

ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* *ARTEMISIA DRACUNCULUS* L.

А.Г. ИНЮТКИНА; Н.А. ЕГОРОВА, кандидат биологических наук
Институт эфиромасличных и лекарственных растений УААН,
г. Симферополь

Введение

Различные виды рода *Artemisia* L., относящиеся к семейству астровых (*Asteraceae* L.), являются перспективными эфиромасличными, лекарственными и пряноароматическими растениями [6]. Полынь эстрагон (*A. dracunculus*) пользуется популярностью в народной и традиционной медицине как общеукрепляющее и жаропонижающее средство, а также применяется при желудочно–кишечных и кожных заболеваниях [2]. Из–за большой востребованности эстрагона как пряновкусового сырья в пищевой и консервной промышленности его широко культивируют в Западной и Южной Европе, на Кавказе, в США.

Известно, что использование методов культуры тканей позволяет создавать генетически разнообразный исходный селекционный материал и ускоренно размножать ценные генотипы и сорта растений [3]. Поэтому разработка биотехнологических методов для полыни эстрагон является перспективным направлением. Для создания таких клеточных технологий необходимо прежде всего оптимизировать условия получения и пассирования каллусных тканей. В литературе имеются данные по изучению морфогенетических способностей различных тканей и органов полыни лимонной (*A. balchanorum* Krasch.) и полыни метельчатой (*A. scoparia* W. K.) при культивировании *in vitro* [7], а также по клональному микроразмножению полыни лимонной [8]. Что же касается полыни эстрагон, то известны лишь сообщения, касающиеся изучения накопления эфирного масла в каллусных тканях [10], а также влияния отдельных факторов на микроразмножение [11].

Целью данной работы было изучение влияния различных режимов стерилизации на получение асептической культуры, а также исследование влияния состава питательной среды и типа экспланта на индукцию каллусогенеза в культуре *in vitro* у полыни эстрагон.

Объекты и методы

Объектом исследований служили четыре перспективных селекционных образца полыни эстрагон (*Artemisia dracunculus* L.) – №5р.24, №7р.1, №6р.17, №3р.3, различающиеся по морфологии и составу эфирного масла [9]. Для получения первичного каллуса в качестве первичных эксплантов использовали фрагменты стеблей, листовых пластинок и молодые соцветия (корзинки размером 0,3–0,5 см).

Для стерилизации растительный материал вначале промывали в мыльном растворе и ополаскивали проточной и дистиллированной водой. Затем в условиях ламинар–бокса проводили последовательную обработку 70% этанолом, 50% препаратом «Брадофен» и 0,1% раствором диацита с использованием различных экспозиций. После стерилизации растительный материал 3–4 раза промывали стерильной дистиллированной водой. Экспланты помещали на питательную среду Мурасиге и Скуга (МС), дополненную регуляторами роста (2,4–Д, ИУК, НУК, кинетин, БАП) в различных комбинациях и концентрациях. Стерилизацию сред, материалов и работу в асептических условиях проводили по стандартным методикам, принятым в работах по культуре тканей [3].

Экспланты культивировали в пробирках с 10 мл питательной среды в культуральной комнате при температуре 26⁰С, относительной влажности воздуха 70%, освещенности 600 лк с 16 часовым фотопериодом.

Частоту каллусообразования определяли в процентах как отношение числа эксплантов с каллусом к общему числу эксплантов. В конце пассажа проводили морфобиологическое описание каллусной ткани и визуально оценивали интенсивность образования каллуса по 3 балльной системе. За 1 балл был принят прирост первичного каллуса массой 200–500 мг, 2 балла – 600–900 мг, 3 балла – 1000–1300 мг. Каждый опыт проводили в 3 кратной повторности, при этом в каждом варианте анализировалось 10–15 пробирок. Для обработки полученных данных использовали стандартное приложение пакета статистики в MS Excel.

Результаты и обсуждение

Одним из основных условий успешного культивирования изолированных тканей и органов в культуре *in vitro* является получение асептической культуры из исходного растительного материала. В качестве стерилизующих веществ были испытаны 70%-ный этиловый спирт, 50%-ный раствор препарата «Брадофен» и 0,1%-ный раствор диацита. В ходе предварительных исследований было определено, что диацит вызывает значительное повреждение растительных тканей эстрагона, поэтому в дальнейших исследованиях мы использовали 50%-ный раствор препарата «Брадофен». Установлено, что при стерилизации этиловым спиртом с экспозицией 40 секунд и препаратом «Брадофен» (8 и 12 минут) наблюдался высокий уровень некротизации растительных тканей (табл. 1). При обработке препаратом «Брадофен» в течение 8 мин количество некротических эксплантов составило 23,6%. Увеличение экспозиции до 12 мин повысило уровень некротизации до 47,2%, при этом процент живых стерильных эксплантов составил всего 52,8.

Уменьшение экспозиции этанола до 30 секунд снизило уровень некротизации растительных тканей полыни. Так, при стерилизации этанолом в течение 30 секунд и препаратом «Брадофен» в течение 8 мин не наблюдали появления некротических эксплантов, однако уровень инфицированности был высоким (73,4%). Увеличение времени воздействия препарата «Брадофен» позволило снизить процент инфицированности эксплантов. При стерилизации листовых эксплантов в течение 12 мин препаратом «Брадофен» процент живых стерильных эксплантов составил 93,3%, при этом количество некротических эксплантов снизилось до 6,7%.

Таблица 1

Влияние условий стерилизации на получение асептической культуры листовых эксплантов полыни эстрагон

Условия стерилизации			Количество эксплантов		
Вещество	Концентрация, %	Экспозиция	Инфицированных, %	живых стерильных %	некротических, %
Этанол + Брадофен	70	30 сек	73,4±6,6	26,6±6,6	0,0±0,0
	50	8 мин			
Этанол + Брадофен	70	30 сек	55,0±5,0	32,5±7,5	12,5±3,0
	50	10 мин			
Этанол + Брадофен	70	30 сек	0,0±0,0	93,3±3,3	6,7±3,3
	50	12 мин			
Этанол + Брадофен	70	40 сек	0,0±0,0	76,4±3,6	23,6±3,6
	50	8 мин			
Этанол + Брадофен	70	40 сек	0,0±0,0	52,8±2,8	47,2±2,8
	50	12 мин			

При введении растительных тканей и органов в культуру *in vitro* в результате дедифференциации клеток исходного экспланта и их дальнейшего деления происходит образование каллусной ткани. Экспериментальные данные, имеющиеся в литературе, свидетельствуют о том, что способность к каллусообразованию в значительной степени определяется типом и концентрацией ауксинов и цитокининов. При этом для каждого вида или даже сорта необходим различный гормональный состав питательных сред. Так, для образования каллусных культур у клюквы болотной необходимо было совместное введение 2,4–Д и кинетина [5], для *Silene vulgaris* (M.) G. – 2,4–Д и БАП [4], а для *Convallaria majalis* L. – НУК и кинетина [1].

В наших экспериментах было установлено, что индукция образования первичного каллуса у эстрагона зависела от гормонального состава питательной среды и типа экспланта. При введении в культуру *in vitro* 3 различных типов эксплантов индукция каллусогенеза на испытываемых средах происходила только при использовании высечек листьев и сегментов стеблей. Из молодых соцветий у трех генотипов полыни (№7р.1, №бр.17, №3р.3) наблюдали лишь единичное образование небольшого каллуса, не способного к дальнейшей пролиферации. Поэтому в дальнейших исследованиях в качестве эксплантов были использованы высечки листьев и сегменты стеблей.

Отмечено, что на контрольной, безгормональной среде из листовых и стеблевых эксплантов не происходило образования каллуса; экспланты на 30–40 сутки культивирования имели темно-коричневую окраску. Добавление кинетина в концентрации 1,0 мг/л также не способствовало пролиферации каллуса (рис. 1). При внесении в такой же концентрации в состав питательной среды другого цитокинина – БАП (МС 24), через 2 недели культивирования на месте среза, а иногда по всей поверхности экспланта наблюдали образование каллуса. Частота каллусообразования составила 6,7 и 15,0% из листового и стеблевого эксплантов соответственно. Каллус на этой среде имел коричневую окраску, рыхлую консистенцию и минимальный прирост (рис. 2).

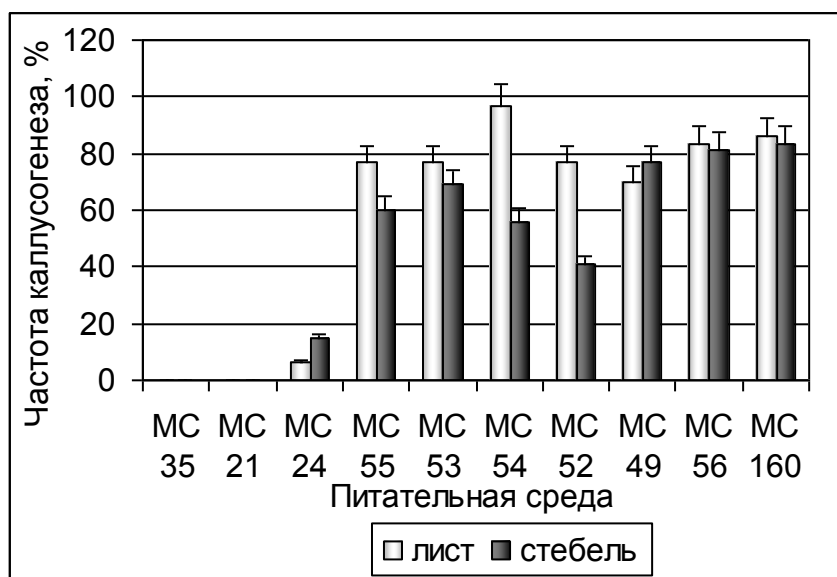


Рис. 1. Влияние состава питательной среды и типа экспланта на индукцию каллусообразования в культуре *in vitro* полыни эстрагон (№5р.24). Гормональный состав питательных сред МС (мг/л): МС 35 – Безгормональная; МС 21 – Кинетин (1,0); МС 24 – БАП (1,0); МС 55 – 2,4–Д (1,0); МС 53 – 2,4–Д (2,0); МС 54 – НУК (1,0); МС 52 – НУК (2,0); МС 49 – ИУК (1,0); МС 56 – Кинетин (1,0)+2,4–Д (1,0); МС 160 – БАП (1,0)+ НУК (1,0).

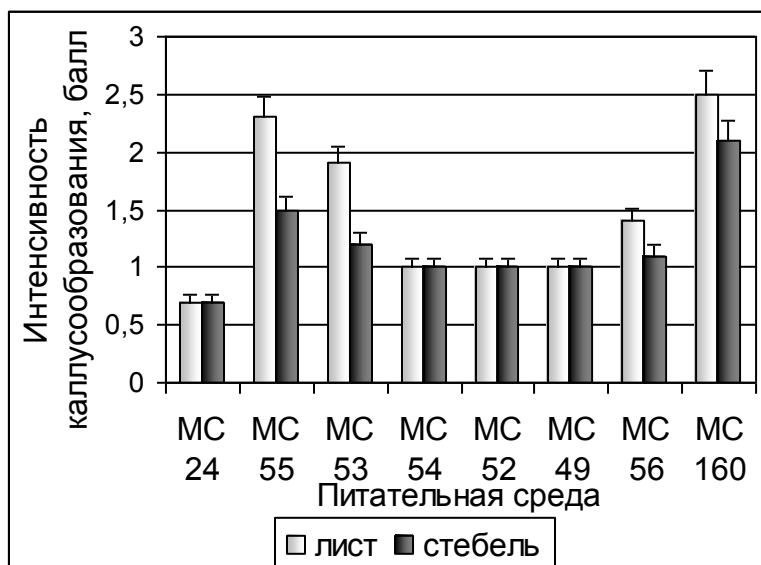


Рис. 2. Влияние состава питательной среды и типа экспланта на интенсивность образования каллуса в культуре *in vitro* полыни эстрагон (№5р.24). Состав питательных сред см. рис. 1.

При введении в состав питательной среды в качестве индукторов каллусообразования регуляторов роста ауксинового типа действия (НУК, ИУК, 2,4-Д) удалось значительно увеличить изучаемые показатели. Так, на среде МС 54 с добавлением НУК (1,0 мг/л) частота каллусогенеза повысилась до 96,7% из листовых эксплантов и 56,0% из стеблевых эксплантов, но интенсивность пролиферации каллуса была на низком уровне и составляла всего 1 балл (рис. 2). Увеличение концентрации НУК до 2,0 мг/л (МС 52), уменьшило процент каллусогенеза в 1,3 – 1,4 раза, при этом интенсивность пролиферации каллуса осталась на том же низком уровне. Внесение ИУК в концентрации 1,0 мг/л (МС 49) незначительно увеличило частоту каллусогенеза из стеблевых эксплантов (76,7%), по сравнению с листовыми (70,0%), но интенсивность образования каллуса была такой же как на среде МС 54. Каллус на этих средах имел коричневую окраску и рыхлую консистенцию.

При добавлении в состав питательной среды 2,4-Д в концентрации 1,0 мг/л (МС 55) отмечалась высокая интенсивность пролиферации каллуса из листового и стеблевого эксплантов (2,3 балла и 1,5 балла соответственно), но процент каллусогенеза был немного ниже, чем при использовании НУК (рис. 1). Каллус на этой среде был оводнённым, имел зеленовато-бурую окраску, иногда с белым налетом и рыхлую консистенцию. В некоторых случаях в каллусе листового происхождения отмечалось образование корней. Увеличение концентрации 2,4-Д до 2,0 мг/л (МС 53) достоверно не повлияло на частоту каллусогенеза, но уменьшило интенсивность пролиферации каллуса в 1,2 раза по сравнению со средой МС 55.

Совместное использование ауксинов (2,4-Д, НУК) и цитокининов (БАП, кинетин) в питательных средах МС 56 и МС 160 способствовало достоверному повышению частоты образования каллуса из стеблевых эксплантов по сравнению со средами, содержащими только один из ауксинов (МС 54, МС 55). При использовании в качестве эксплантов высечек листа наблюдали другую закономерность. Более эффективным было введение только одного НУК. На среде МС 54 частота каллусогенеза была максимальной, но, как уже упоминалось ранее, интенсивность образования каллуса составила всего 1 балл. Добавление к этому ауксину цитокинина БАП (МС 160) повысило интенсивность пролиферации каллуса в 2,5 из листовых и в 2,1 раза из стеблевых эксплантов, немного уменьшив частоту каллусогенеза из

листовых эксплантов. Каллус на этой среде имел светло-бежевую или бежевую окраску и рыхлую консистенцию. На среде МС 56, содержащей кинетин (0,5 мг/л) и 2,4-Д (1,0 мг/л), частота каллусогенеза достоверно не различалась по сравнению со средой МС 55, однако интенсивность пролиферации каллуса уменьшилась в 1,4–1,6 раза (рис. 1, 2).

Установлено, что тип экспланта оказывал влияние на индукцию образования каллуса. На большинстве испытанных питательных сред (МС 55, 53, 54, 52) частота каллусогенеза была выше при использовании листовых эксплантов (рис. 1). На остальных изученных средах эти различия были недостоверными. Следует также отметить, что интенсивность образования каллуса на средах МС 55, 56, 53, 160 также была выше при использовании листовых эксплантов по сравнению со стеблевыми (рис. 2).

Выводы

Таким образом, в результате исследований установлено, что для получения асептической культуры из листовых и стеблевых эксплантов полыни эстрагон необходимо использовать последовательную обработку 70%-ным этиловым спиртом (30 секунд) и 50%-ным раствором препарата «Брадофен» (12 минут), что обеспечивает получение 93,3% стерильных эксплантов. Индукция образования каллуса зависела от состава питательной среды и типа экспланта. Показано, что из сегментов стеблей и высечек листьев высокая частота каллусогенеза (83,0–85,9%) и интенсивность образования каллуса (2,1–2,5 балла) были отмечены при использовании среды МС с добавлением 0,5 мг/л БАП и 1,0 мг/л НУК. При введении в культуру листовых эксплантов на большинстве питательных сред частота образования каллуса и интенсивность его пролиферации были выше, чем при использовании стеблевых эксплантов.

Список литературы

1. Аверьянова В.А., Александрова И.В., Быков В.А. Особенности каллусогенеза ландыша майского (*Convallaria majalis* L.) в зависимости от физиологического состояния экспланта // Биотехнология. – 2002. – №5. – С. 49–58.
2. Большая энциклопедия. Лекарственные растения в народной медицине. – М : Дом АНС, 2007. – С. 175–176.
3. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М.: Наука, 1964. – 272с.
4. Гюнтер Е.А. Получение каллусных культур *Silene vulgaris* (M.) G. // Биотехнология. – 2007. – №6. – С. 41–45.
5. Влияние гормонального состава среды Андерсона на рост растений клюквы и образование каллусов в культуре *in vitro* / Лобов В.П., Брилкина А.А., Веселов А.П. и др. // Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр. – К.: Логос, 2006. – Т.3. – С. 473–478.
6. Новые эфиромасличные культуры: Справочник / Машанов В.И., Андреева Н.Ф., Машанов Н.С., Логвиненко И.Е. – Симферополь: Таврия, 1988. – 160 с.
7. Митрофанова О.В., Логвиненко И.Е., Иванова Н.Н. Регенерация растений из изолированных органов и тканей *Artemisia balchanorum* Krasch. и *Artemisia scoparia* W. K. // Биотехнологические исследования садовых и других ценных многолетних культур: Тр. ГНБС. – 1997. – Т.119. – С. 143–153.
8. Спринчану Е.К. Культивирование *Artemisia balchanorum* Krasch. *in vitro* и разработка технологии ее клонального микроразмножения // Растительные ресурсы. – 1990. – Вып.2. – С. 242–248.

9. Хараим Н.Н., Невкрытая Н.В., Кривда С.И. Анализ селекционной ценности коллекционных образцов полыни эстрагон (*Artemisia dracunculus* L.) // Наук. зап. Терноп. пед. ун-ту. Сер. біол. – 2007. – №3(33). – С. 85–89.

10. Cotton C.M., Gramshaw J.W., Evans L.V. The effect of α -naphthalene acetic acid (NAA) and benzylaminopurine (BAP) on the accumulation of volatile oil components in cell cultures of tarragon (*Artemisia dracunculus*) // Journal of Experimental Botany. – 1991. – Vol. 42, № 3. – P. 377–386.

11. Mackay W.A., Kitto S.L. Factors affecting in vitro shoot proliferation of French tarragon // HortScience. – 1988. – Vol.113, № 2. – P. 282–287.

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