

УДК 633.81:58.085

ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ФАКТОРОВ НА КАЛЛУСОГЕНЕЗ *ARTEMISIA DRACUNCULUS* В КУЛЬТУРЕ IN VITRO

Инюткина А. Г., Егорова Н. А.

Институт эфиромасличных и лекарственных растений, Симферополь, artemisiadr@gmail.com

Исследованы некоторые закономерности каллусогенеза *Artemisia dracunculus* L. in vitro. Подобран состав питательной среды для длительного культивирования каллуса листового и стеблевого происхождения. Показано влияние состава питательной среды, генотипа и типа экспланта на прирост массы каллусной ткани.

Ключевые слова: *Artemisia dracunculus*, культура in vitro, каллусогенез.

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время большую популярность приобретают лекарственные препараты и пищевые добавки, полученные на основе растительного сырья. В развитых странах общее количество лекарственных средств, полученных из натурального сырья, составляет более 50%, а в Японии – до 90%. Однако использование природных ресурсов не безгранично, к тому же большинство лекарственных растений обладает низкой регенерационной способностью. В решении данной проблемы с успехом могут быть применены биотехнологические методы. Ряд клеточных технологий дает возможность расширить генетическое разнообразие и получить в культуре in vitro ценные генотипы, являющиеся ценным исходным материалом для селекции, и таким образом ускорить традиционный селекционный процесс [1]. Наиболее перспективными в этом плане являются такие направления, как получение соматональных вариантов, клеточная селекция, мутагенез in vitro [2]. Культура in vitro также может быть использована для производства ценных биологически активных веществ, а иногда и новых соединений, не содержащихся в целом растении, получение которых иными средствами затруднено [3]. Для разработки всех этих технологий одним из важных этапов является подбор оптимальных факторов (генотип, тип экспланта, состав питательной среды, условия культивирования in vitro) для получения и культивирования каллусных тканей, которые бы обеспечивали прирост массы каллуса на достаточно высоком уровне.

Полынь эстрагон (*Artemisia dracunculus* L.) является перспективным лекарственным и эфиромасличным растением. В его надземной части содержится эфирное масло, каротин и большое количество витамина С [4]. Кроме фитонцидных свойств, присущих эфирному маслу полыни эстрагон, установлено также его фунгицидное действие [5]. Экстракты, полученные из этого растения, обладают противовоспалительными и ранозаживляющими свойствами [6].

В литературе имеются сведения, касающиеся изучения процессов каллусогенеза и морфогенеза, а также получения в культуре in vitro веществ

вторичного метаболизма у некоторых представителей рода *Artemisia* L. [7, 8, 9, 10, 11]. Данных об исследовании процессов каллусогенеза у полыни эстрагон в доступной нам литературе, не найдено. Имеется сообщение о синтезе эфирного масла в каллусных тканях *A. dracunculus*, накопление которого зависело от генотипа и уровня клеточной и тканевой дифференцировки [12]. Целью нашей работы было исследование влияния состава питательной среды, генотипа и типа экспланта на прирост биомассы каллусной ткани полыни эстрагон.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследований служили селекционные образцы полыни эстрагон (*Artemisia dracunculus* L.) из коллекции Института эфиромасличных и лекарственных растений – №5р.24, №7р.1, №6р.17, №3р.3, которые различались по морфологии и составу эфирного масла [13]. Для получения первичного каллуса в качестве эксплантов использовали фрагменты стебля и высежки листа. Экспланты стерилизовали 30 секунд 70% этанолом, а затем 12 минут 50% раствором препарата «Брадофен» с последующей трехразовой промывкой в автоклавированной дистиллированной воде. Пассирование каллусных тканей проводили каждые 40–45 суток. Масса транспланта составляла 90–100 мг. Каллусные ткани культивировали на различных модификациях питательной среды Мурасиге и Скуга (МС), дополненной фитогормонами (2,4-Д, ИУК, НУК, ИМК, БАП) в различных комбинациях и концентрациях. При введении в культуру, приготовлении питательных сред, пассировании применяли традиционные для работ по культуре тканей методики [14].

Культивирование каллусных тканей осуществляли в пробирках с 10 мл питательной среды в культуральной комнате при температуре +26 °С, относительной влажности воздуха 70%, освещенности 600 лк с 16-ти часовым фотопериодом.

Морфобиологическое описание каллусной ткани и определение массы каллуса проводили в конце цикла выращивания. Ростовый индекс (Р.И.) рассчитывали как отношение прироста массы каллуса к массе транспланта [14].

Полученные данные обработаны статистически с использованием стандартного приложения пакета статистики в Microsoft Excel. На рисунках представлены средние арифметические и доверительные интервалы при уровне значимости 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При визуальном анализе каллусных тканей исследуемых селекционных образцов в течение нескольких пассажей были выявлены существенные морфологические различия. У селекционного образца №7р.1 каллус по консистенции был плотным, сверху – зеленым с белым налетом, а снизу – бурым. У других образцов каллус был рыхлым с бежевой или светло-бежевой окраской, иногда с зелеными участками.

При культивировании каллусных тканей полыни эстрагон было отмечено, что интенсивность прироста массы каллуса варьировала в зависимости от регуляторов

роста, присутствующих в среде культивирования. В таблице 1 на примере селекционного образца №5р.24 показано действие различных модификаций питательной среды МС на ростовую активность каллусных тканей третьего пассажа, полученных из эксплантов листа и стебля.

Таблица 1

Влияние состава питательной среды и типа экспланта на прирост массы каллуса полыни эстрагон (образец №5р.24)

Номер среды	Состав питательной среды (мг/л)	Тип экспланта			
		лист		стебель	
		мг	Р.И.	мг	Р.И.
МС 35	безгормональная (контроль)	328,7±35,7	2,3±0,3	234,3±12,0	1,1±0,1
МС 24	БАП 1,0	385,8±20,5	2,8±0,2	318,0±17,1	2,2±0,2
МС 55	2,4-Д 1,0	1294,6±43,7	11,9±0,4	957,0±35,4	8,8±0,4
МС 53	2,4-Д 2,0	1210,1±39,4	11,1±0,4	1030,9±38,6	9,3±0,4
МС 54	НУК 1,0	1156,5±39,1	10,6±0,4	1063,1±58,2	9,6±0,6
МС 52	НУК 2,0	1098,4±39,9	9,9±0,4	992,5±47,0	8,9±0,5
МС 51	ИМК 1,0	816,3±75,0	7,2±0,8	902,4±75,7	8,0±0,8
МС 49	ИУК 1,0	1013,8±25,6	9,1±0,2	775,5±39,4	6,8±0,4
МС 160	БАП 0,5 + НУК 1,0	1118,6±46,1	10,2±0,5	1024,8±87,1	9,2±0,9
МС 50	БАП 0,5 + 2,4-Д 1,0	1117,2±60,8	10,2±0,6	1084,6±68,6	9,8±0,7

Исследование роста каллуса листового происхождения показало, что в контроле на безгормональной среде прирост массы каллуса был минимальным и составил всего 328,7 мг. Добавление в состав питательной среды 1,0 мг/л БАП (МС 24) достоверно не повлияло на увеличение биомассы каллуса. Введение в состав среды регуляторов роста ауксинового типа действия (ИМК, ИУК, НУК, 2,4-Д) в 2,5–4 раза увеличило интенсивность пролиферации каллуса. Из использованных регуляторов роста минимальный прирост каллуса наблюдался на средах, содержащих 1,0 мг/л ИМК (МС 51) или ИУК (МС 49), на которых масса каллуса составила 816,3 мг и 1013,8 мг соответственно. Введение 1,0 мг/л НУК увеличило ростовую активность почти в 1,5 раза – ростовой индекс каллусной ткани составил 10,5. Повышение концентрации этого регулятора роста до 2,0 мг/л достоверно не повлияло на изучаемые показатели. При использовании 2,4-Д в концентрации 1,0 мг/л наблюдался максимальный прирост массы каллуса (1294,6 мг). Увеличение концентрации 2,4-Д до 2,0 мг/л, как и в случае с НУК, достоверно не повлияло на изучаемые показатели. Совместное введение регуляторов роста цитокининового и ауксинового типа действия способствовало стимулированию ростовой активности каллусной ткани эстрагона. Добавление к 0,5 мг/л БАП 1,0 мг/л НУК (МС 160) или 2,4-Д (МС 50) в 5 раз увеличило прирост массы по сравнению с показателями на среде МС 24 – ростовой индекс каллусной ткани составил 10,1. При культивировании каллусной ткани стеблевого происхождения были выявлены аналогичные закономерности действия регуляторов роста (табл. 1).

Ранее рядом исследователей была определена зависимость прироста каллуса от содержания в питательной среде регуляторов роста у некоторых видов полыней.

Так, в работе Е. К. Спринчану и Р. Г. Бутенко [10] культивирование каллуса полыни лимонной проводили на средах, содержащих регуляторы роста только ауксинового типа действия – 2,4-Д (0,15 мг/л) или НУК (0,5 мг/л). Показано также, что прирост биомассы каллуса стеблевого происхождения был выше, чем каллусной ткани, полученной из листа. В работе О. В. Митрофановой с соавторами [11] оптимальной питательной средой для культивирования *A. balchanorum* была среда, содержащая наряду с ауксинами регуляторы роста цитокининового типа действия (БАП и кинетин). Для культивирования каллусной культуры *A. annua* необходимо было введение в питательную среду НУК и БАП [15].

В результате наших исследований установлено, что высокий прирост массы каллуса, полученного из листьев и стеблей полыни эстрагон, наблюдался на модификациях среды Мурасиге и Скуга, содержащих в качестве регуляторов роста 2,4-Д или НУК (1,0–2,0 мг/л) или на средах, дополненных наряду с этими ауксинами 6-бензиламинопурином (0,5 мг/л). В дальнейшем культивирование каллусных тканей листового и стеблевого происхождения проводили на среде МС 160, на которой до шестого пассажа отмечался интенсивный прирост биомассы и ростовой индекс в отдельных опытах достигал 15–20.

Установлено, что кроме состава питательной среды на ростовые показатели каллусной ткани эстрагона оказывали влияние генотипические различия. Так, минимальный прирост каллуса отмечался у образца №7р.1, у которого ростовой индекс на различных питательных средах колебался от 1,4 до 3,1 (рис. 1). Максимальный ростовой индекс отмечен у образцов №5р.24 (11,9) и №6р.17 (13,9).

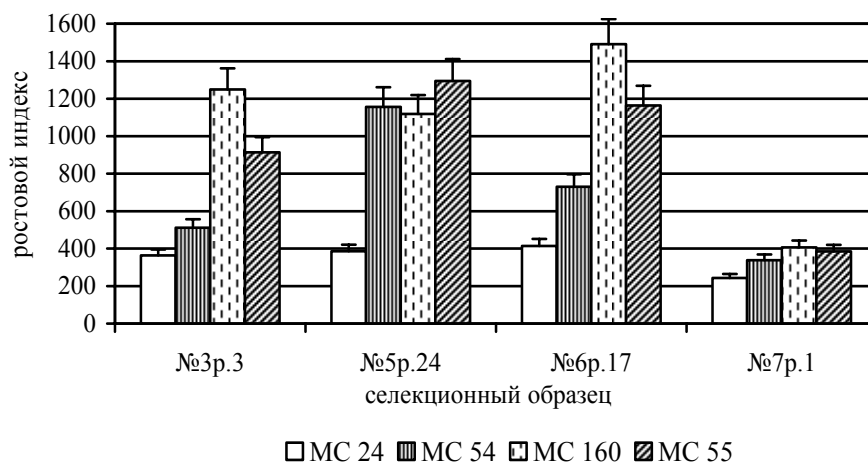


Рис. 1. Влияние генотипа и состава питательной среды на изменение ростового индекса каллусной ткани листового происхождения у полыни эстрагон (состав питательных сред указан в таблице 1)

Выявлены незначительные различия прироста массы каллусных тканей, полученных из различных типов эксплантов. Показано, что интенсивность прироста каллуса стеблевого происхождения была меньше, чем листового. Так, на

питательных средах МС 49 и МС 53 масса каллуса стеблевого происхождения была в 1,3 раза меньше, чем листового (табл. 1). На остальных питательных средах различия были не достоверны.

Проведен сравнительный анализ влияния различных факторов (состав питательной среды, генотип, тип экспланта) на прирост массы каллуса полыни эстрагон. С помощью трехфакторного дисперсионного анализа было показано, что состав питательной среды оказывал определяющее действие в данном процессе – сила влияния фактора составила 58,6% (рис. 2). Доля влияния генотипа была равна 17,2%, что почти в 3,5 раза меньше по сравнению с предыдущим фактором. Взаимодействие этих двух факторов было почти равносильно доли влияния генотипа и составило 15,9%. Как и было отмечено ранее, влияние типа экспланта было невелико, сила влияния достигала всего 8,3%. Не выявлено достоверно значимого взаимодействия типа экспланта с другими факторами, а также совместного действия всех трех факторов.

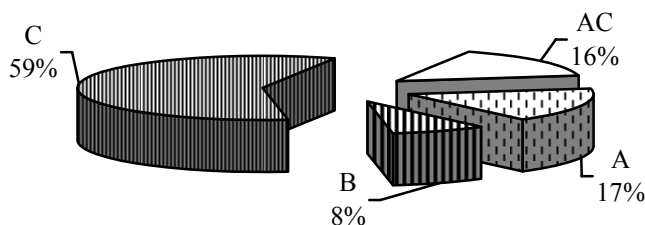


Рис. 2. Долевое влияние основных факторов (питательная среда (С), генотип (А) и тип экспланта (В)) на прирост массы каллусной ткани полыни эстрагон

ВЫВОДЫ

Таким образом, проведенные экспериментальные исследования показали, что интенсивность прироста каллусной ткани полыни эстрагон зависела от состава питательной среды, генотипа и типа экспланта (доля влияния факторов 58,6%, 17,9%, 8,3% соответственно). Максимальный прирост биомассы каллуса, полученного из листовых и стеблевых эксплантов, наблюдался на нескольких модификациях среды МС, содержащих 2,4-Д или НУК (1,0-2,0 мг/л), или эти ауксины в комбинации с БАП (0,5 мг/л). Из исследованных генотипов эстрагона селекционный образец №7р.1 отличался минимальной способностью к пролиферации каллусной ткани, а селекционные образцы №5р.24 и №6р.17 – максимальной. Каллус листового происхождения на большинстве питательных сред обладал лучшей ростовой активностью по сравнению со стеблевым каллусом.

Список литературы

1. Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. Учебное пособие / Р. Г. Бутенко. – М.: ФБК–ПРЕСС, 1999. – 160 с
2. Сельскохозяйственная биотехнология: Учебник / [В. С. Шевелуха, Е. А. Калашникова, С. В. Дегтярев и др.]. – М.: Высшая школа, 1998. – 416 с.
3. Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи / В. А. Кунах. – К.: Логос, 2005. – 730 с.

4. Новые эфиромасличные культуры: Справочник. / [В. И. Машанов, Н. Ф. Андреева, Н. С. Машанов, И. Е. Логвиненко]. – Симферополь: Таврия, 1988. – 160 с.
5. Tateo F. Basil oil and tarragon oil: composition and genotoxicity evaluation / F. Tateo, L. Santamaria, L. Bianchi, A. Bianchi // *J. Essent. Oil.* – 1989. – P. 1–5.
6. Супильникова А. В. Подходы к стандартизации сырья и препаратов полыни эстрагон (*Artemisia dracunculus* L.) / А. В. Супильникова // VI Международный съезд «Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения» (Санкт-Петербург, 2002), 4–6 июля 2002 г.: матер. – СПб., 2002. – С. 310–313.
7. Benjamin B. D. Tissue cultures of *Artemisia pallens*: organogenesis, terpenoid production / B. D. Benjamin, A. T. Sipahimalani, M. R. Heble // *Plant Cell and Organ Cult.* – 1990. – Vol. 21, N 2. – P. 159–164.
8. Аманов С. Б. Биотехнология культивирования изолированных тканей *Artemisia glabella* – продуцента биологически активного сесквитерпеноида арглабина / С. Б. Аманов, С. М. Адекенов, И. Рахимбаев // *Вестник Башкирского университета.* – 2001. – № 2 (II). – С. 49–50.
9. Kumar P. S. Effect of amino acid and growth regulators on indirect organogenesis in *Artemisia vulgaris* L. / S. P. Kumar, B. D. R. Kumari // *Asian Journal of Biotechnology.* – 2010. – Vol. 2, N 1. – P. 37–45.
10. Спринчану Е. К. Размножение в культуре *in vitro* полыни лимонной путем индукции образования почек тканями первичного экспланта и каллуса / Е. К. Спринчану, Р. Г. Бутенко // *Физиология и биохимия культурных растений.* – 1991. – Т. 23, № 3. – С. 295–301.
11. Митрофанова О. В. Регенерация растений из изолированных органов и тканей *Artemisia balchanorum* Krasch. и *Artemisia scoparia* W. K. / О. В. Митрофанова, И. Е. Логвиненко, Н. Н. Иванова // *Сборник научных трудов Никитского ботанического сада.* – 1997. – Т. 119. – С. 143–153.
12. Cotton C. M. The accumulation of volatile oils in whole plants and cell culture of tarragon (*Artemisia dracunculus*) / C. M. Cotton, L. V. Evans, J. W. Gramshaw // *Journal of Experimental Botany.* – 1991. – Vol. 42, N 3. – P. 365–375.
13. Хараим Н. Н. Анализ селекционной ценности коллекционных образцов полыни эстрагон (*Artemisia dracunculus* L.) / Н. Н. Хараим, Н. В. Невкрытая, С. И. Кривда // *Наукові записки Тернопільського педагогічного університету. Сер. «Біологія».* – 2007. – № 3 (33). – С. 85–89.
14. Калинин Ф. Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф. Л. Калинин, В. В. Сарнацкая, В. Е. Полищук. – К.: Наукова думка. – 1980. – 488 с.
15. Песяк С. В. Оптимизация питательной среды для эффективного культивирования каллусной культуры *Artemisia annua* L. / С. В. Песяк, Е. В. Комлева // *Молодежная всероссийская школа-семинар «Современные фундаментальные проблемы физиологии и биотехнологии растений и микроорганизмов»: 3–5 декабря 2008 г.: тез. докл.* – Томск, 2008. – С. 26–27.

Інюткіна Г. Г., Єгорова Н. О. Вплив деяких факторів на калусогенез *Artemisia dracunculus* в культурі *in vitro* // *Екосистеми, їх оптимізація та охорона.* Симферополь: ТНУ, 2009. Вип. 20. С. 94–99.

Досліджено деякі закономірності калусогенезу *Artemisia dracunculus* L. *in vitro*. Підібрано склад живильного середовища для тривалого культивування калуса листового та стеблового походження. Показано вплив складу живильного середовища, генотипу та типу експланта на приріст маси калусної тканини.

Ключові слова: *Artemisia dracunculus*, культура *in vitro*, калусогенез.

Inyutkina A. G., Yegorova N. A. The influence of certain factors on callusogenesis of *Artemisia dracunculus* *in vitro* // *Optimization and Protection of Ecosystems.* Simferopol: TNU, 2009. Iss. 20. P. 94–99.

Some peculiarities of callusogenesis of *Artemisia dracunculus* L. *in vitro* were researched. The compositions of nutrient medium for long time cultivation of callus, obtained from leaf and stem, have been determined. It was showed the influence of culture medium, genotype and explant type on the growth of callus tissue biomass.

Key words: *Artemisia dracunculus*, culture *in vitro*, callusogenesis.

Поступила в редакцію 28.10.2009 г.