

Г. К. АСАНОВА, А. Ж. КУАНДЫКОВА, А. Б. ЕШМАГАМБЕТОВА, С. М. АДЕКЕНОВ

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ДЛИТЕЛЬНОГО СОХРАНЕНИЯ КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР ЭНДЕМИЧНЫХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ

(Акционерное общество «Научно-производственный центр «Фитохимия», г. Караганда)

Оптимизированы условия замедления ростовой активности культур клеток растений *Artemisia leucodes* Schrenk, *Ajania fruticulosa* (Ldb) Poljak и *Tanacetum ulutavicum* Tzvel. Показано сохранение жизнеспособности каллусных тканей исследованных видов растений после депонирования в течение 6-30 месяцев на 50% МС и 100% МС при низких положительных температурах. Отмечено, что на 50% среди Мурасиге и Скуга каллусные ткани сохраняли и восстанавливали жизнеспособность лучше по сравнению со 100%. Определено преимущество в сохранении жизнеспособности каллусных тканей высоких концентраций сахарозы (15-20 %), совместном использовании сахарозы и маннита, а также низких концентраций салицилата натрия.

Перспективы использования дикорастущих видов растений достаточно ограничены по природным и экономическим причинам. Интенсивные темпы хозяйственного освоения территорий, является фактором, лимитирующим увеличение запасов сырья и сборов с природных популяций.

Выход из этого положения видится во введении в культуру редких, эндемичных и лекарственных растений. Альтернативным методом культивирования *in vivo*, сохранения особо ценных растений, является введение их в культуру *in vitro*. Использование биотехнологических методов

позволяет сохранить биологические объекты, независимо от природных условий.

Существует несколько способов, используемых для сохранения генофонда растений: хранение биологических объектов, замедляя процессы их роста с помощью ретардентов; хранение при остановке роста (криосохранение). Для сохранения культуры в состоянии роста необходимо поддерживать устойчивый рост – изменять кинетику роста. 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].

Изучение возможности длительного беспрерывного культивирования редких растений Казахстана позволит создать коллекцию растительных культур *in vitro*. Следует учитывать, что подобная коллекция даст возможность не только хранить клеточные культуры, но и использовать данные культуры в клеточно- и генноминженерных разработках. Кроме того, подобная коллекция может служить материальной базой для восстановления природных популяций, а также для интродукции и расширения ареалов редких и эндемичных видов. Приоритетными для длительного хранения являются редкие, исчезающие, эндемичные растения, а также хозяйственно ценные виды.

Исследовали редкие, эндемичные и лекарственные растения полынь беловатая (*Artemisia leucodes* Schrenk.), аяния кустарничковая (*Ajania fruticulosa* (Ldb) Poljak.) и пижма ультауская (*Tanacetum ulutavicum* Tzvel.).

Аяния кустарничковая (*Ajania fruticulosa* (Ldb) Poljak.) – многолетнее растение, обладающее антивирусной, antimикробной и антиоксидантной активностью [3–5]. Запасы *Ajania fruticulosa* в природе ограничены.

Полынь беловатая (*Artemisia leucodes* Schrenk.) – одно-двухлетнее растение, эндемик Средней Азии и Казахстана. *Artemisia leucodes* содержит сесквитерпеновые лактоны гвайанового ряда леукомизин и аустрицин, а также эфирное масло, основными компонентами которого являются цинеол и камфора. На основе леукомизина разработан антиатеросклеротический препарат «Атеролид» [6–10].

Пижма ультауская (*Tanacetum ulutavicum* Tzvel.) – многолетнее растение, эндемик Ультауских гор, произрастающее только в данном географическом районе [11].

Материалы и методы исследования

Пересадку культивируемых объектов проводили в ламинарбоксе ЛБ-Г с продувкой стерильным воздухом. Культивационные среды стерилизовались в автоклаве при 1,2 атмосферах 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, полыни беловатой и пижмы ультауской собраны в ходе экспедиционных выездов.

В экспериментах по культивированию клеток и тканей растений использовали общие методические приемы, описанные в монографиях Р. Г. Бутенко [12], Ф. Л. Калинин и др. [13].

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

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

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

где W_0 – начальная масса экспланта, W_1 – масса каллуса, в конце цикла культивирования [14].

Для минимизации роста каллусных тканей исследуемых видов 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 конкретного 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 пассивировали на стандартную питательную среду Мурасиге и Скуга, содержащую 3 % сахарозы и фитогормоны (ИУК – 2 мг/л; БАП – 0,5 мг/л).

Результаты и обсуждение

Для минимизации роста каллусных тканей аянии кустарничковой, полыни беловатой и пижмы улытауской необходимо было отработать оптимальные условия депонирования с использованием в составе питательной среды различных концентраций ретардантов.

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.

По результатам можно сделать вывод о преимуществе в сохранении жизнеспособности каллусных тканей высоких концентраций сахарозы (15–20 %), совместном использовании сахарозы и маннита, а также низких концентраций салицилата натрия.

Получены данные о замедлении каллусных тканей исследуемых видов растений в процессе депонирования при низких положительных температурах в течение от 6 до 30 месяцев на 50% МС и 100% МС (табл. 1, 2).

Таблица 1. Замедление роста каллусных тканей полыни беловатой на 100% МС

Ретарданты			Нарост					
сахароза	маннит	салицилат натрия	Через месяц	6 месяцев	12 месяцев	18 месяцев	24 месяцев	30 месяцев
5	—	—	*	**	**	***	****	Некроз
10	—	—	*	**	**	***	****	Некроз
15	—	—	*	*	*	**	—	—
20	—	—	*	*	*	**	—	—
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 полыни беловатой на 50% МС

Ретарданты			Нарост					
сахароза	маннит	салицилат натрия	Через месяц	6 месяцев	12 месяцев	18 месяцев	24 месяцев	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%).

Совместное использование сахарозы и маннита приводит к значительному торможению ростовых характеристик каллусной ткани полыни беловатой, при этом, чем выше концентрация маннита, тем больше степень тормозящего эффекта. В процессе депонирования каллусные ткани на этих ретардантах имели хорошие морфологические показатели. Наличие в среде для депонирования салицилата натрия приводит к минимализации ростовой активности, однако в этом варианте не сохранялась зеленая окраска тканей в процессе депонирования.

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. В течение депонирования ткани пижмы ульятауской на средах с маннитом и салицилатом натрия приобретают бурую окраску, что отличает реакцию культур клеток пижмы ульятауской от аянии кустарничковой, которая как раз при культивировании в присутствие салицилата натрия сохраняет зеленую окраску тканей.

Таблица 3. Оптимальные концентрации ретардантов влияющие на восстановление жизнеспособности каллусов на 100 и 50% среде Мурасиге и Скуга

Количество месяце в культивирования	Среда МС, %	Вид растения		
		Полынь беловатая	Аяния кустарничковая	Пижма ульятауская
6	50	5-10% сахарозы; 0,1% салицилата натрия; 5% сахарозы + 0,8%; 1,5%, 2 % маннита	10-15% сахарозы; 5% сахарозы + 0,8%; 1,2% маннита; 0,1-100 мг/л салицилата натрия	10-15 % сахарозы; 1,5-2 % маннита
	100	5-10% сахарозы; 5% сахарозы + 1,5% маннита; 0,1 мг/л салицилата натрия	10-25% сахарозы; 5% сахарозы + 0,8%; 2 % маннита; 0,1мг/л салицилата натрия	5% сахарозы; 0,8% маннита; 15-20 % сахарозы
12	50	5-10% сахарозы; 0,1 мг/л салицилата натрия; 5% сахарозы + 1,5% маннита	10-15 % сахарозы; 5% сахарозы + 0,8%; 1,2% маннита; 0,1-100 мг/л салицилата натрия	10-15 % сахарозы; 5% сахарозы + 0,8% маннита
	100	10% сахарозы; 5% сахарозы + 1,5% маннита	10-15% сахарозы; 5% сахарозы + 0,8 % маннита; 0,1 мг/л салицилата натрия	15-20% сахарозы; 5% сахарозы + 1,5% маннита
18	50	5-10% сахарозы; 0,1 мг/л салицилата натрия; 5% сахарозы + 1,5%; 0,8 % маннита	5-10 % сахарозы; 5% сахарозы + 0,8%; 1%, 2% маннита; 0,1-100 мг/л салицилата натрия	10-15 % сахарозы; 5% сахарозы + 0,8%; 1% маннита
	100	10% сахарозы; 5% сахарозы + 1,5% маннита	10-15% сахарозы; 5% сахарозы + 1,5% маннита; 0,1 мг/л салицилата натрия	10-15 % сахарозы; 5% сахарозы + 0,8% маннита
24	50	5-10% сахарозы; 0,1 мг/л салицилата натрия; 5% сахарозы + 0,8%; 1,5% маннита	5-10 % сахарозы; 5% сахарозы + 0,8%; 1%, 2% маннита; 0,1-100 мг/л салицилата натрия	5-10% сахарозы; 5% сахарозы + 0,8%; 1,5 % маннита
	100	5% сахарозы + 1,5% маннита	5% сахарозы + 2% маннита	10% сахарозы; 5% сахарозы +0,8%; 1,5 % маннита
30	100	5% сахарозы + 1,5 % маннита	10% сахарозы, 5% сахарозы + 1,5 % маннита	5% сахарозы + 0,8%; 1,5 % маннита

Торможение роста тканей у пижмы с сохранением зеленой окраски происходит при использовании маннита с сахарозой.

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 салицилате натрия и совместном использовании 5 % сахарозы и от 0,8 % до 2 % маннита. Медленнее всего ткани аянии кустарничковой возвращаются к нормальному росту после депонирования на среде с маннитом. Восстановление жизнеспособности тканей полыни беловатой после депонирования происходит гораздо медленнее, чем у тканей аянии кустарничковой. Характер восстановительных процессов меняется в зависимости от срока депонирования. После 6 и 12 месяцев хранения рост и морфология тканей восстанавливались быстрее, нежели после 18–30 месяцев беспересадочного культивирования. Высокие показатели восстановления жизнеспособности каллусной ткани пижмы ульяуской депонированной в течение 6–18 месяцев при низких положительных температурах отмечены на половинной среде Мурасиге и Скуга с использованием в качестве ретардантов – 5 % сахарозы; 5 % сахарозы + 0,8 % маннит; 5 % сахарозы + 2% маннита; на 100 % среде Мурасиге и Скуга – 15 % сахарозы; 5 % сахарозы + 1,5 % маннита (табл. 3).

Через 24–30 месяцев культивирования каллусная ткань аянии кустарничковой и полыни беловатой имела участки некроза. После 30 месяцев депонирования культуры клеток при низкой положительной температуре лучшие результаты отмечены на питательной среде Мурасиге и Скуга с добавлением 10 % сахарозы, 5% сахарозы + + 1,5 % маннита.

Таким образом, в результате проведенных исследований получены результаты о преимуществе в сохранении жизнеспособности каллусных тканей аянии кустарничковой, пижмы ульяуской и полыни беловатой. Отмечено, что на 50% среде Мурасиге и Скуга каллусные ткани сохранили и восстанавливали жизнеспособность лучше по сравнению со 100%. На основании

полученных результатов, рекомендуем для депонирования тканей в коллекции *in vitro* использовать питательную среду Мурасиге-Скуга, содержащую сахарозу 5% и маннита 0,8%, 1,5%, 2% и температуру +5°C. В этих условиях ткани исследуемых видов замедляют ростовую активность и сохраняют жизнеспособность, которая восстанавливается после переноса в нормальные условия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Митрофанова И.В. Минимализация роста декоративных растений под воздействием химических факторов в культуре *in vitro* // Мат-лы междунар. конф. «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. Адекенов С.М. Биологически активные вещества растений и перспективы создания новых лекарственных препаратов // Сб. науч. тр. «Развитие фитохимии и перспективы создания новых лекарственных препаратов». Кн. 2. «Биологически активные вещества из растений, их химическая модификация и биоскрининг». Алматы: ?ылым, 2004. С. 7-17.
4. Ахметова С.Б., Смагулов М.К., Алмагамбетов К.Х., Адекенов С.М., Атажанова М.Т. Антимикробная активность эфирного масла аянии кустарничковой // Биотехнология. Теория и практика. 2004. № 1. С. 72-75.
5. 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.
6. Ишмуратова М.Ю., Егебаева Р.А., Кузьмин Э.В., Адекенов С.М. Изучение *Artemisia leucodes* Schrenk. в Казахстане. Распространение, экология и ресурсы // Развитие фитохимии и перспективы создания новых лекарственных препаратов. Сб. науч. тр. Кн. 1. «Интродукция, фармакогенезия и технология возделывания новых лекарственных растений» / Под ред. С. М. Адекенова. Алматы: Фылым, 2003. С. 38-57.
7. Талжанов Н.А., Даuletjanов А.Ж., Райдугин В.А., Атажанова Г.А., Адекенов С.М. Гроссмизин из *Artemisia leucodes* Schrenk. В сб: Химия и технология растительных веществ. Сыктывкар, 2006. С. 185.
8. Павлов Н.В. Растительное сырье Казахстана // М.; Л.: Изд. АН СССР, 1947. С. 471-483.
9. Горяев М.И., Базалицкая В.Ф., Поляков П.П. Химический состав полыней // Алма-Ата: Изд. АН КазССР, 1962. 133 с.
10. Юсупова С.М., Холитова З.И., Сыров В.Н., Юлдашев М.П. Перспективы создания фармакопрепаратов на основе соединений различных химических классов, выделенных из флоры Центрально-Азиатского региона // В сб. «Поиск, разработка и внедрение новых лекарственных средств и организационных форм фармацевтической деятельности». Томск, 2000. С. 204-205.

11. Дмитриева Т.Г. Редкие и исчезающие растения природной флоры Джезказганской области // Проблемы рационального использования лекарственно-технических растений Казахстана. Алма-Ата, 1986. С. 67-72.
12. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М.: Наука, 1964. 272 с.
13. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Метод культуры изолированных тканей в физиологии и биохимии растений. Киев: Наука, 1980. С. 488.
14. Валиханова Г.Ж. Биотехнология растений. Алматы, 1996. 264 с.

Резюме

Акшыл жусан, бұташық таужусан және ұлтыау түй-мешетені өсімдіктерінің жасушалық культураларының өсу белсенділігін баяулату жағдайлары оңтайландырылды. Зерттелуші өсімдік түрлерінің каллустық ұлпаларының төмен оң температурада, 50% МС және 100% МС көректік орталарында 6–30 ай бойы депонирлеуден кейінгі өмір сүрге қабілеттілігін сақтайдынығы көрсетілді. 50% Мурасиге Скуга қөректік ортасында 100%-бен

салыстырғанда каллустық ұлпалардың өмір сүрге қабілеттілігінің сақталуы мен қалпына келуі едәуір жақсы жүретіндігі белгіленді. Каллустық ұлпалардың өмір сүрге қабілеттілігін сақтауына сахарозаның жоғары концентрациялары (15–20%), сахароза мен маннитті бірге қосу, сонымен қатар натрий салицилатының төмен концентрациялары себеп болатындығы анықталды.

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 consignation for 6-30 months in 50 % MS and 100 % MS at low positive temperatures. It is stated, that in 50 % Murasiga and Skuga media the callus tissues have kept and restored viability better in comparison with 100 %. It is determined the advantage in maintenance of viability of callus tissues of high concentrations of saccharose (15-20%), the united application of saccharose, mannitol and also the low concentrations of sodium salicylate.