



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 581.9:582.4:633.88:634.1:635.9:547.4:575.13:577.21

СОХРАНЕНИЕ РЕГЕНЕРАТИВНЫХ СПОСОБНОСТЕЙ КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР АЯНИИ КУСТАРНИЧКОВОЙ ПОСЛЕ ДЕПОНИРОВАНИЯ*Г.К. Асанова, А.Ж. Куандыкова, К.Ж. Жамбакин, М.А. Абдыкалыков, С.М. Адекенов*

E-mail: phytoinform@nursat.kz

АО «Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия», РК, г. Караганда

Институт биологии и биотехнологии растений

РГП «Национальный Центр биотехнологии РК», г. Алматы

В статье представлены результаты оптимизации условия замедления ростовой активности культуры клеток аянии кустарничковой (*Ajania fruticulosa* (Ldb) Poljak). Показано сохранение жизнеспособности каллусных тканей исследованного вида растений после депонирования в течение 6-30 месяцев на 50%-ной и 100%-ной среде МС при низких положительных температурах. Определено преимущество в сохранении жизнеспособности каллусных тканей высоких концентраций сахарозы (5, 10, 15%), совместном использовании сахарозы и маннита, а также низких концентрациях салицилата натрия.

Исследовано влияние фотопериода, минерального и углеводного питания на регенерационные способности эмбриоидов. Наиболее выраженная регенерация отмечалась у эмбриоидов изучаемого вида на среде МС с 50%-ным содержанием солей, без добавления фитогормонов. Для микрорастений наиболее лучшим субстратом явился перлит. Растения-регенеранты постепенно адаптировали к закрытому грунту, затем к открытому грунту.

Введение

При получении клеточных линий с полезными признаками встает проблема сохранения этих признаков. Растения могут хранить генетическую информацию в семенах, однако этот источник не вполне надежен, так как со временем из-за мутации всхожесть семян падает. Кроме того, некоторые растения размножаются только вегетативно. Этим обусловлена необходимость сохранения части материала *in vitro*. С другой стороны, в некоторых случаях удается получить новые клеточные линии, синтезирующие большое количество вторичных метаболитов, то есть продуктивные, которые тоже нуждаются в сохранении. Можно, конечно, пассировать клеточные культуры. Однако при этом возникает опасность соматической изменчивости, накопления мутаций, контаминаций (заражения чужеродным генетическим материалом). Это также требует определенных финансовых и

трудовых затрат (необходимость частных пересадок, расходы, связанные со средой и т.д.). Задачей наших исследований является увеличение интервала между пересадками. К сохранению клеточных культур применили следующие подходы: криобанки и медленно растущие ткани.

В настоящее время методические подходы, используемые для сохранения генофонда растений, можно разделить на две группы: 1) хранение биологических объектов, замедляя процессы их роста (медленно растущие коллекции *in vitro*); 2) хранение при остановке роста (криосохранение).

Депонирование в условиях пониженного метаболизма позволяет сохранить генофонд клеточных штаммов и видов, а в случае мериклонов – и отдельных генотипов. Для сохранения культуры в состоянии роста необходимо изменять кинетику роста, т.е. максимально его замедлить. Основной целью при создании растущих коллекций должно быть сохранение физиологической



стабильности (жизнеспособности) [1]. С этой целью используют различные приемы – снижение температуры культивирования, сокращение степени освещенности, введение в питательные среды веществ тормозящих рост культур [2, 3].

Аяния кустарничковая (*Ajania fruticulosa* (Ldb) Poljak.) – многолетнее растение, используемое в народной медицине, экстракт которого обладает ценными фармакологическими свойствами (миотропное, спазмолитическое, диуретическое, сосудорасширяющее действия). Фитохимическое изучение аянии кустарничковой показало наличие сесквитерпеноидов аянолида А, артеглазина А и кетопеленолида В, обладающих также антивирусной, антимикробной и антиоксидантной активностью [4-6]. Необходимость биологического изучения данного вида определяется, прежде всего, ограниченностью его природных запасов, с учетом использования аянии кустарничковой в медицине.

Материалы и методы

Объектом исследования является: аяния кустарничковая. Пересадку культивируемого объекта проводили в ламинар-боксе ЛБ-Г с продувкой стерильным воздухом. Культивационные среды стерилизовались в автоклаве при 1 атмосферы в течение 20 мин. Культивирование проводили в чашках Петри диаметром 120 мм в световом шкафу с фотопериодом 16 часов при комнатной температуре.

Семена растений аянии кустарничковой были собраны в ходе экспедиционных выездов.

В экспериментах по культивированию клеток и тканей растений использовались методы, описанные в монографиях Р.Г. Бутенко [7], Ф.Л. Калинин и др. [8].

В качестве фитогормонов использовали ауксин – 3β-индолилуксусную кислоту (ИУК) и цитокинин – 6-бензиламинопурин (БАП).

Скорость роста каллусных тканей оценивали по значению ростового индекса (РИ), вычисляемого по формуле:

$$РИ = \frac{W_1 - W_0}{W_0} \times 100\%,$$

где W_0 – начальная масса экспланта; W_1 – масса каллуса, в конце цикла культивирования [9].

Для минимализации роста каллусных тканей исследуемого вида использовали полную и половинную среду Мурасиге и Скуга с добавлением сахарозы и осмотических ингибиторов маннита и салицилата натрия в различных комбинациях и концентрациях, а также фитогормоны в концентрациях, оптимальных для этого вида. Ткани депонировали при температуре +5°C. Хранение каллусов при низких положительных температурах осуществляли в течение 6–30 месяцев. Наблюдения проводили через каждые 6 месяцев, перенося каллусные ткани в нормальные условия культивирования. После депонирования каллусные ткани пассировали на стандартную питательную среду МС, содержащую 3% сахарозы и фитогормоны (ИУК – 2 мг/л; БАП – 0,5 мг/л).

Для адаптации растений-регенерантов их высаживали в пикировочные стаканчики с различным субстратом: песок, торф, смесь песка и торфа в соотношениях 1:1, перлит и смесь чернозема с песком 2:1.

Для высадки растений в открытый грунт разбивали делянки. Грунт песчаный, при обработке добавили перегной навоза в расчете 3-5 кг на квадратный метр, глубина предпосадочной вспашки 25 см на момент посадки температура грунта 19,5°C, влажность 72%.

Результаты и обсуждение

Минимализация роста каллусных тканей аянии кустарничковой

Для минимализации роста каллусных тканей аянии кустарничковой необходимо было отработать оптимальные условия депонирования с использованием в составе питательной среды различных концентраций ретардантов.



Получены данные о замедлении роста каллусных тканей исследуемого вида в процессе депонирования при низких положительных температурах в течение от 6 до 30 месяцев на 50- и 100%-ной среде

МС (таблица 1, 2). Результаты наблюдений показали что, на 50%-ной среде Мурасиге и Скуга каллусные ткани сохраняли и восстанавливали жизнеспособность лучше по сравнению со 100%-ной средой МС.

Таблица 1

Замедление роста каллусных тканей аянии кустарничковой на 100%-ной среде Мурасиге и Скуга при температуре +5°C

Реторданты			Нарост					
сахароза	маннит	салицилат натрия	через 1 месяц	6 месяцев	12 месяцев	18 месяцев	24 месяца	30 месяцев
5	-	-	*	**	**	***	****	некроз
10	-	-	*	**	**	***	****	некроз
15	-	-	*	*	*	**	***	некроз
20	-	-	*	*	*	**	некроз	-
5	0,8	-	*	*	**	**	****	***
5	1,5	-	*	*	**	**	****	****
5	2	-	*	*	**	**	***	***
-	1	-	*	*	*	*	*	**
-	2	-	*	*	*	*	*	**
-	3	-	*	*	*	*	*	**
3	-	0,1	*	**	**	***	****	некроз
3	-	100	*	*	*	*	некроз	-
Сахароза 3% (контроль)			*	некроз	-	-	-	-

Примечание: * - низкий (5-10%); ** - ниже среднего (15-35%); *** - средний (40-55%); **** - выше среднего (60-75%)

Таблица 2

Замедление роста каллусных тканей аянии кустарничковой на 50%-ной среде Мурасиге и Скуга при температуре +5°C

Реторданты			Нарост					
сахароза	маннит	салицилат натрия	через 1 месяц	6 месяцев	12 месяцев	18 месяцев	24 месяца	30 месяцев
5	-	-	*	***	***	****	*****	некроз
10	-	-	*	**	***	****	*****	некроз
15	-	-	*	**	**	***	****	некроз
20	-	-	*	*	*	**	**	некроз
5	0,8	-	*	**	***	****	****	****
5	1,5	-	*	**	***	***	****	****
5	2	-	*	**	**	***	****	****
-	1	-	*	*	*	*	*	**
-	2	-	*	*	*	*	*	**
-	3	-	*	*	*	*	*	**
3	-	0,1	*	*	**	***	****	некроз
3	-	100	*	*	*	*	некроз	-
Сахароза 3% (контроль)			*	некроз	-	-	-	-

Примечание: * - низкий (5-10%), ** - ниже среднего (15-35%), *** - средний (40-55%), **** - выше среднего (60-75%); ***** - высокий (80-95%)

В большей степени замедление ростовых характеристик тканей аянии кустарничковой происходит на среде с маннитом и салицилатом натрия, причем более низкая

концентрация салицилата натрия в меньшей степени тормозит рост каллусной ткани. Совместное использование сахарозы и маннита приводит к значительному тор-



можению ростовых характеристик каллусной ткани данного вида, при этом чем выше концентрация маннита, тем больше степень тормозящего эффекта.

Важным показателем при выборе условий хранения культур клеток является не только снижение роста, но и сохранение жизнеспособности каллусных тканей после депонирования, т.е. возможность восстановления жизненных функций после перевода в нормальные условия.

Восстановление ростовой активности каллусных тканей аянии кустарничковой лучше всего происходит после культивирования на 5-, 10-, 15%-ной сахарозе, на салицилате натрия и совместном использовании 5%-ной сахарозы и 1,5-, 2%-ной маннита. Медленнее всего ткани аянии кустарничковой возвращаются к нормальному росту после депонирования на среде с маннитом. После 6, 12 и 18 месяцев хранения рост и морфология тканей восстанавливались быстрее, нежели после 24-30 месяцев беспересадочного культивирования.

В результате проведенного эксперимента определено, что используемые ретарданты способствуют сохранению жизнеспособности каллусных тканей, тогда как на обычной питательной среде в контроле ткани погибли через 60 суток.

Получение эмбриогенной каллусной ткани аянии кустарничковой

Задачей данного этапа работы было изучение влияния фитогормонов на регенерацию и рост каллусной ткани аянии кустарничковой.

Нами проведены ряд экспериментов по изучению влияния различных сочетаний ауксинов и цитокининов на регенерационную способность культуры каллусной ткани аянии кустарничковой. Было исследовано 25 различных вариантов сочетания (таблица 3).

По наблюдениям за отзывчивостью каллусной ткани были получены эмбриониды на средах с ИУК:БАП 2:0,5; 2,5:0,5 и 2,5:0,7 мг/л.

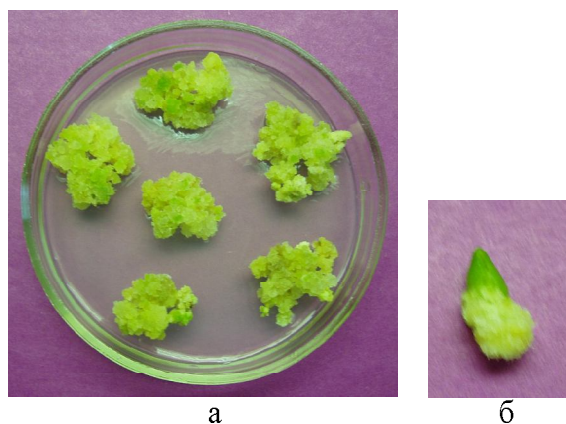
Таблица 3

Влияние сочетания ИУК и БАП на морфогенез каллусной ткани аянии кустарничковой

ИУК мг/л \ БАП мг/л	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5
0,1	каллус	каллус	каллус	каллус	каллус
0,3	каллус	каллус	каллус	каллус	каллус
0,5	-	каллус	каллус	эмбриониды	эмбриониды
0,7	-	-	каллус	каллус	эмбриониды
0,9	побеги	-	-	-	каллус

В качестве исходного состава для получения регенерантов была выбрана среда с сочетанием ИУК 2 мг/л и БАП 0,5 мг/л. На данном сочетании фитогормонов происходит полное созревание эмбрионидов.

Каллусные ткани аянии кустарничковой можно характеризовать как эмбриогенную, но для полного созревания эмбрионидов необходимо переводить на среду, содержащую более высокую концентрацию БАП – 0,5 мг/л (рис. 1).



а) эмбриогенный каллус;
б) зрелый эмбрионид на последней стадии развития

Рис. 1. Эмбриогенная каллусная ткань аянии кустарничковой



Таким образом, получены эмбриогенные каллусные ткани аянии кустарничковой и отработаны условия культивирования. Для культивирования эмбриогенной ткани аянии кустарничковой необходимо использовать сочетание фитогормонов ИУК 2 мг/л и БАП 0,1 мг/л, а для формирования и созревания эмбриоидов ИУК 2 мг/л и БАП 0,5 мг/л.

Получение растений-регенерантов аянии кустарничковой

На данном этапе работ была проведена оптимизация условий для получения целых растений-регенерантов (с 15 февраля). Исследовали влияние фотопериода, минерального и углеводного питания на регенерационные способности эмбриоидов.

Наиболее выраженная регенерация отмечалась у эмбриоидов изучаемого вида на среде МС с 50%-ным содержанием солей, без добавления фитогормонов. Происходило активное образование побегов и зеленых листьев. Добавление в среду ауксинов приводит к более бурному образованию корней и угнетению роста побегов. Результаты эксперимента указывают на то, что зрелые эмбриоиды способны синтезировать эндогенные гормоны, и для формирования полноценного растения нет необходимости в использовании экзогенных фитогормонов.

При изучении влияния сахарозы использовали концентрации от 0 до 3% в среде. На среде с половинным содержанием сахарозы наблюдаются условия, при которых образуется оптимальное количество корней и побегов у аянии кустарничковой.

Для изучения влияния освещения на морфогенез был поставлен эксперимент в трех вариантах: 24-, 12-часовое освещение и отсутствие освещения. При 12-часовом чередовании освещения и темноты происходит равномерное формирование проростков и корней.

При изучении влияния фотопериода на формирование растений-регенерантов из отдельных зрелых эмбриоидов была

выявлена положительная динамика при формировании целых растений. При 12-часовом фотопериоде формировались нормальные растения (рис. 2).



Рис. 2. Пробирочные растения-регенеранты аянии кустарничковой

Адаптация растений регенерантов аянии кустарничковой к грунту

При пересадке микрорастений из асептических условий в рассадочные горшки приживаемость растений аянии кустарничковой на торфяно-песчанной смеси в соотношении (1:1) составляет $53 \pm 2,8$, на перлите $97 \pm 1,1$. Для полной адаптации микрорастений к условиям закрытого грунта необходимо первоначально высаживать на перлит, а затем в торфяно-песчаный грунт (рис. 3). Наиболее лучшим субстратом явился перлит, так как частицы перлита не имеют острых граней, которые повреждают корни и при взаимодействии с влагой они образуют гелеобразную структуру, которая оптимально подпитывает растения. При умеренном поливе один раз в неделю рассада на песке гибнет от пересыхания, а на торфе от излишней влаги начинается гниение корневой системы. На следующей стадии акклиматизации рассаду переносили в горшки со смесью чернозема с песком в соотношении 2:1. С 15 мая рассаду аянии кустарничковой ежедневно выносили на улицу, сначала на 2 часа, через неделю на 8



часов, с 9 до 17 часов. С 1 июня растения полностью оставались на улице.



Рис. 3. Растения-регенеранты аянии кустарничковой в закрытом грунте

В открытый грунт было высажено 30 экземпляров аянии кустарничковой. Первые 15 дней наблюдалось увядание побегов, поэтому полив проводили ежедневно. Затем, после первых двух недель, полив осуществляли через день. Высаженные растения аянии кустарничковой хорошо прижились (кроме 3-х экземпляров), сформировались кусты (рис. 4). Аяния кустарничковая в августе месяце вступила в фазу формирования генеративных побегов и цветения.



Рис. 4. Растения-регенеранты аянии кустарничковой, высаженные в открытый грунт

Выводы

Получены результаты о преимуществе в сохранении жизнеспособности каллусных тканей аянии кустарничковой при концентрации сахарозы (5-10%), совместном использовании сахарозы и маннита, а также низких концентрациях салицилата натрия.

Показано, что на 1-, 2-, 3%-ной концентрации маннита в процессе депонирования рост тканей значительно снижается, но после переноса в нормальные условия восстановление жизнеспособности идет тяжело.

Определено, что для депонирования каллусной ткани аянии кустарничковой в коллекции *in vitro* оптимальным является совместное использование низких положительных температур +5°C и введение в питательную среду либо сахарозы 5% и маннита 1,5, 2%, либо сахарозы 5, 10, 15%, либо салицилата натрия в концентрации 0,1%, и можно рекомендовать ее для поддержания коллекции.

Установлено, что на 50%-ной среде Мурасиге и Скуга каллусные ткани сохраняли и восстанавливали жизнеспособность лучше по сравнению со 100%-ной средой МС.

Получены эмбриогенные каллусные ткани аянии кустарничковой и отработаны условия культивирования.

Определено, что для культивирования эмбриогенной ткани аянии кустарничковой необходимо использовать сочетание фитогормонов ИУК 2 мг/л и БАП 0,1 мг/л, а для формирования и созревания эмбриоидов ИУК 2 мг/л и БАП 0,5 мг/л.

Отмечено, что наиболее выраженная регенерация отмечалась у эмбриоидов изучаемого вида на среде МС с 50%-ным содержанием солей и сахарозы, без добавления фитогормонов, при 12-часовом фотопериоде.

Выявлено, что в качестве субстрата в закрытом грунте для аянии кустарничковой подходит перлит.

В итоге в открытом грунте получены растения-регенеранты аянии кустарничковой.



Литература

1. Митрофанова И.В. Минимализация роста декоративных растений под воздействием химических факторов в культуре *in vitro* // Материалы Международной конференции «Биология клетки *in vitro* и биотехнология». – Саратов, 2003. - С. 202-203.
2. Renau-Morata B., Renau-Morata I., Arrillaga J. Segura *In vitro* storage of cedar shoot cultures under minimal growth conditions // *Journal of Experimental Botany*. - 2000. - V.51, №351. - P. 1679-1986.
3. Mino Divakaran. Conservation of Vanilla species, *in vitro* // *Scientia Horticulturae*. - 2006. - V. 110. - №2. - P. 175-180.
4. Адекенов С.М. Биологически активные вещества растений и перспективы создания новых лекарственных препаратов // Сб. науч. тр. «Развитие фитохимии и перспективы создания новых лекарственных препаратов». Книга 2. - Биологически активные вещества из растений, их химическая модификация и биоскрининг. - Алматы: Ғылым, 2004. - С. 7-17.
5. Ахметова С.Б., Смагулов М.К., Алмагамбетов К.Х., Адекенов С.М., Алиякпаров М.Т. Антимикробная активность эфирного масла аянии кустарничковой // Биотехнология. Теория и практика. - 2004. - №1. - С. 72-75.
6. Ахметова С.Б., Смагулов М.К., Садырбеков Д.Т., Алмагамбетов К.Х., Атажанова Г.А., Адекенов С.М. Химический состав и антимикробная активность эфирного масла аянии кустарничковой // Биотехнология. Теория и практика. - 2004. - №1. - С. 72-75.
7. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. - М.: Наука, 1964. - 270 с.
8. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры изолированных тканей в физиологии и биохимии растений. - Киев: Наука думка, 1980. - 488 с.
9. Валиханова Г.Ж. Биотехнология растений. - Алматы: Қонжық, 1996. - 271 с.

Түйін

Мақалада бұташық таужусанның жасушалық культураларының өсу белсенділігін баяулату жағдайларын оңтайландыру нәтижелері берілген. Зерттелуші өсімдік түрінің каллустық ұлпаларының төмен оң температурада, 50% МС және 100% МС қоректік орталарында 6-30 ай бойғы депонирлеуден кейінгі өмір сүруге қабілеттілігін сақтайтындығы көрсетілді. Каллустық ұлпалардың өмір сүруге қабілеттілігін сақтауына сахарозаның жоғары концентрациялары (10-15%), сахароза мен маннитті бірге қосу, сонымен қатар салицилаттың төмен концентрациялары себеп болатындығы анықталды.

Эмбриондардың регенерациялық қабілетіне фотопериодтың, минералды және көмірсулық қоректенудің әсері зерттелді. Зерттелуші түрдің эмбриондарында едәуір айқын регенерация фитогормондар қосылмаған 50% МС қоректік ортасында байқалды. Микроөсімдіктер үшін ең қолайлы субстрат перлит болып табылды. Регенерант өсімдіктер біртіндеп жабық грунтқа, кейін ашық грунтқа бейімдендірілді.

Summary

Conditions of slowing down of growth activity of cultures of cells of plants *Artemisia leucodes* Schrenk, *Ajania fruticulosa* (Ldb) Poljak and *Tanacetum ulutavicum* Tzvel are optimized. It is shown the maintenance of viability of callus tissues of the investigated species of plants after consignment for 6-30 months in 50% MS and 100% MS at low positive temperatures. It is determined the advantage in maintenance of viability of callus tissues of high concentrations of saccharose (10-15%), the united application of saccharose, mannitol and also the low concentrations of sodium salicylate.

Influence of the photoperiod, the mineral and carbohydrate nutrition on regeneration abilities of embryoides are investigated. The most expressed regeneration is determined at embryoides of studied species on MS media with 50% maintenance of salts, without addition phytohormones. The best substratum for microplants is perlite. Plants of the regenerations were adapted step-by-step to the closed ground, then to the open ground.