

УДК 582.675:[1.086+547.91]

ОПТИМИЗАЦИЯ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР ОЛЕАНДРА ОБЫКНОВЕННОГО (*NERIUM OLEANDER*)

Чмелева С. И., Ширина А. О., Маркевич Л. Э.

Таврический национальный университет им. В. И. Вернадского, Симферополь, cmelivasiv@ukr.net

Исследованы особенности индукции каллусогенеза в культуре вегетативных органов олеандра обыкновенного. Подобранны модификации питательных сред Мурасиге и Скуга для получения и пассирования каллусных культур.

Ключевые слова: *Nerium oleander*, каллусная культура, субкультивирование.

ВВЕДЕНИЕ

Для современного этапа развития биотехнологии одним из важных и актуальных направлений является стимулирование и получение веществ вторичного метаболизма, используя культуру *in vitro*. Разработка таких биотехнологий базируется на исследовании закономерностей каллусогенеза и накоплении вторичных метаболитов в клеточных культурах. Среди веществ вторичного метаболизма значительный интерес представляют различные гликозиды, проявляющие широкий спектр фармакологического действия.

Гликозиды были обнаружены в каллусных культурах у различных видов растений [1–6]. Исследователями установлено, что в каллусных культурах накапливаются гликозиды, аналогичные гликозидам интактных растений [7–8].

Олеандр обыкновенный (*Nerium oleander* L.) содержит гликозиды сердечного ряда, представляющие несомненный интерес для фармакологии [9]. Традиционный подход получения биологически активных вторичных метаболитов требует значительных земельных ресурсов и затрат на выращивание, переработку сырья и является недостаточно эффективным.

В этой связи весьма перспективной и актуальной представляется разработка клеточных технологий, создающих генетическое преобразование на уровне соматических клеток с последующим отбором генотипов, несущих важные хозяйственные признаки. Однако для разработки таких технологий для культур олеандра обыкновенного необходимо решение целого ряда теоретических и практических вопросов, связанных с подбором питательных сред для индукции каллусогенеза.

Таким образом, целью настоящей работы явилось оптимизация питательной среды для получения каллусных культур олеандра обыкновенного.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служили вегетативные органы олеандра обыкновенного. В качестве инициальных эксплантов использовали сегменты

зрелых листьев и узлы стебля. Для соблюдения условий асептики работу по введению в изолированную культуру выполняли в условиях ламинарного бокса. Поверхностную стерилизацию материала проводили ступенчато сначала 70% этанолом (2–5 сек), затем 100% бралофеном (3 мин) и 15% перекисью водорода (5 мин) с последующей промывкой в автоклавированной дистиллированной воде. Экспланты культивировали на агаризованных модифицированных питательных средах Мурасиге и Скуга (МС) [10], дополненных ИУК (индолил-3-уксусная кислота), 2,4-Д (2,4-дихлорфенилуксусная кислота), кинетином и БАП (6-бензиламинопурин). Полученный первичный каллус субкультивировали на питательные среды того же состава. Цикл выращивания культур составлял 90–120 суток. В качестве культуральных сосудов использовали пробирки 2x20 см, содержащие 15 мл питательной среды. На каждый вариант питательной среды было высажено по 20 эксплантов определенного типа в 3-х кратной повторности. Экспланты культивировали при температуре 23–25°C, освещенности 4–5 клк и 16-часовом фотопериоде. Частоту каллусообразования оценивали в процентах по количеству эксплантов, давших каллус, от общего числа эксплантированных.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования по индукции каллусогенеза в культуре вегетативных органов олеандра обыкновенного показали, что этот процесс в значительной степени зависел от состава питательной среды и не зависел от типа используемого экспланта (табл. 1).

Таблица 1

Частота каллусообразования в культуре вегетативных органов олеандра обыкновенного в зависимости от типа экспланта и состава питательной среды

Вариант питательной среды	Типы и концентрации фитогормонов, мг/л				Тип экспланта	Частота каллусогенеза
	2,4-Д	ИУК	БАП	Кинетин		
МС I	2,0	0	0	0,5	Сегменты зрелых листьев	40,0±0,3
					Узлы стеблей	39,0±0,7
МС II	2,0	0	0,5	0	Сегменты зрелых листьев	59,0±0,3
					Узлы стеблей	56,0±0,5
МС III	2,0	0,5	0	0,5	Сегменты зрелых листьев	52,0±0,3
					Узлы стеблей	50,0±0,4
МС IV	2,0	0,5	0,5	0	Сегменты зрелых листьев	61,0±0,3
					Узлы стеблей	61,0±0,3
МС V	2,0	0	0,5	0	Сегменты зрелых листьев	38,0±0,2
					Узлы стеблей	37,0±0,8
МС VI	2,0	0	0,5	0,5	Сегменты зрелых листьев	86,0±0,25
					Узлы стеблей	81,0±0,4
МС VII	1,0	0	0,5	0,5	Сегменты зрелых листьев	49,0±0,4
					Узлы стеблей	48,0±0,5
МС VIII	2,0	0,5	0,5	0,5	Сегменты зрелых листьев	94,0±0,15
					Узлы стеблей	95,0±0,24

Во всех исследуемых вариантах наблюдалось каллусообразование, при этом максимальная частота (94–95%) обнаруживалась на питательной среде МС VIII, дополненной 0,5 мг/л ИУК; 2,0 мг/л 2,4-Д; 0,5 мг/л кинетина и 0,5 мг/л БАП. Высокая частота каллусообразования (81–86%) нами была установлена и на питательной среде МС VI, содержащей 2,0 мг/л 2,4-Д, 0,5 мг/л кинетина и 0,5 мг/л БАП. На других модификациях питательных сред частота каллусообразования была достоверно снижена и значение данного показателя не превышало 61%.

При введении эксплантов в условия *in vitro* первые признаки каллусогенеза обнаруживались на 10–14 сутки культивирования, независимо от состава питательной среды и типа экспланта.

Каллус, индуцированный из эксплантов разного типа, имел светлую, слегка желтоватую окраску, характеризовался плотной консистенцией и невысокой интенсивностью роста (рис. 1, 2). При визуальном анализе каллусных культур нами не были выявлены признаки морфогенеза, каллус отличался относительной гомогенностью структуры.

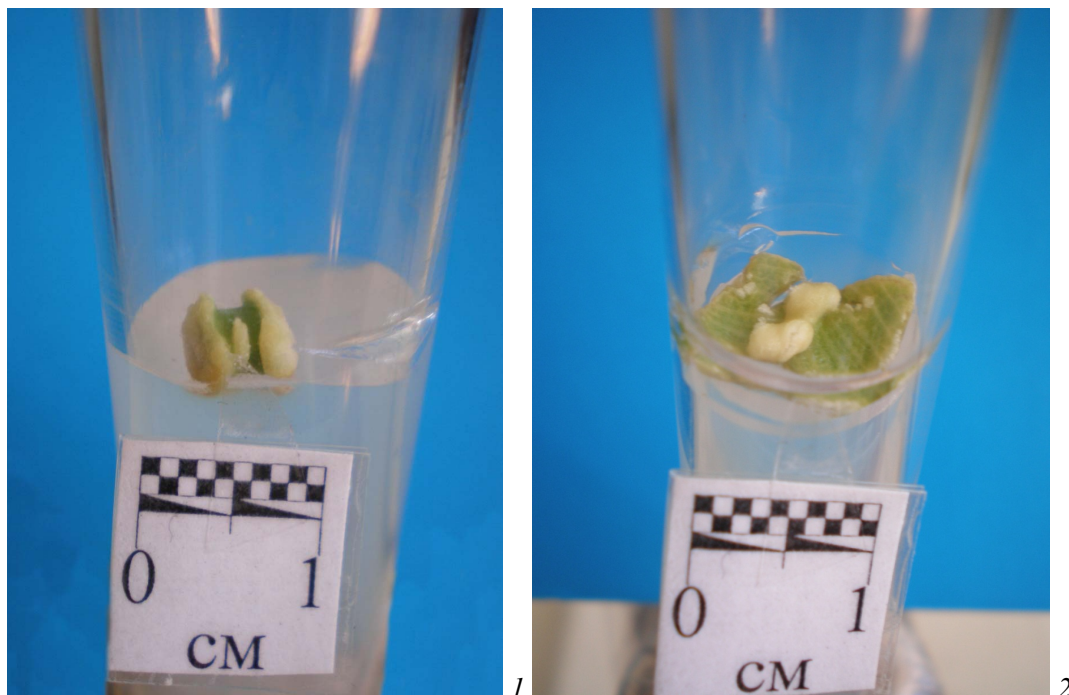


Рис. 1–2. Первичная каллусная ткань олеандра обыкновенного, полученная из узлов стеблей (1) и сегментов зрелых листьев (2)

Полученные каллусные культуры мы субкультивировали на модифицированные питательные среды того же состава (табл. 1).

При субкультивировании каллусных культур они сохраняли невысокую интенсивность роста и по мере достижения стационарной фазы приобретали слегка

буроватую окраску и более плотную консистенцию. При этом установлено, что оптимальной питательной средой для субкультивирования олеандра обыкновенного явилась среда МС VIII, дополненная фитогормонами в следующих концентрациях: 2,4Д 2,0 мг/л; кинетин 0,5 мг/л; БАП 0,5мг/л и ИУК 0,5мг/л. Частота каллусообразования при использовании данной модификации была максимальной и составляла 93% для первого пассажа и 94% для второго.

Также высокой частота каллусообразования установлена нами и при использовании питательной среды МС-VI, модифицированной фитогормонами в следующих концентрациях: 2,4-Д 2,0 мг/л; кинетин 0,5 мг/л и БАП 0,5 мг/л. При пассировании каллусной массы на данную среду исследуемый показатель для первого пассажа составлял 80%, а для второго – 82%. На других используемых модификациях частота каллусообразования не превышала 60%.

Таким образом, проведенные исследования позволили нам подобрать составы питательных сред для индукции каллусогенеза из эксплантов вегетативных органов и для пассирования каллусных культур олеандра обыкновенного. Данные результаты открывают возможности для дальнейших исследований, направленных на селективный отбор и получение каллусных культур, обладающих повышенной продуктивностью гликозидов.

ВЫВОДЫ

1. Получены каллусные культуры олеандра обыкновенного.
2. Подобраны составы питательных сред для индукции каллусогенеза из эксплантов вегетативных органов и для субкультивирования олеандра обыкновенного.

Список литературы

1. Биотехнология: теория и практика: Учеб. Пособие для вузов / [Н.В. Загоскина, Л.В. Назаренко, Е.А. Калашникова, Е.А. Живухина; под ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко]. – М.: Издательство Оникс, 2009. – 496 с.
2. Васильев И.С. Стероидные гликозиды из культуры клеток диоскореи, их метаболизм и биологическая активность / И.С. Васильев, В.А. Пасешниченко // Успехи биологической химии. – 2000. – 40. – С. 153–204.
3. Карпов П.А. Возможности использования культуры тканей *Yucca mayocaga* для получения стероидных гликозидов / П.А. Карпов // Доповіді АН України. – 2000. – № 9. – С. 180–185.
4. Чайко А.Л. Культура клеток женьшеня *Panax japonicus* (var. *repens*): получение каллусной и суспензионной культур, оптимизация роста и анализ панаксозидов / [А.Л. Чайко, О.В. Решетняк, И.Е. Кулешниченко Биотехнология]. – 1999. – № 6. – С. 51–55.
5. Zheng Yu. Studies on the callus cultures of *Ginkgo biloba* L. And the identification of the ginkgolides / [Zheng Yu., Rongmin Yu., Yao Xin. et al.] // J. Sheyang Pharm Univ. – 1999. – V. 16, № 1. – С. 10–15.
6. Носов А.М. Регуляция синиеза вторичных соединений в культуре клеток растений / А.М. Носов // Биология культивируемых клеток и биотехнология растений. – М.: Наука, 1991. – С. 5–20.
7. Кунах В.А. Биотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи / В.А. Кунах. – К.: Логос, 2005. – 730 с.
8. Пат. 24538, МПК С 12N5/04. Спосіб одержання калусної тканини ломоносу виноградолистного (*Clematis vitalba* L.) / С.І. Чмельова, О.М. Бугара, А.І. Сідякін. – заявник і патентовласник Тавр. нац. ун-т. – № u200613099; заявл. 11.12.06; опубл. 10.07.07., Бюл. №10.

9. Орлов Б.Н. Ядовитые животные и растения СССР: справочное пособие для студентов вузов по спец. «Биология» / [Б.Н. Орлов, Д.Б. Гелашвили, А.К. Ибрагимов]. – М.: Высшая школа, 1990. – 272 с.
10. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // *Physiol. Plant.* – 1962. – V. 15, № 13. – P. 473–497.

Чмельова С. І., Ширіна Г. О., Маркевич Л. Е. Оптимізація поживного середовища для отримання калусних культур олеандра звичайного (*Nerium oleander*) // Екосистеми, їх оптимізація та охорона. Сімферополь: ТНУ, 2010. Вип. 3. С. 97–101.

Досліджено особливості індукції калусогенеза в культурі олеандра звичайного. Підібрані модифікації поживних середовищ Мурасіге і Скуга для отримання і пасирування калусних культур.

Ключові слова: *Nerium oleander*, калусная культура, субкультування.

Chmeleva S. I., Shirina A. O., Markevich L. E. Optimization of the nutrient medium for reception callus of cultures of the common oleander (*Nerium oleander*) // Optimization and Protection of Ecosystems. Simferopol: TNU, 2010. Iss. 3. P. 97–101.

Features of callus induction in the culture of the vegetative organs of common oleander have been investigated. Selected Murashige and Skug nutrient media modified for obtaining and passage of callus cultures.

Key words: *Nerium oleander*, callus culture, subcultivation.

Поступила в редакцію 10.10.2010 г.