

УДК 582.736.3: 546.23

ВЛИЯНИЕ СЕЛЕНА НА РОСТОВЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ *ASTRAGALUS* *DASYANTHUS* (PALL.) В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Тайкова В.П., Теплицкая Л.М.

Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Украина
E-mail: tajkova@mail.ru

Приведены данные о влиянии различных концентраций селенита натрия на ростовые показатели травянистого многолетника *Astragalus dasyanthus*. Показано, что в диапазоне концентраций 5-15 мг Se (IV)/л индекс роста в культуре клеток астрагала шерстистоцветкового уменьшался по отношению к контролю, а концентрация 15 мг/л вызывала максимальное снижение ростовой активности.

Ключевые слова: астрагал шерстистоцветковый, культура клеток, индекс роста, селен.

ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия в медицине и фармакологии существенно возросло использование лекарственных препаратов, получаемых из растительного сырья. Большая часть растений, необходимых для переработки, произрастает в природных фитоценозах. Увеличение сбора лекарственных растений из дикой природы приводит к истощению их запасов и практически полному уничтожению [1, 2]. В этой связи особенно актуальным является поиск альтернативных источников лекарственного сырья. Перспективным подходом к получению сырья является выращивание *in vitro* клеточных культур лекарственных растений, накапливающих биологически активные вещества вторичного метаболизма и концентрирующих определенные микроэлементы. Использование клеточной биомассы позволяет не только получать экологически чистое сырье, но и сохранять имеющийся генофонд лекарственных растений.

Астрагал шерстистоцветковый (*Astragalus dasyanthus* Pall.) – ценное лекарственное растение. Ранее этот вид был широко распространен в степных и лесостепных районах Украины. Однако в настоящее время ареал его стал разорванным, фрагментарным. С 1980 года астрагал шерстистоцветковый занесен в Красную книгу Украины [3, 4]. В растениях обнаружены тритерпеновые гликозиды, флавоноиды, полисахариды, дубильные вещества, аминокислоты, витамины, макро- и микроэлементы. Важной особенностью этого вида растений, так же как и других видов рода *Astragalus*, является способность избирательно накапливать органически связанный селен (Se). Селен представляет собой физиологически активный микроэлемент, незаменимый в питании человека и животных. Спектр действия Se в организме достаточно широк. Он выполняет каталитическую, антиоксидантную, структурную и регуляторную функции, взаимодействует с витаминами,

ферментами, биологическими мембранами, участвует в окислительно-восстановительных процессах, обмене веществ. Селен регулирует работу иммунной системы. Установлено, что с дефицитом Se в организме связаны различные заболевания. В связи с этим большое значение приобретает получение и накопление растительной биомассы как источника ценных вторичных метаболитов и Se [5, 6].

Целью настоящей работы являлось исследование ростовых характеристик и морфологических особенностей пересаженных клеточных культур в зависимости от содержания различных концентраций селена в искусственных питательных средах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служили длительно пассируемые каллусные культуры астрагала шерстистоцветкового. При выполнении экспериментальной работы использовали методы, общепринятые в исследованиях по культуре изолированных тканей растений [7]. Клеточные культуры II пассажа выращивали до стационарной фазы роста на модифицированных агаризованных питательных средах: Гамборга и Эвелега (B5), дополненной 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой (2,4-Д) - 2,0 мг/л и 6-бензиламинопурином (6-БАП) - 0,5 мг/л, а также на среде Мурасиге и Скуга (MS), дополненной 2,4-Д - 2,0 мг/л, 6-БАП - 0,5 мг/л и кинетином - 0,5 мг/л (табл. 1). Кроме того, питательные среды содержали Se(IV) в концентрациях 5, 10 и 15 мг/л. Источником Se(IV) в питательных средах служил селенит натрия (Na_2SeO_3). Каллус культивировали в условиях термостатированного помещения (25°C) при относительной влажности воздуха 65 - 70 %, освещенности 2-3 тыс. люкс и 16-часовом фотопериоде [8].

Индекс роста (отношение среднего объема каллусной культуры к исходному объему каллуса на 63-и сутки культивирования) определяли морфометрическим методом. Морфологию клеточной культуры астрагала шерстистоцветкового оценивали визуально. Результаты исследований были обработаны статистически с помощью программы Microsoft Office Excel 2003.

Таблица 1.

Состав модифицированных питательных сред Гамборга и Эвелега и Мурасиге и Скуга

Компоненты	Концентрация	
	Гамборга и Эвелега	Мурасиге и Скуга
Среда		
1	2	3
<i>Макроэлементы, мг/л</i>		
KNO_3	2500	1900
NH_4NO_3	-	1650
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250	370
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	150	440
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	134	-
NaH_2PO_4	150	-
KH_2PO_4	-	170
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8	27,8
Na EDTA·2H ₂ O	37,8	37,8

ВЛИЯНИЕ СЕЛЕНА НА РОСТОВЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ASTRAGALUS

Продолжение таблицы 1.

1	2	3
<i>Микроэлементы, мг/л</i>		
KJ	0,75	0,75
H ₃ BO ₃	3,0	6,2
MnSO ₄ ·4H ₂ O	10,0	22,3
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2,0	8,6
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	0,25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	0,025
<i>Органические добавки, мг/л</i>		
Мезоинозит	100	100
Витамин PP	1,0	0,5
Витамин B ₆	1,0	0,5
Витамин B ₁	10,0	0,1
Глицин	-	2,0
Сахароза	20000	20000
Аскорбиновая кислота	5,0	5,0
<i>Фитогормоны, мг/л</i>		
2,4-Д	2,0	2,0
6-БАП	0,5	0,5
кинетин	-	0,5
pH	5,5 - 5,8	5,5 - 5,8

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Культивирование каллусных культур астрагала *in vitro* позволило выявить закономерности роста в зависимости от внесения в питательную среду различных концентраций селена.

Несмотря на достаточно высокие концентрации селена в питательной среде, ни в одном из вариантов опыта не было зарегистрировано прекращение роста культуры [9]. В обоих вариантах питательных сред наблюдалось снижение индекса роста каллусной культуры по мере увеличения концентрации селена в среде.

В первом варианте питательной среды Гамборга и Эвелега B5 (I), содержащей Se в концентрации 5,0 мг/л индекс роста каллусной культуры снижался до 3,4 по сравнению с контрольным вариантом (5,2). Второй вариант среды B5 (II) содержал Se в концентрации 10,0 мг/л, что также приводило к достоверному снижению ростового индекса до 2,7 по сравнению с контролем. В третьем варианте питательной среды B5 (III), концентрация Se 15,0 мг/л приводила к наибольшему уменьшению ростовой активности каллуса до 1,2 по сравнению с контрольным вариантом (табл. 2).

Таблица 2.
Зависимость индекса роста *Astragalus dasyanthus* в вариантах модифицированной среды Гамборга и Эвелега (B5) от концентрации Se в среде

Вариант опыта	Концентрация Se в питательной среде, мг/л	Индекс роста
B5 (контроль)	-	5,2 ± 1,0
B5 (I)	5,0	3,4 ± 0,9
B5 (II)	10,0	2,7 ± 0,5
B5 (III)	15,0	1,2 ± 0,3

Аналогичная зависимость индекса роста от концентрации Se в питательной среде наблюдалась в опытных вариантах на среде Мурасиге и Скуга. В варианте питательной среды Мурасиге и Скуга MS (I), содержащей Se в концентрации 5,0 мг/л индекс роста каллусной культуры снижался до 4,2 по сравнению с контрольным вариантом (6,0). Второй вариант среды MS (II) содержал Se в концентрации 10,0 мг/л, что приводило к достоверному снижению ростового индекса до 3,6 по сравнению с контролем. В третьем варианте питательной среды MS (III), концентрация Se 15,0 мг/л максимально ингибировала ростовую активность каллуса до 1,5 по сравнению с контролем (табл. 3).

Таблица 3.
Зависимость индекса роста *Astragalus dasyanthus* в вариантах модифицированной среды Мурасиге и Скуга (MS) от концентрации Se в среде

Вариант опыта	Концентрация Se в питательной среде, мг/л	Индекс роста
MS (контроль)	-	6,0 ± 0,4
MS (I)	5,0	4,2 ± 0,7
MS (II)	10,0	3,6 ± 0,9
MS (III)	15,0	1,5 ± 0,2

Анализируя полученные результаты, следует отметить, что в диапазоне концентраций 5-15 мг Se (IV)/л индекс роста в культуре клеток астрагала шерстистоцветкового достоверно снижался по отношению к контролю, а селен в концентрации 15 мг/л оказывал максимальное тормозящее воздействие на рост культуры клеток астрагала. Таким образом, культура клеток астрагала шерстистоцветкового способна переносить высокие концентрации селенита натрия без ущерба для своей жизнедеятельности.

В ходе выполнения работы был проведен морфологический анализ каллуса астрагала, культивируемого на различных вариантах искусственной питательной среды Мурасиге и Скуга, дополненной 2,4-Д – 2,0 мг/л; 6-БАП – 0,5 мг/л; кинетином – 0,5 мг/л и содержащей Se в концентрациях 5, 10 и 15 мг/л [8]. Анализ показал, что каллусная культура во всех вариантах питательной среды

ВЛИЯНИЕ СЕЛЕНА НА РОСТОВЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ASTRAGALUS

характеризовалась рыхлой консистенцией, умеренной оводненностью, ее цвет в процессе роста изменялся от светло-зеленого до светло-коричневого (рис. 1-4).

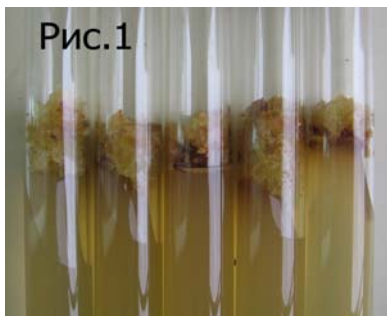


Рис. 1. Внешний вид каллусной культуры *Astragalus dasyanthus* на среде Мурасиге и Скуга без Se.

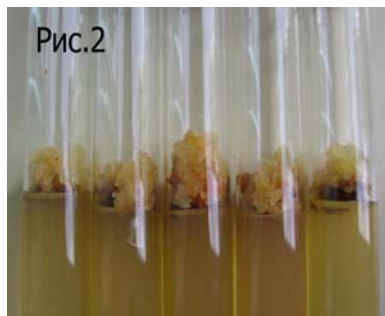


Рис. 2. Внешний вид каллусной культуры *Astragalus dasyanthus* на среде Мурасиге и Скуга, Se – 5,0 мг/л.

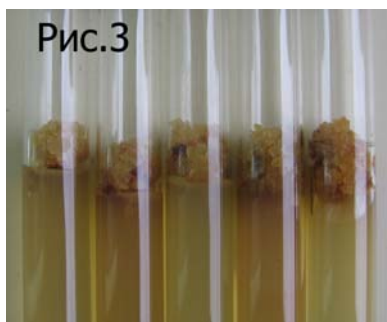


Рис. 3. Внешний вид каллусной культуры *Astragalus dasyanthus* на среде Мурасиге и Скуга, Se – 10 мг/л

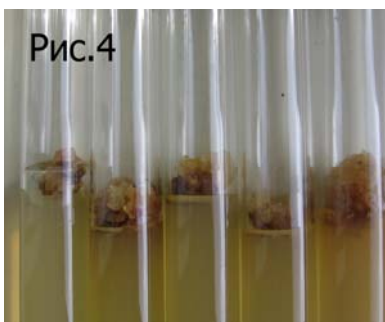


Рис. 4. Внешний вид каллусной культуры *Astragalus dasyanthus* на среде Мурасиге и Скуга, Se – 15 мг/л

ВЫВОДЫ

1. Изучена зависимость изменения величины индекса роста от содержания различных концентраций селена в питательных средах Гамборга и Эвелега и Мурасиге и Скуга. Показано, что в диапазоне концентраций 5-15 мг Se (IV)/л индекс роста в культуре клеток астрагала шерстистоцветкового достоверно уменьшался по отношению к контролю, а концентрация 15 мг/л вызывала максимальное снижение ростовой активности.
2. Проведен морфологический анализ и дана характеристика каллусных культур астрагала в процессе их роста. Показано, что основные морфологические параметры культуры не зависят от концентрации селена в питательной среде.

Список литературы

1. Шаин С.С. Биорегуляция продуктивности растений / Шаин С.С. – М.: «ОБЕРЛЕЙ», 2005. – 228 с.
2. Бутенко Р.Г. Клеточные технологии для получения экономически важных веществ растительного происхождения / Р.Г. Бутенко // Культура клеток растений и биотехнология. М.: Наука, 1986. С. 3–20.
3. Заверуха Б.В. Охраняемые растения Украины / Заверуха Б.В., Андрияненко Т.Л., Протопопова В.В. – Киев: Наукова думка, 1983. – 176 с.
4. Определитель высших растений Украины / [Доброчаева Д.Н., Котов М.И., Прокудин Ю.Н. и др.] – Киев: Наукова думка, 1987. – 548 с.
5. Печенникова Е.В. О биологическом значении микроэлементов / Е.В. Печенникова, В.В. Вашкова, Е.А. Можаяв // Гигиена и санитария. – 1997. – № 4. – С. 41–43.
6. Микроэлемент селен: роль в процессах жизнедеятельности / И.В. Гмошинский, В.К. Мазо, В.А. Тутельян [и др.] // Экология моря. – 2000. – 54. – С. 5–19.
7. Калинин Ф.Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. – К.: Наук. думка, 1980. – 488 с.
8. Высоцкий В.А. Клональное микроразмножение растений / В.А. Высоцкий // Культура клеток растений и биотехнология – М.: Наука, 1986. – С. 34–36.
9. Влияние селена на рост микроводоросли *Spirulina platensis* (Nords.) в накопительной и квазинепрерывной культурах / Г.С. Минюк, Р.П. Тренкеншу, А.В. Алисиевич [и др.] // Экология моря. – 2000. – 54. – С. 42–49.

Тайкова В.П. Вплив селену на ростові характеристики *Astragalus dasyanthus* (Pall.) в культурі *in vitro* / В.П. Тайкова, Л.М. Теплицька // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2010. – Т. 23 (62). – № 2. – С. 157-162.

Наведено дані про вплив різних концентрацій селеніту натрію на ростові показники трав'янистого багатолітника *Astragalus dasyanthus*. Показано, що в діапазоні концентрацій 5-15 мг Se (IV) / л індекс зростання в культурі клітин астрагала шерстистоквіткового знижувався по відношенню до контролю, а концентрація 15 мг / л викликала максимальне зменшення ростової активності.

Ключові слова: астрагал шерстистоквітковий, культура клітин, індекс зростання, селен.

Taikova V. Effect of selenium on the growth characteristics of *Astragalus dasyanthus* (Pall.) in culture *in vitro* / V. Taikova, L. Teplitskaya // Scientific Notes of Taurida V.Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2010. – V.23 (62). – № 2. – P. 157-162.

The data on the effect of different concentrations of sodium selenite on growth rates herbaceous perennials *Astragalus dasyanthus* are listed here. It is shown that in the range of 5-15 mg Se (IV) / l index of growth in cultured cells of *Astragalus dasyanthus* decreased relative to control, and the concentration of 15 mg / l caused maximum decrease of growth activity.

Keywords: *Astragalus dasyanthus*, cell culture, growth index, selenium.

Поступила в редакцію 19.04.2010 г.