

БИОТЕХНОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ**ОСОБЕННОСТИ КАЛЛУСОГЕНЕЗА В КУЛЬТУРЕ ВЕГЕТАТИВНЫХ ОРГАНОВ
GINKGO BILOBA L.**

Л.М. ТЕПЛИЦКАЯ, кандидат биологических наук;

С.И. ЧМЕЛЕВА, кандидат биологических наук;

И.А. БУГАРА, кандидат биологических наук;

А.М. БУГАРА, доктор биологических наук

Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского

Введение

Одним из важных и актуальных направлений биотехнологии является получение веществ вторичного метаболизма на основе культуры *in vitro*. Таким путем получают эфирные масла, алкалоиды, терпены, гликозиды, используемые в медицине, пищевой и парфюмерной промышленности. В этой связи весьма перспективной и актуальной является разработка клеточных технологий, способствующих увеличению синтеза вторичных метаболитов в культуре *in vitro* [1, 2].

Ginkgo biloba L. – реликт, единственный вид семейства Гинкговых, еще сохранившийся до наших дней. Растение является уникальным по своим лечебным свойствам. Ведущие современные эксперты по лекарственным растениям называют его «деревом молодости».

Гинкго двулопастный – единственное из известных науке растений, содержащее специфические вещества – гинкголиды и билобиды, которые повышают эластичность стенок кровеносных сосудов, обладают сосудорасширяющими свойствами, подавляют воспалительные реакции путем ингибирования фактора активации тромбоцитов (ФАТ), тем самым предотвращая их агрегацию и улучшая циркуляцию крови в сосудистом русле. Повышенный уровень ФАТ отмечается при таких серьезных заболеваниях, как астма, инфаркт миокарда, атеросклероз, аритмия сердца и др. [3, 4].

Исследования, направленные на разработку клеточных технологий увеличения числа вторичных метаболитов и их содержания в культуре тканей *in vitro*, представляются актуальными и перспективными.

Целью наших исследований было оптимизация условий получения каллусных культур гинкго двулопастного и их анализ на содержание биологически активных веществ.

Объекты и методы исследования

Материалом для экспериментальных исследований по культуре клеток и тканей служили вегетативные органы растений *G. biloba*, произрастающего в ботаническом саду Таврического национального университета им. В.И. Вернадского.

В качестве инициальных эксплантов использовали высечки молодой листовой пластинки, черешки листьев и семяпочки. Для соблюдения условий асептики работу по введению эксплантов в изолированную культуру выполняли в условиях ламинарного бокса. Поверхностную стерилизацию материала проводили ступенчато: сначала 70% этанолом (1 сек), затем 50% бралофеном (30–45 сек) и 15 % перекисью водорода (5 мин) с последующей промывкой в стерильной дистиллированной воде.

Экспланты культивировали на модифицированных агаризованных питательных средах Мурасиге и Скуга (МС) [5, 6], дополненных 2,4-Д, 6-БАП и ИУК. Цикл выращивания культуры составлял 70–90 суток. Частоту каллусообразования оценивали в процентах по количеству эксплантов, сформировавших каллус, от общего числа введенных.

Для химического анализа на содержание фенольных веществ использовали каллусные культуры 1-го и 2-го пассажей, индуцированные из высечек молодых листовых пластинок. Для определения наличия фенольных соединений применяли хроматографический метод на пластине "Sorbfil" (Россия).

Для разделения фенольных соединений на фракции использовали систему растворителей – 25% трихлоруксусная кислота: 96% этанол: 3% трихлорамин Т. Пластины нагревали при температуре 100-120 °С. Контролем служили водно-спиртовые экспланты из листьев и стеблей гинкго билоба.

Результаты и их обсуждение

Известно, что морфологические потенции культивируемых тканей зависят от органа, из которого взят эксплант, его физиологического возраста, размера, анатомических и функциональных особенностей. В ряде работ показано, что способность к морфогенезу в условиях *in vitro* у различных органов одного и того же растения различна [1-3]. Известно, что наибольшей пролиферативной активностью будут обладать слабо дифференцированные ткани, или имеющие потенции к пролиферационной активности в силу своих морфогенетических и функциональных особенностей. При выборе экспланта мы руководствовались этими условиями и использовали в качестве эксплантов следующие части растения: высечки молодой листовой пластинки, черешки листьев, семяпочки.

В результате проведенных исследований было показано, что наилучшими эксплантами для индукции каллусогенеза при культивировании тканей *G. biloba* на модифицированных по содержанию и составу регуляторов роста питательных средах на основе среды Мурасиге и Скуга являются высечки молодых листовых пластинок. Как видно из таблицы 1, максимальная частота каллусообразования отмечена у эксплантов из молодой листовой пластинки (98,6%) и черешков листьев (86,4%) при культивировании на варианте среды, содержащей регуляторы роста в следующих концентрациях: ИУК – 1,0 мг/л; 2,4-Д – 2,5 мг/л и 6-БАП – 0,4 мг/л. При использовании вариантов питательной среды с увеличенным содержанием 6-БАП (0,5 – 0,6 мг/л) высечки листовой пластинки проявляли также высокую способность к каллусогенезу (86,6 и 73,3%) в сравнении с другими типами эксплантов.

Однако следует отметить, что низкие (0,2 мг/л) и высокие (0,5 – 0,6 мг/л) концентрации 6-БАП в питательной среде снижали показатель частоты каллусообразования при использовании высечек листовых пластинок от 98,6% до 73,3%. Значительно меньше этот показатель был при использовании в качестве эксплантов семяпочек (16,6 – 46,6%).

Наиболее высокая частота каллусообразования у высечек молодой листовой пластинки составила 98,6% и отмечена на модифицированной среде МС-4, содержащей ИУК – 1,0 мг/л, 2,4-Д – 2,5 мг/л, 6-БАП – 0,4 мг/л.

Таким образом в результате наших исследований установлено, что решающее значение для индукции каллусогенеза в культуре тканей *G. biloba* играет наличие в культуральной среде веществ как цитокининовой, так и ауксиновой природы. При культивировании эксплантов на питательных средах с низким содержанием данных регуляторов роста каллусообразования отмечено не было.

Результаты наших исследований свидетельствуют о том, что полученная каллусная культура характеризуется невысоким ростовым индексом (один цикл выращивания составлял 70 – 90 суток). Каллус, индуцированный из эксплантов различного типа, имел светло-зеленую и коричневатую окраску (рис.1), характеризовался плотной консистенцией и невысокой скоростью роста.

При пассировании каллусных культур на свежеприготовленные питательные среды они сохраняли невысокую интенсивность роста. При выращивании каллусных культур на испытуемых питательных средах при температуре 20 – 25 °С и освещенности 3 – 4 тыс. лк. культивируемые ткани были окрашены в светло-коричневые тона и имели плотную консистенцию.

Таблица 1

Частота каллусообразования в культуре *in vitro* гинкго двулопастного (*G. biloba* L.) в зависимости от типа экспланта и состава питательной среды

Вариант среды	Тип и концентрация регуляторов роста в среде, мг/л			Тип экспланта	Частота каллусообразования, %
	ИУК	2,4-Д	6-БАП		
МС-2	0,4	1,0	0,1	высечки молодой листовой пластинки	-
				черешки листьев	-
				семяпочки	-

МС-3	1,0	1,0	0,2	высечки молодой листовой пластинки	40,3±2,0
				черешки листьев	-
				семяпочки	-
МС-4	1,0	2,5	0,4	высечки молодой листовой пластинки	98,6±4,9
				черешки листьев	86,4±3,3
				семяпочки	46,6±1,7
МС-5	1,0	2,5	0,5	высечки молодой листовой пластинки	86,6±4,3
				черешки листьев	53,2±2,6
				семяпочки	50,0±1,2
МС-6	1,5	3,0	0,6	высечки молодой листовой пластинки	73,3±1,3
				черешки листьев	50,0±1,5
				семяпочки	37,3±1,2
МС-7	2,0	1,0	0,4	высечки молодой листовой пластинки	45,5±2,3
				черешки листьев	9,1±0,4
				семяпочки	-
МС-8	2,0	1,5	0,4	высечки молодой листовой пластинки	70,1±3,5
				черешки листьев	13,3±0,9
				семяпочки	16,6±1,2



Рис. 1. Каллусная культура *G. biloba*

Вторичные метаболиты гинкго являются очень мощными и действенными лекарственными средствами, занимающими в современной медицине одно из самых ведущих мест [2]. Это еще раз подчеркивает актуальность и перспективность исследований, направленных на получение веществ вторичного происхождения из каллусных культур.

Данные хроматографического анализа каллусных культур из высечек молодой листовой пластинки и интактного растения гинкго двулопастного представлены на рисунке 2.

Нами было установлено, что каллусные культуры из эксплантов молодых листьев содержат фенольные соединения, характерные для интактного растения. Были выявлены десять фракций фенольных соединений, из которых шесть фракций анакардовой кислоты (светло-

коричневые хроматографические зоны), и четыре фракции билобола (коричневые хроматографические зоны).

При анализе каллусных культур, полученных из эксплантов листового происхождения на содержание фенольных соединений, нами было обнаружено четыре фракции анакардовой кислоты (светло-коричневые хроматографические зоны).

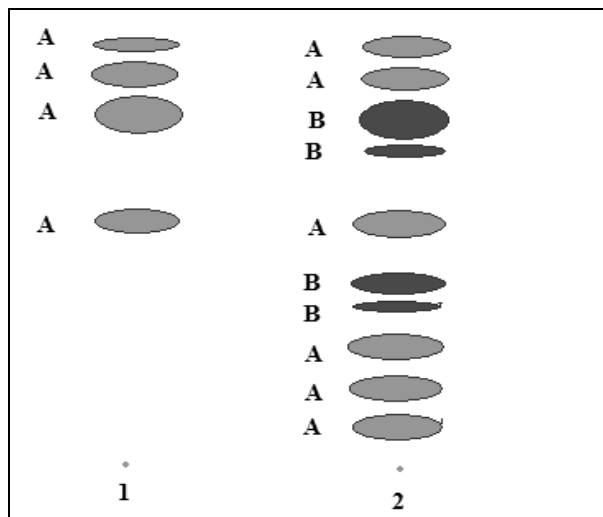


Рис. 2. Схема распределения фракций фенольных соединений из высечек молодой листовой пластинки интактных растений и каллусных культур гинкго двулопастного:

1 – каллусная культура; **2** – листовая пластинка интактного растения; **A** – анакардовая кислота; **B** – билобол.

Поскольку исследований по химическому анализу каллусных культур гинкго двулопастного на содержание фенольных соединений ранее не проводилось, настоящая работа является первым экспериментальным доказательством получения каллусных культур данного вида, содержащих фенольные соединения. Эти результаты открывают возможности для дальнейших исследований, направленных на получение каллусных культур, содержащих фракции фенольных соединений, обладающих биологической активностью, а каллусная культура может быть использована как источник их получения.

Выводы

1. Получены каллусные культуры гинкго двулопастного (*G. biloba*) и установлено, что оптимальным эксплантом для индукции каллусогенеза являются высечки молодой листовой пластинки.
2. Показано, что оптимальной средой для индукции каллусогенеза является среда Мурасиге и Скуга, дополненная 2,5 мг/л 2,4-Д, 1,0 мг/л ИУК и 0,4 мг/л 6-БАП.
3. Установлено, что каллусные культуры из эксплантов молодых листьев содержат фенольные соединения, идентичные для листьев интактного растения, что дает основание для использования каллусной культуры *G. biloba* в качестве источника ценных биологически активных веществ.

Список литературы

1. Бутенко Р.Г. Биология культивируемых клеток и биотехнология на их основе. – М.: ФГК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
2. Головкин Б.Н., Руденская Р.Н., Трофимов И.А. Биологически активные соединения растительного происхождения: В 3 томах. – М.: Наука, 2001-2002 гг. – Т.3. – С. 105-223.
3. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микроклонального размножения растений. – К.: Наук. думка, 1992. – 488 с.
4. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. – К.: Логос, 2005. – 730 с.

5. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* – 1962. – V.15, №13. – P. 473-497.

6. Murashige T. Plant propagation through tissue culture // *Physiol. Plant.* – 1974. – V.25. – P. 135-166.

7. Hussey G. *In vitro* methods of plant propagation // *Sci. Hort.* – 1975. – № 1. – P. 16-20.

Рекомендовано к печати д.б.н. Митрофановой И.В.