

ПОЛУЧЕНИЕ И ЦИТОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР АСТРАГАЛА ШЕРСТИСТОЦВЕТКОВОГО (*ASTRAGALUS DASYANTHUS* PALL.)

Бугара И.А., Юркова И.Н., Бугара А.М.

Исследованы особенности каллусогенеза в культуре вегетативных органов астрагала шерстистоцветкового (*Astragalus dasianthus*) *in vitro* на питательной среде Мурасиге и Скуга, содержащей 2,4-Д 2,0 мг/л, БАП 0,5 мг/л и кинетин 1,0 мг/л. Показано, что каллус, индуцированный из листовых эксплантов состоял из клеток меристематического и паренхимного типов, легко отделяющихся друг от друга, что позволяет использовать его для получения суспензионной культуры.

Ключевые слова: *Astragalus dasyanthus* Pall., каллусная культура.

ВВЕДЕНИЕ

Растения способны синтезировать и накапливать разнообразные вещества вторичного метаболизма, проявляющие биологическую активность и имеющие фармакологическое значение. Идентификация этих веществ, установление структуры и специфики биологического действия привели к тому, что в последнее десятилетие для лечения и профилактики различных заболеваний все шире начинают использоваться лекарственные средства на основе растительного сырья. Например, сегодня при лечении сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний препараты, получаемые из растений, составляют около 50%. При этом в медицине используются около 3000 видов растений, из них более 100 специально выращиваются, остальные произрастают в дикой природе [1]. Поэтому природные запасы растительных лекарственных ресурсов быстро истощаются, под угрозой исчезновения находятся ценные в фармакологическом отношении виды. В этой связи становится актуальным поиск альтернативных источников сырья для фармакологии. В последние годы в качестве такого альтернативного источника рассматривают растительную биомассу (каллусную или суспензионную культуру), выращиваемую в условиях контролируемого эксперимента *in vitro*. Замена природного лекарственного сырья на гарантированно получаемую биомассу видится сегодня как один из радикальных способов, позволяющих сохранить ресурсы исчезающих видов лекарственных растений.

Астрагал шерстистоцветковый (*Astragalus dasyanthus* Pall.) – ценное лекарственное растение, произрастающее в дикой природе. Некогда широко распространенный вид, в том числе и в Крыму, сегодня занесен в Красную книгу Украины, Европейский Красный список и Красный список Международного Союза охраны природы [2]. Все части растения содержат тритерпеновые гликозиды, флавоноиды, полисахариды, соединения железа, кальция, алюминия, магния, стронция, молибдена, ванадия, марганца, натрия, кремния, фосфора, бария. В научной медицине настой астрагала

шерстистоцветкового назначают при гипертонии, хронической сердечной недостаточности, отеках различного происхождения [3].

Поскольку природные ресурсы астрагала шерстистоцветкового довольно ограничены, актуальным является разработка приемов получения биомассы данного вида. Не менее важным представляется также цитологическое изучение каллусных культур и обоснование на этой основе возможности их использования как для получения клеточной суспензии, так и для интенсивного клонального микроразмножения в связи с решением задач восполнения природных популяций и интродукции.

Целью настоящей работы являлось получение каллусных культур астрагала шерстистоцветкового и их цитологическая характеристика на уровне световой микроскопии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служили растения астрагала шерстистоцветкового (*A. dusyanthus*), выращенные в условиях закрытого грунта. В качестве эксплантов для введения в культуру *in vitro* были взяты молодые листья длиной 0,7-1,0 см и сегменты черешков листа длиной 1,0 см. При выполнении экспериментальной работы использовали методы, общепринятые в исследованиях по культуре изолированных тканей растений [4]. Растительный материал поверхностно стерилизовали препаратом брадофен в течение 5 минут, а затем промывали в трех сменах автоклавированной дистиллированной воды. Экспланты помещали на поверхность модифицированной агаризованной питательной среды Мурасиге и Скуга [5], дополненной 2,4-Д (дихлорфеноксисукусная кислота) 2,0 мг/л, БАП (6-бензиламинопурин) 0,5 мг/л, кинетином 1,0 мг/л и аскорбиновой кислотой 1,0 мг/л. В качестве культуральных сосудов использовали химические пробирки 2 x 20 см с 10 мл питательной среды. В каждый культуральный сосуд помещали по одному экспланту, всего было высажено по 20 эксплантов каждого типа в трехкратной повторности. Для исследования особенностей индукции каллусогенеза в культуре листовых эксплантов их помещали на среду адаксиальной и абаксиальной сторонами. Экспланты культивировали в условиях термостатированного помещения (25 – 27°C) при относительной влажности воздуха 60 – 70%, освещенности 2 – 3 тыс. люкс и 16-часовом фотопериоде. Частоту каллусообразования определяли по количеству эксплантов, давших каллус, от общего числа эксплантированных.

Для цитологического анализа каллусных культур их фиксировали по Карнуа, окрашивали ацетокармином и готовили временные препараты [6]. Цитологические исследования проводили на световом микроскопе МРІ-5.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Культивирование молодых листьев и сегментов листовых черешков в условиях *in vitro* на искусственной питательной среде позволило выявить их различную способность к каллусообразованию (табл.).

Индукция каллусогенеза обнаруживалась только при использовании в качестве эксплантов молодых листьев, в то время как сегменты листовых черешков на питательной среде быстро темнели, подвергались некрозу и не проявляли способности к каллусообразованию. Исследования показали, что частота

каллусообразования в культуре молодых листьев была достаточно высокой и достигала почти 100% независимо от того, какой стороной они контактировали с питательной средой (абаксиальной или адаксиальной).

Таблица.
Зависимость частоты каллусообразования от типа экспланта и его расположения на питательной среде, %

Тип экспланта и его расположение на среде		
молодой лист длиной 7 – 10 мм (адаксиальная сторона на среде)	молодой лист длиной 7 – 10 мм (абаксиальная сторона на среде)	сегменты листового черешка длиной 7 – 10 мм
98,7 ± 1,1	98,5 ± 1,1	0,0

Как правило, первые признаки индукции каллусогенеза обнаруживались на 15-20 сутки культивирования. Образующийся каллус имел светлую окраску, мягкую консистенцию и отличался невысокой интенсивностью роста. По мере культивирования, на 30-40 сутки, в каллусе наблюдалась дифференциация глобулярных структур (новообразований), достигающих 2 - 4 мм в диаметре и имеющих зеленую пигментацию (рис. 1).

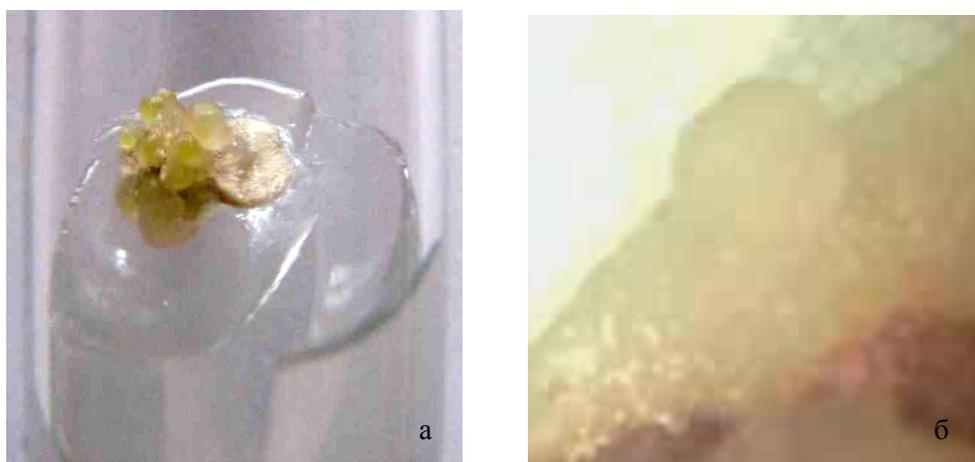


Рис. 1. Каллусная культура астрагала шерстистоцветкового, индуцированная в культуре *in vitro* молодых листьев, где а – общий вид каллусной культуры; б – глобулярные новообразования на поверхности каллуса.

Цитологические исследования позволили установить, что каллусная культура астрагала шерстистоцветкового состояла из клеток довольно легко отделяющихся друг от друга. Эти клетки можно было отнести к двум основным морфологическим типам. Первый тип – клетки меристематического типа. Они располагались крупными локальными скоплениями, имели относительно небольшие размеры, крупные ядра, вакуолизация их была слабо выражена. Второй тип – клетки

паренхимного типа, отличающиеся более крупными размерами, небольшим количеством цитоплазмы и сильной вакуолизацией. Такие клетки имели округлую, овальную и удлинненную форму, располагаясь, преимущественно, вокруг локальных скоплений клеток меристематического типа (рис. 2).

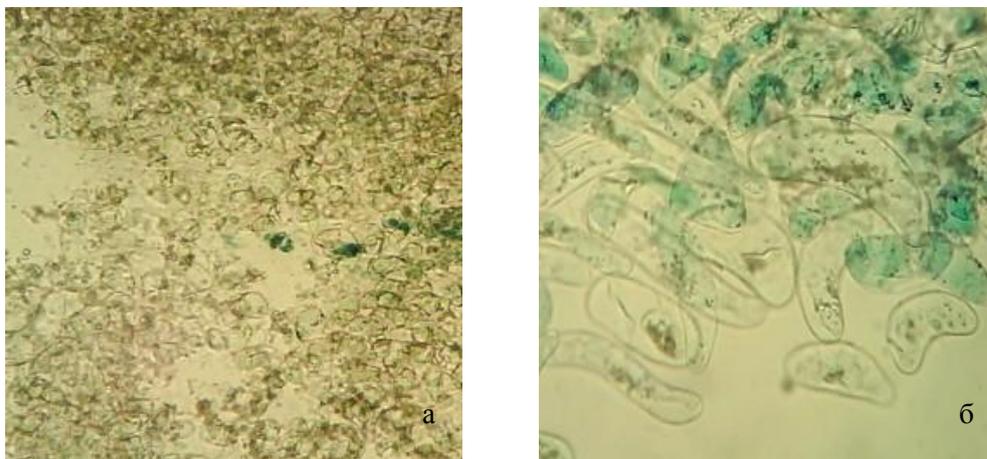


Рис. 2. Морфология клеток каллусной культуры астрагала шерстистоцветкового, где а – клетки меристематического типа (ув.х 400, окраска – метиленовый синий); б – клетки паренхимного типа (ув.х 200, окраска – метиленовый синий).

Таким образом, проведенные исследования показали возможность получения каллусных культур астрагала шерстистоцветкового на питательной среде, дополненной 2,4-Д, БАП и кинетином. При этом обнаруживалась четкая зависимость индукции каллусогенеза от типа экспланта. В наших исследованиях образование каллуса наблюдалось только при использовании в качестве экспланта молодых листьев. Полученные нами результаты согласуются с уже известными литературными данными, свидетельствующими о том, что у некоторых видов растений способность к каллусогенезу в большей степени лимитирована типом экспланта, чем составом питательной среды [7, 8].

Зависимость индукции каллусогенеза от расположения экспланта на питательной среде проанализирована пока в небольшом количестве экспериментальных работ [7, 9]. Было показано, что способность к каллусообразованию в культуре листовых эксплантов зависела от того, какой стороной (абаксиальной или адаксиальной) лист контактировал с питательной средой. Однако выявленную особенность следует рассматривать, вероятно, как частный случай, обнаруженный для отдельных видов растений. Это подтвердили и проведенные нами исследования, которые показали, что высокая способность к каллусообразованию при культивировании листовых эксплантов астрагала шерстистоцветкового наблюдалась не зависимо от того, какая сторона листа находилась в контакте с питательной средой.

Результаты цитологического анализа каллусных культур показали, что они состояли из рыхло расположенных клеток, легко отделяющихся друг от друга в результате не прочного контакта между ними. При этом в каллусе не были обнаружены морфогенные структуры в виде зачатков почек или эмбриоидов. Установленный факт позволяет сделать заключение, что каллус астрагала шерстистоцветкового, индуцированный на питательной среде, дополненной 2,4-Д, БАП и кинетином может быть использован для получения суспензионной культуры, поскольку свойство каллуса легко распадаться на отдельные клетки и клеточные агрегаты является определяющим фактором при глубинном культивировании [4]. С другой стороны, присутствие в каллусных культурах астрагала шерстистоцветкового крупных локальных скоплений клеток меристематического типа делает их удачным объектом для индукции в них органогенеза или соматического эмбриогенеза. Именно эти клетки, сохраняющие способность к пролиферации, обычно являются своеобразными центрами индукции морфогенеза [8]. В этой связи каллусная культура астрагала шерстистоцветкового может быть использована не только для получения клеточной суспензии, но и, вероятно, для интенсивного клонального микроразмножения данного вида.

ВЫВОДЫ

1. Подобраны условия для индукции каллусогенеза в изолированной культуре листовых эксплантов астрагала шерстистоцветкового (*Astragalus dasyanthus* Pall.) на питательной среде Мурасиге и Скуга, дополненной 2,4-Д (2,0 мг/л), БАП (0,5мг/л) и кинетином (1,0 мг/л).
2. Дана цитологическая характеристика каллусных культур, показано присутствие в них клеток меристематического и паренхимного типов, различающихся по размерам и морфологии.

Список литературы

1. Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. – К.: Логос. – 2005. – 724с.
2. Аркушина Г. Ф. Урбанофлора Кіровограда: Автореф. дис... канд. биол. наук: 03.00.05 / НБС - ННЦ, - Ялта, 2007. – 20 с.
3. Лікарські рослини: Енциклопедичний довідник / Відп. ред. А.М. Гродзинський. – К.: Українська Радянська Енциклопедія ім. М.П. Бажана, Український виробничо-комерційний центр "Олімп". – 1992. – 544 с.
4. Калинин Ф. Л., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – К.: Наук. думка, 1980. – 488 с.
5. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol. Plant.* – 1962. – V.15, № 13. – P. 473 – 497.
6. Паушева Л. А. Практикум по цитологии растений. – М.: Колос, 1980. – 304 с.
7. Митрофанова И. В. Микрклональное размножение субтропических и тропических плодовых культур (обзор литературы) // Сб. науч. трудов Никит. бот. сада "Биотехнологические исследования садовых и других ценных многолетних культур". – 1997. – Т. 119. – С. 63 – 95.
8. Бугара А. М. Клеточная дифференциация и экспериментальный морфогенез у эфиромасличных растений: автореф. дис... доктора биол. наук. – Кишинев, 1992. – 38 с.

-
9. Митрофанова І.В. Соматичний ембріогенез та органогенез як основа біотехнології одержання і збереження багаторічних садових культур: автореф. дис... доктора біол. наук / Ялта, 2007. – 38 с.

Бугара І.О., Юркова І.М., Бугара А.М. Одержання та цитологічний аналіз калусних культур астрагалу шерстистоквіткового (*Astragalus dasyanthus* Pall.) // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2008. – Т. 21 (60). – № 1. – С. 9-14.

Досліджено особливості калусогенезу в культурі вегетативних органів *Astragalus dasianthus* in vitro на живильному середовищі Мурасіге та Скуга, доповненому 2,4-Д 2,0 мг/л, БАП 0,5 мг/л та кинетином 1,0 мг/л. Показано, що калус, індукований з листкових експлантів складався з клітин меристематичного та паренхімного типів, що дозволяє використовувати його для одержання суспензійних культур.

Ключові слова: *Astragalus dasyanthus* Pall., калусна культура.

Bugara I.A., Yurkova I.N., Bugara A.M. Receive and cytological investigation the callus culture of *Astragalus dasyanthus* Pall. // Uchenye zapiski Tavricheskogo Natsionalnogo Universiteta im. V. I. Vernadskogo. Series «Biology, chemistry». – 2008. – V.21 (60). – № 1. – P. 9-14.

Especially of callusogenesis induction in vegetative organs of *Astragalus dasianthus* on the Murashige and Skoog medium (2,4-D 2,0 mg/l, BAP 0,5 mg/l, kinetin 1,0 mg/l) were investigated. It was shown that callus from leaf explants was homogenous and consisted from meristematic and parenchymatic cells.

Keywords: *Astragalus dasyanthus* Pall., callus culture.

Пост упила в редакцію 12.05.2008 г.
