių junginių.

Darbo tikslas – nustatyti ir atrinkti liucernų (*Medicago L.*) ir kaliaus kultūrų *in vitro* veisles, kaupiančias didžiausius bioaktyvių junginių kiekius.

Nustatyta, kad didžiausias chlorofilo *a* kiekis buvo įvertintas liucernų veislėje *Žydrūnė*, išaugintose *in vitro* Murashige-Skoog (MS) terpėje – $76,7 \pm 0,06$ mg/100g. Nustatyta, kad didžiausi bioaktyvių junginių kiekiai buvo liucernose, išaugintose *in vitro* MS terpėje: baltymų – veislėje *Antanė* ($32 \pm 0,07$ mg/100 mg); vitamino C – veislėje *Birutė* ($70,4 \pm 0,01$ mg/100 g); flavonoidų – veislėje *Malvina* ($1,5 \pm 0,01$ %); fenolinių junginių – veislėje *Antanė* ($0,07 \pm 0,01$ mg/100 mg). Didžiausias liucernų antioksidacinis aktyvumas prieš DPPH radikalą buvo nustatytas $22,3 \pm 0,01$ % liucernų veislėje *Žydrūnė*, o kaliaus kultūrose iš šaknų – $26,36 \pm 0,03$ % veislėje *Malvina*, išaugintose *in vitro* MS terpėje su 2,4-dichlorofenoksiacto rūgštimi (2 mg/l) ir kinetinu (0,25 mg/l).

Reikšminiai žodžiai: liucerna, kaliaus kultūra, bioaktyvūs junginiai, fitocheminis įvertinimas.

Įvadas

Liucernos (*Medicago L.*) priklauso ankštinių šeimai; jos geba fiksuoti atmosferos azotą dėl simbiozės tarp augalų ir bakterijų, kurios vystosi jų šaknų sistemoje [1]. Tai daugiamečiai arba vienmečiai žoliniai augalai.

Lietuvoje išvestos šios liucernos veislės:

Antanė – sukurta sukryžminus 16 augalų, atrinktų iš įvairių mėlynžiedžių liucernų veislių (*Birutė*, *Sverre*, *Eynsford*, *Radius* ir kt.) ir atlikus daugkartinę atranką izoliuotuose augynuose. Žaliųjų baltymų kiekis sausojoje medžiagoje yra 20,6 %. Šios veislės liucernos gerai žiemoja. Augalai aukšti, siekia 80 cm, atsparūs išgulimui. Vegetacijos periodo vidutinė trukmė – 161 diena. 2008 m. įrašyta į Nacionalinį augalų veislių sąrašą ir į Bendrąjį ES žemės ūkio augalų veislių katalogą.

Birutė – standartinė mėlynžiedžių ir hibridinių liucernų veislė Lietuvoje. Tai vidutinio ankstyvumo, margažiedė, derlinga, gerai žiemojanti, atspari ligoms veislė. Augalai vidutiniškai išauga iki 100 cm, vidutinio lapuotumo, atsparūs išgulimui. Šios veislės liucernos gerai auga gryname pasėlyje ar mišiniuose su varpinėmis žolėmis. Derlingesnė už veislę *Žydrūnė*. 1998 m. įrašyta į Nacionalinį augalų veislių sąrašą.

Malvina – veislė buvo sukurta daug kartų kryžminant kloną 62/82 su liucernų *Žydrūnė*, *Birutė*, *Vella* ir *Radius* veislėmis. Lapai sudarė 43,0 % bendro augalų žaliosios masės derliaus. Augalai gerai žiemoja. Augalų vidutinis aukštis sudaro 62 cm. Jie linkę išgulti, bet atsparūs ligoms. Jos augalų vegetacijos periodo vidutinė trukmė

160 dienų. Veislė 2006 m. įrašyta į Nacionalinį augalų veislių sąrašą.

Žydrūnė – vidutinio ankstyvumo veislė. Pasižymi dideliu ir stabilu derlingumu. Augalai vešlesni, mažiau išgula, geriau atželia pavasarį ir po pjūčių, pražysta ir subrandina sėklas 3–4 d. anksčiau nei *Augūnė II*. 1986 m. įrašyta į Nacionalinį augalų veislių sąrašą [2].

Liucernos – tai vitaminų A, D, E ir K šaltinis. Augaluose taip pat yra daug fermentų, priešuždegiminių poveikį turinčių medžiagų, hormonų, β -karotino, vitamino B₆, vitamino C ir vitamino U. Liucerna turi taninų, pektino medžiagų, saponinų, aminų, kumarino darinių, triterpeno glikozidų, karotinoidų, purino bazių, augalų sterolių, fitoestrogenų, flavonų, izoflavonoidų ir fenolinių junginių.

Liucernose yra daug bioaktyvių junginių, kuriuos sudėtinga analizuoti ir priskirti jiems gydomąsias savybes [3]. Biotechnologijoje liucerna naudojama farmacijos pramonėje. Iš liucernų gaminami rekombinantiniai glikoproteinai ir antikūnai. Augalų biofarmacijoje iš liucernų gaminami bioaktyvūs vaistai ir jos naudojamos monokloninių antikūnų diagnostikoje. Imuninėje medicinoje genetiškai modifikuota liucerna naudojama valgomųjų vakcinų gamybai [4].

Šio darbo naujumas susijęs su biotechnologiniu liucernų (lietuviškų veislių margažiedės: *Birutė*, *Žydrūnė* ir mėlynžiedės: *Antanė*, *Malvina*) ląstelių kultūrų auginimu ir dauginimu *in vitro*, biologiškai aktyvių junginių nustatymu. Šiems tyrimams pasirinktos mėlynžiedės ir margažiedės liucernos, nes baltymingų augalų auginimas ES sumažėjo dėl ekonominių

priežasčių [5], todėl būtina ieškoti priemonių, galinčių padidinti baltymingų augalų auginimą.

Šio darbo tikslas – nustatyti ir atrinkti liucernų (*Medicago* L.) ir kaliaus kultūrų *in vitro* veisles, kaupiančias didžiausius bioaktyvių junginių kiekius.

Siekiant darbo tikslo buvo iškelti šie uždaviniai:

- paruošti maitinamąsias terpes ir sudaiginti liucernas *in vitro* steriliomis sąlygomis;
- suformuoti liucernų kaliaus kultūras *in vitro*;
- nustatyti baltymų, askorbo rūgšties, chlorofilo *a* ir *b*, karotinoidų kiekius liucernos daiguose ir kaliaus kultūrose *in vitro*;
- įvertinti flavonoidų, bendrųjų fenolinių junginių kiekius liucernos daiguose ir kaliaus kultūrose *in vitro*;
- nustatyti antioksidacinį aktyvumą liucernos daiguose ir kaliaus kultūrose *in vitro*.

Medžiagos ir tyrimų metodikos

Tyrimai atlikti Kauno technologijos universiteto Cheminės technologijos fakulteto Organinės chemijos katedros Biotechnologijos laboratorijoje. Tiriamoji medžiaga – Lietuvoje išvestos liucernos veislės: *Antanė* (*Medicago sativa* L.), *Birutė* (*Medicago varia* Martyn), *Malvina* (*Medicago sativa* L.), *Žydrūnė* (*Medicago varia* Martyn), kurios buvo gautos iš Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centro Žemdirbystės instituto.

Atliekant tyrimą liucernos sėklos sterilizuojamos pamerkiant jas 2 min į 75 % C_2H_5OH , paskui 15 min mirkant 0,14 % $HgCl_2$ tirpale ir 3 kartus plaunant steriliu distiliuotu vandeniu. Darbas atliekamas aseptinėmis sąlygomis laminare „TELSTAR BV-100“. Sterilintos liucernos (*Medicago* L.) sėklos pasodintos į standartinę Murashige-Skoog (MS) agarizuotą maitinamąją terpę ($pH = 5,7$) laminare [6]. Laminaras dezinfekuojamas 15 min ultravioletiniais spinduliais ir valant 70 % C_2H_5OH . Daiginama visą parą apšviestoje aplinkoje, esant 20–22 °C temperatūrai. Liucernos (*Medicago* L.) sudygo po 7 dienų. Chlorofilas *a*, chlorofilas *b* ir karotinoidai buvo nustatyti po 14 dienų liucernose, išaugintose *in vitro* MS terpėje, o kiti augalai buvo panaudoti kaliaus kultūrai suformuoti. Biocheminiams tyrimams, išskyrus chlorofilo *a* ir chlorofilo *b* bei karotinoidų kiekių nustatymą, buvo panaudota sausa išdžiovinta medžiaga (45 °C temperatūroje, 3 val.).

Kaliaus kultūra (iš stiebelių, hipokotilių ir šaknų) buvo suformuota iš liucernų, išaugintų *in vitro*. Išskaidytos liucernos (*Medicago* L.) dalys, t. y. stiebeliai, šaknys ir hipokotiliai, pasodintos į *Petri* lėkšteles. Liucernos kaliaus kultūra *in vitro* buvo suformuota po 30 dienų maitinamose terpėse:

1. MS su 2,4-dichlorfenoksiacto rūgštimi (2,4-D) (2 mg/l) ir kinetinu (0,25 mg/l) (MS1) [7];
2. MS su 6-benzilaminopurinu (BAP) (0,5 mg/l), 1-naftilacto rūgštimi (NAR) (0,05 mg/l) ir kinetinu (0,25 mg/l) (MS2).

Tolesniems tyrimams buvo atrinkta maitinamoji terpė MS su 2,4-dichlorfenoksiacto rūgštimi (2,4-D) (2 mg/l) ir kinetinu (0,25 mg/l) (MS1), nes kitoje terpėje (MS2) liucernų kaliaus kultūrų formavimasis sudarė tik 10 %.

Chlorofilas *a*, chlorofilas *b* ir karotinoidai buvo nustatyti po 14 dienų liucernose, išaugintose *in vitro* MS terpėje.

Kaliaus kultūrų biocheminiai tyrimai buvo atlikti po 30 dienų auginimo.

Siekiant suformuoti liucernų veislės *Birutė* kaliaus kultūrą, išbandyti 9 sterilinimo būdai, tačiau liucernos veislė *Birutė* neformavo kaliaus kultūros *in vitro*.

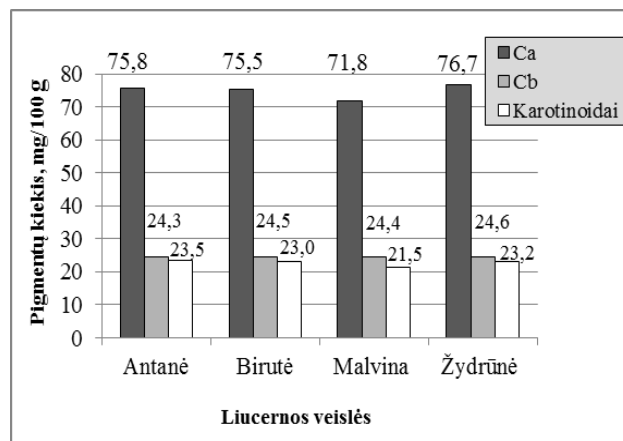
Chlorofilas *a* ir *b* bei karotinoidai nustatyti taikant kiekybinį spektrofotometrinį metodą [8]. Baltymų kiekis nustatytas taikant Bradfordo metodą [9]. Vitaminui C nustatyti taikytas metodas – askorbo rūgštis reagavo su 2,6-dichlorofenolindofenolio natrio druskos hidratu [10]. Flavonoidų kiekis nustatytas spektrofotometriškai [8]. Bendras fenolinių junginių kiekis nustatytas pagal oksidacijos-redukcijos principą ir naudojant Folino ir Ciocalteu reagentą [11]. Antioksidacinis aktyvumas liucernos daiguose ir kaliaus kultūroje nustatytas matuojant, kiek procentų stabilaus 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH) radikalo neutralizuoja fenoliniai junginiai [12].

Statistinis rezultatų įvertinimas. Gauti tyrimų duomenys buvo pakartoti tris kartus, statistiškai apdoroti ir įvertinti, skaičiuojant standartinę vidurkio paklaidą [13].

Rezultatai ir jų aptarimas

Chlorofilo *a* ir chlorofilo *b* bei karotinoidų kiekio įvertinimas liucernoje

Pigmentų (chlorofilo *a* ir chlorofilo *b* bei karotinoidų) kiekiams nustatyti buvo naudojami liucernų daigai, išauginti maitinamojoje MS terpėje ($pH = 5,7$) (1 pav.)



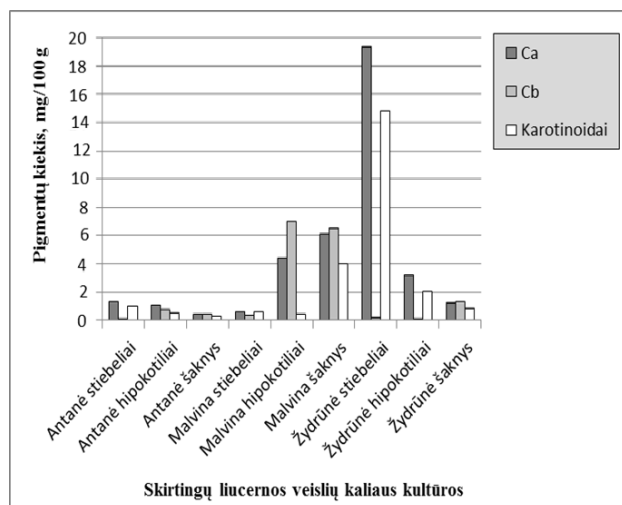
1 pav. Pigmentų kiekis skirtingų veislių liucernose *in vitro*: Ca – chlorofilas *a*, Cb – chlorofilas *b*

Iš gautų rezultatų (1 pav.) matyti, kad po 14 dienų liucernų auginimo didžiausias chlorofilo *a* kiekis buvo nustatytas liucernose *Žydrūnė*, išaugintose *in vitro* MS terpėje ($76,7 \pm 0,06$ mg/100 g), mažiausias – *Malvina* ($71,8 \pm 0,08$ mg/100 g). Didžiausias chlorofilo *b* kiekis buvo įvertintas liucernose *Žydrūnė* ($24,6 \pm 0,06$ mg/100 g), didžiausias karotinoidų kiekis – veislėje *Antanė* ($23,5 \pm 0,08$ mg/100 g), išaugintose *in vitro* MS terpėje.

Chlorofilo *a* ir chlorofilo *b* bei karotinoidų kiekio įvertinimas liucernos kaliaus kultūroje

Pigmentai taip pat buvo nustatyti liucernos kaliaus kultūrose po 30 dienų, suformuotose *in vitro* MS terpėje su 2,4-dichlorfenoksiacto rūgštimi (2,4-D) (2 mg/l) ir kinetinu (0,25 mg/l).

Tyrimo rezultatai parodė (2 pav.), kad didžiausias chlorofilo *a* kiekis buvo nustatytas liucernų *Žydrūnė* kaliaus kultūrose iš stiebelių ($19,4 \pm 0,18$ mg/100 g), mažiausias – veislėje *Antanė* kaliaus kultūrose iš šaknų ($0,4 \pm 0,01$ mg/100 g), t. y. jo kiekis buvo 19 mg mažesnis nei veislėje *Žydrūnė*.

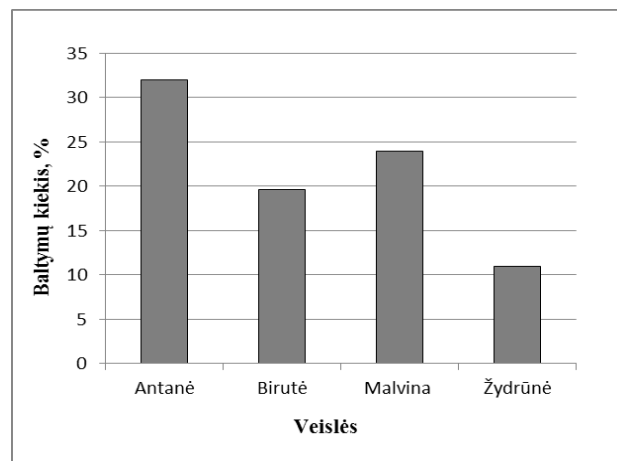


2 pav. Pigmentų kiekis skirtingų liucernos veislių kaliaus kultūrose

Didžiausias chlorofilo *b* kiekis buvo nustatytas liucernų *Malvina* kaliaus kultūrose iš hipokotilių ($7,00 \pm 0,05$ mg/100 g), o mažiausias – *Žydrūnė* kaliaus kultūrose iš hipokotilių ($0,07 \pm 0,02$ mg/100 g), t. y. jo kiekis buvo 6,93 mg mažesnis nei *Malvina* kaliaus kultūrose. Didžiausias karotinoidų kiekis buvo gautas veislėje *Žydrūnė* kaliaus kultūrose iš stiebelių ($14,8 \pm 0,1$ mg/100 g), o mažiausias karotinoidų kiekis – *Antanė* kaliaus kultūrose iš šaknų ($0,3 \pm 0,07$ mg/100 g), t. y. jų kiekis buvo 14,5 mg mažesnis nei *Žydrūnėje*.

Liucernos daigai pasižymėjo didesniu pigmentų (chlorofilo *a* ir chlorofilo *b* bei karotinoidų) kiekiu nei liucernos kaliaus kultūros. Didžiausias chlorofilo *a* kiekis buvo įvertintas veislėje *Žydrūnė*, išaugintoje *in vitro* Murashige-Skoog (MS) terpėje, kuris buvo 4 kartus didesnis, palyginti su kaliaus kultūromis iš stiebelių veislėje *Žydrūnė*.

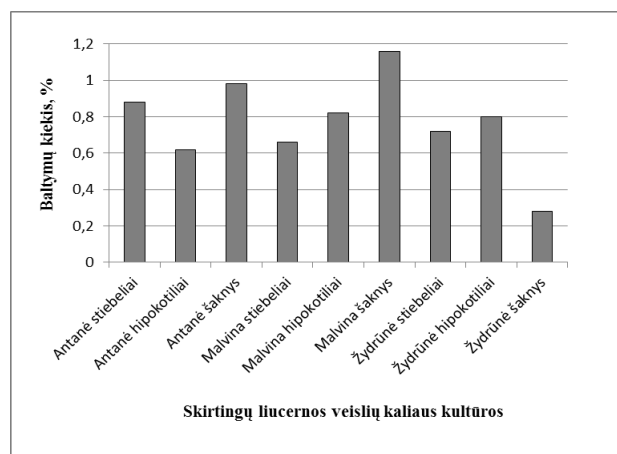
Baltymų kiekio įvertinimas liucernose, augintose MS terpėje *in vitro*



3 pav. Baltymų kiekis skirtingose liucernos veislėse

Iš gautų rezultatų matyti (3 pav.), kad didžiausias baltymų kiekis buvo nustatytas liucernose *Antanė*, išaugintose MS terpėje ($32 \pm 0,7$ %), o mažiausias – veislėje *Žydrūnė* ($11 \pm 0,5$ %), t. y. jų kiekis buvo 3 kartus mažesnis nei veislėje *Antanė*. Iš literatūros yra žinoma, kad liucernose yra 15–22 % baltymų [6].

Baltymų kiekio įvertinimas liucernų kaliaus kultūrose, augintose MS terpėje *in vitro*

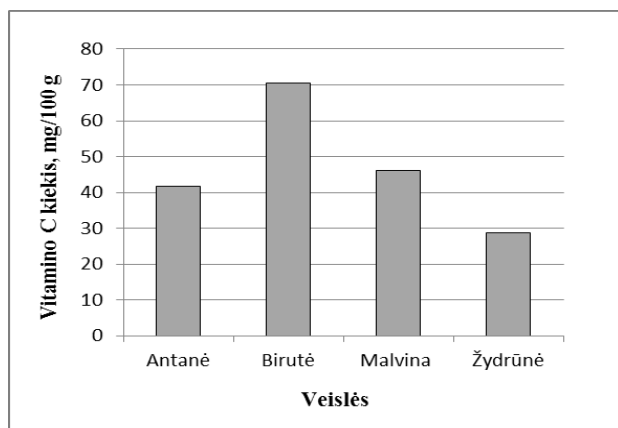


4 pav. Baltymų kiekis skirtingų liucernos veislių kaliaus kultūrose

Iš rezultatų (4 pav.) matyti, kad didžiausi baltymų kiekiai kaliaus kultūrose buvo nustatyti iš stiebelių ($0,88 \pm 0,09$ %) veislėje *Antanė*, iš hipokotilių ($0,82 \pm 0,06$ %) ir iš šaknų ($1,16 \pm 0,05$ %) veislėje *Malvina*.

Gauti rezultatai (3–4 pav.) parodė, kad liucernos daigai *in vitro* kaupė gerokai daugiau baltymų nei kaliaus kultūros.

Askorbo rūgšties kiekio įvertinimas liucernose, augintose MS terpėse *in vitro*

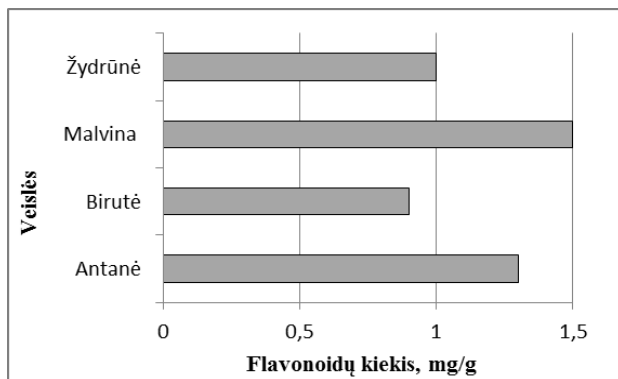


5 pav. Askorbo rūgšties kiekis skirtingų veislių liucernose *in vitro*

Iš gautų rezultatų nustatyta (5 pav.), kad didžiausias askorbo rūgšties kiekis buvo įvertintas liucernose *Birutė* ($70,4 \pm 0,01$ mg/100 g), o mažiausias – veislėje *Žydrūnė* ($28,6 \pm 0,01$ mg/100 g), t. y. jos kiekis buvo 41,8 mg mažesnis nei veislėje *Birutė*.

Flavonoidų kiekio nustatymas skirtingose liucernos veislėse

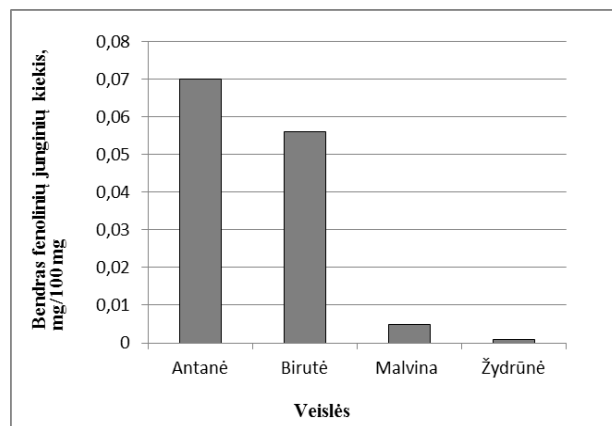
Flavonoidų kiekis liucernose buvo nustatytas pagal hiperozidą [8].



6 pav. Flavonoidų kiekio įvertinimas skirtingose liucernos veislėse

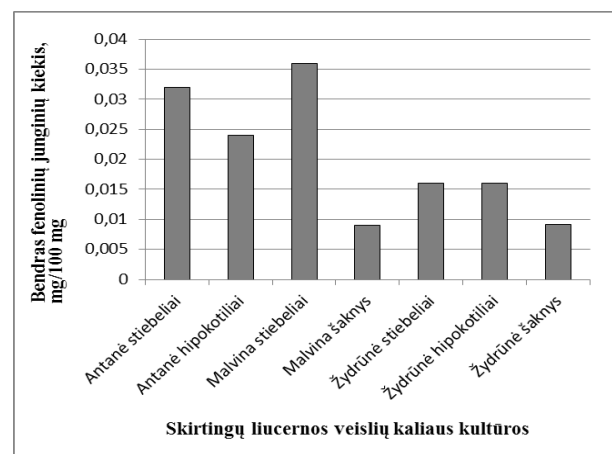
Tyrimo rezultatai (6 pav.) parodė, kad didžiausias flavonoidų kiekis buvo nustatytas liucernose *Malvina*, išaugintose *in vitro* MS terpėje ($1,5 \pm 0,01$ mg/g), o mažiausias – veislėje *Birutė* ($0,9 \pm 0,01$ mg/g). Iš literatūros yra žinoma, kad flavonoidų kiekis liucernose *in vivo* yra 10,32 mg/g [14].

Bendras fenolinių junginių kiekio įvertinimas liucernose



7 pav. Bendrųjų fenolinių junginių kiekis skirtingose liucernos veislėse

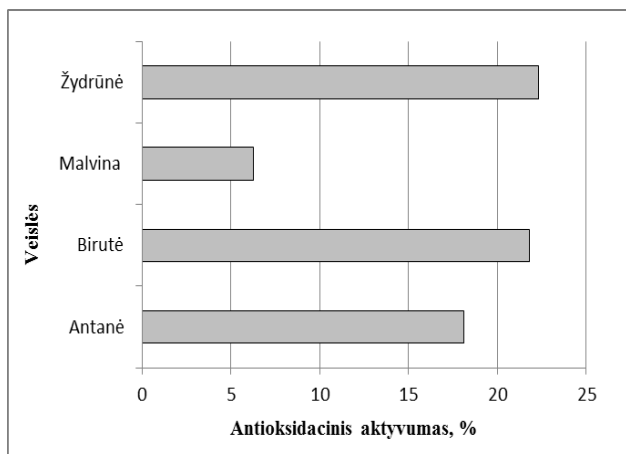
Iš gautų tyrimo duomenų (7 pav.) matyti, kad didžiausias fenolinių junginių kiekis buvo nustatytas liucernose *Antanė*, kurios buvo išaugintos *in vitro* MS terpėje ($0,07 \pm 0,01$ mg/100 mg).



8 pav. Bendrųjų fenolinių junginių kiekis skirtingų liucernos veislių kaliaus kultūrose

Didžiausias fenolinių junginių kiekis kaliaus kultūrose (8 pav.) buvo nustatytas iš stiebelių veislėje *Malvina* ($0,036 \pm 0,005$ mg/100 mg), iš hipokotilių veislėje *Antanė* ($0,024 \pm 0,005$ mg/100 mg), iš šaknų veislėje *Žydrūnė* ($0,0092 \pm 0,001$ mg/100 mg).

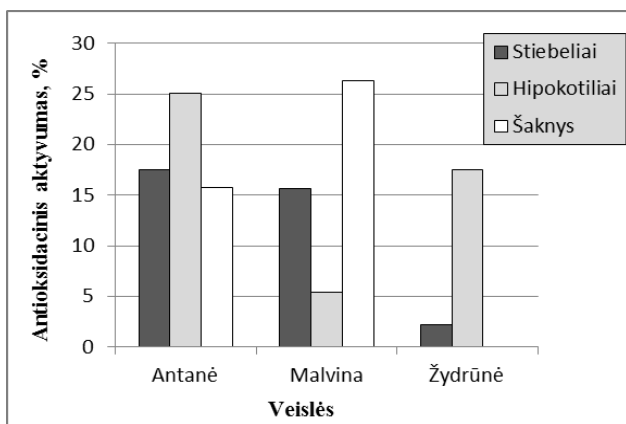
Antioksidacinio aktyvumo prieš DPPH įvertinimas



9 pav. Skirtingų liucernos veislių antioksidacinis aktyvumas

Iš rezultatų (9 pav.) matyti, kad didžiausias liucernų antioksidacinis aktyvumas prieš DPPH stabilų radikalą buvo nustatytas $22,3 \pm 0,01$ % veislėje *Žydrūnė*, t. y. aktyvumas buvo 3,5 karto didesnis nei veislėje *Malvina*.

Antioksidacinio aktyvumo prieš DPPH įvertinimas liucernos kaliaus kultūrose



10 pav. Skirtingų liucernos veislių kaliaus kultūrų antioksidacinis aktyvumas

Iš gautų tyrimo duomenų (10 pav.) matyti, kad didžiausias liucernų antioksidacinis aktyvumas prieš DPPH stabilų radikalą kaliaus kultūrose buvo nustatytas iš stiebelių – $17,58 \pm 0,07$ %, iš hipokotilių – $25,13 \pm 0,02$ % veislėje *Antanė*, iš šaknų – $26,36 \pm 0,03$ % veislėje *Malvina*.

Liucernos kaliaus kultūros pasižymėjo didesniu antioksidaciniu aktyvumu nei liucernos daigai. Didžiausias antioksidacinis aktyvumas buvo kaliaus kultūrose iš šaknų veislėje *Malvina*, kuris buvo 4,14 karto didesnis nei liucernos tos pačios veislės daiguose.

Išvados

1. Nustatyta, kad liucernos daigai *in vitro* turėjo daugiau pigmentų (chlorofilo *a* ir chlorofilo *b* bei karotinoidų) nei liucernos kaliaus kultūros.
2. Ištirta, kad didžiausias baltymų kiekis buvo nustatytas liucernų veislėje *Antanė*, išaugintoje *in vitro* MS terpėje ($32 \pm 0,07$ %).
3. Nustatyta, kad didžiausias askorbo rūgšties kiekis buvo įvertintas liucernų veislėje *Birutė* ($70,4 \pm 0,01$ mg/100 g), o flavonoidų kiekis – veislėje *Malvina* ($1,5 \pm 0,01$ mg/g), išaugintose *in vitro* MS terpėje.
4. Gauta, kad liucernos kaliaus kultūros pasižymėjo didesniu antioksidaciniu aktyvumu nei liucernos daigai.

Padėka

Tyrimą finansavo Lietuvos mokslo taryba (sutarties Nr. F5-90-1260/SMT 14P-035).

Literatūra

1. Scientific Opinion of the Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies on a request from the European Commission on the safety of Alfalfa protein concentrate as food // The EFSA Journal. 2009. Vol. 997. P. 1–19.
2. **Bivilienė A.** Lietuvoje augančių daugiamečių žolių genetinė įvairovė: Lietuvos augalų nacionaliniai genetiniai ištekliai. Akademija, Spaudvita, 2010. 28–29 p.
3. **Caunii A., Pribac G., Grozea I., Gaitin D., Samfira I.** Design of optimal solvent for extraction of bio-active ingredients from six varieties of *Medicago sativa* // Chemistry Central Journal. 2012. Vol. 123. N 6. P. 1–3.
4. **Nikkhah A.** On Alfalfa Bioengineering of Humans, Plants and Animals: The Tool and the Target // Austin Journal of Biotechnology & Bioengineering. 2014. Vol. 1. N 1. P. 1.
5. **Häusling M.** Pranešimo projektas dėl baltymų deficito ES: kaip išspręsti šią ilgalaikę problemą? Europos Parlamentas, Žemės ūkio ir kaimo plėtros komitetas. 2010. P. 10.
http://www.europarl.europa.eu/meetdocs/2009_2014/documents/agri/pr/837/837708/837708lt.pdf
6. **Lapiņa L., Grauda D., Jansone B., Jansons A., Rashal I.** Restoration of Latvian alfalfa (*Medicago sativa*) genetic resources perspective for breeding. Environment. Technology. Resources. 2009. Vol. 1. P. 166–168.
7. **Walton P. D., Brown D. C. W.** Screening of *Medicago* wild species for callus formation and the genetics of somatic embryogenesis // J. Genet. 1988. Vol. 67. N 2. P. 95–100.
8. **Daunoras G.** Farmokopėjos straipsnių rinkinys. Kaunas, Kauno medicinos universitetas, 2001. 203 p.
9. **Silva A. L. C., Caruso C. S., Moreira R. A., Horta A. C. G.** Growth characteristics and dynamics of protein synthesis in callus cultures from *Glycine wightii* (Wight & Arn.) Verdc. // Ciência e Agrotecnologia. 2005. Vol. 29. N 6. P. 1161–1166.
<http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542005000600009>
10. **Nicolaev O., Dupouy E., Mija N.** The content of the vitamin C and β-carotene in nettle and ramsons and its modifications at culinary treatment and drying // The

Annals of the University Dunarea de Jos of Galati, Fascicle IV. Food Technology. 2007. P. 23–26.

11. **Makkar H. P. S., Siddhuraju P., Becker K.** Plant secondary metabolites. Humana Press Inc., 2007. 74–79 p.
12. **Wang Y. L., Wang X. D., Zhao B., Wang Y. C.** Enhancing antioxidative capacity of *Lepidium meyenii* calli by addition of methyl salicylate to culture medium // Acta Physiol Plant. 2007. Vol. 29. P. 417–423.
<http://dx.doi.org/10.1007/s11738-007-0050-5>
13. **Slapšytė G., Paulauskas A., Morkūnas V.** Genetikos praktikumas. Vilnius, 2000. 82 p.
14. **Golawska S., Łukasik I., Gołowski A., Kapusta I., Janda B.** Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Apigenin Glycosides and Their Effect on the Pea Aphid (*Acyrtosiphon pisum*) // Polish J. of Environ. 2010. Vol. 19. N 5. P. 913–919.

R. Laurinavičiūtė, I. Jonuškienė

QUANTITATIVE EVALUATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS IN ALFALFA (*MEDICAGO* L.) AND THEIR CALLUS CULTURES *IN VITRO*

Summary

Alfalfa (*Medicago sativa* L. (Fabaceae)) is an important crop which accumulates vitamins A, D, E, and K. In addition to the nutritional components (proteins and carbohydrates) which are important in the use of alfalfa and other plants as animal feed or food supplements, the plants produce a variety of secondary metabolites. Alfalfa contains numerous secondary metabolites, but they are not yet fully characterized. The best studied secondary metabolite groups in alfalfa are carotenoids and saponins. Another important group of secondary metabolites in alfalfa are phenolic compounds. Phenolic compounds in plants include flavonoids. Flavonoids are usually found in plants as glycosides, i. e. provided with sugar substituents such as galactose, rhamnose or glucose, or

glycoside malonates, and they are found in an almost bewildering diversity of forms. Biotechnological research has revealed additional benefits for the production of pharmaceuticals from alfalfa.

The aim of the present research was to identify and select alfalfa (*Medicago* L.) and callus cultures *in vitro* varieties which accumulate the highest amount of bioactive compounds.

The main objects:

- to prepare nutrient media and to germinate alfalfa *in vitro*;
- to form alfalfa callus cultures *in vitro*;
- to determine proteins, ascorbic acid, chlorophyll *a* and *b*, carotenoids in alfalfa seedlings and callus cultures *in vitro*;
- to determine the content of flavonoids, total phenolic compounds in alfalfa seedlings and callus cultures *in vitro*;
- to determine the antioxidant activity of alfalfa seedlings and callus cultures *in vitro*.

The highest content of chlorophyll *a* was found in alfalfa *Zydrune* plants grown in a Murashige and Skoog (MS) medium – 76.7 ± 0.06 mg/100 g. The highest amounts of bioactive compounds were noted in alfalfa grown in an MS medium *in vitro*: protein in the cultivar *Antane* (32 ± 0.07 %), ascorbic acid in the cultivar *Birutė* (70.4 ± 0.01 mg/100 g), flavonoids in the cultivar *Malvina* (1.5 ± 0.01 mg/g); and phenolic compounds in the cultivar *Antane* (0.07 ± 0.01 mg/100 mg). The highest antioxidant activity against the stable DPPH radical (22.3 ± 0.01 %) was found in the cultivar *Zydrune*, and in callus culture from roots (26.36 ± 0.03 %) in the cultivar *Malvina* plants grown in the MS with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (2 mg/l) and kinetin (0.25 mg/l) medium. It was determined that the highest content of bioactive compounds were accumulated in alfalfa *in vitro* in the cultivars *Antane* and *Zydrune* and in callus cultures from roots in *Malvina*. Also, alfalfa seedlings *in vitro* contained more bioactive compounds in comparison with callus cultures.