

ПОЛУЧЕНИЕ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ IN VITRO И ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ АКТИВНОГО РОСТА *КАЛЛИЗИИ ДУШИСТОЙ*

А.А. Булатова, М.П. Шапчиц, В. М. Юрин

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

Введение

Значительную часть лекарственных средств в настоящее время производят из природного растительного сырья. Поскольку запасы такого сырья в природе истощаются, наиболее перспективным являются биотехнологические методы получения фитомассы [1]. Клетки растений можно выращивать в искусственных условиях на питательных средах неограниченно долго, при этом часть биомассы можно использовать для получения целевого продукта, а часть пересаживать на свежую питательную среду для возобновления культуры. Независимость от влияния различных факторов окружающей среды (климат, сезон, погода, почвенные условия, вредители), более высокий выход и экологически безопасное качество продукта делают привлекательной технологию культуры клеток и тканей для производителей. В условиях, когда постоянно падает доля лекарственных субстанций отечественного производства, представляется важным развивать технологии, создающие надежную сырьевую базу для выработки отечественных препаратов [2].

В настоящее время большой интерес для исследования представляет *Каллизия душистая* или *Золотой ус* (*Callisia fragrans*) — растение из семейства Коммелиновых. *Каллизия* — это крупное растение с двумя типами побегов. Одни прямостоячие от 70-80 сантиметров до 2 метров высоты, с нормально развитыми листьями, другие - горизонтальные коленчатые побеги — усы, заканчивающиеся молодыми розетками. Лекарственные свойства растений из семейства коммелиновых заинтересовали ученых еще в середине XX века. В ходе исследований, которые были начаты в США и в Канаде, специалисты обнаружили, что в соке *каллизии* содержится большое количество биологически активных веществ, тормозящих развитие раковых клеток [3]. Лечебные свойства *каллизии* объясняются наличием в химическом составе этого растения биологически активных веществ из группы флавоноидов (кверцетин и кемпферол) и растительных стероидов. Содержание в *каллизии* высокоактивного вещества бета-ситостерола помогает активно бороться с такими заболеваниями как атеросклероз, болезнями эндокринной системы, воспалением предстательной железы. Из-за наличия биоактивных веществ *каллизия* способна противостоять разного рода инфекциям, стимулировать процессы обмена веществ, укреплять кровеносную систему и иммунитет, способствовать выведению шлаков из организма, оказывать болеутоляющее, ранозаживляющее и противоопухолевое действие. Наружное применение дает эффект при заживлении трофических язв, глубоких ожогов, обморожениях, хорошо лечит кожные заболевания. Также *каллизия* богата витаминами и минералами, которые в сочетании с биологически активными веществами увеличивают эффективность препаратов [4].

Целью данной работы явилось определение оптимальных условий получения и роста каллусной культуры *каллизии душистой*.

Методы исследования

Материалом для исследования служили вегетативные органы растения *каллизии душистой*. В качестве инициальных эксплантов использовали горизонтальные побеги — усы. Для соблюдения условий асептики работу по введению эксплантов в изолированную культуру выполняли в ламинарном-боксе. Поверхностную стерилизацию проводили раствором перманганата калия (2%) на 15 минут и этанола (70%) на 20 минут. В качестве

основного стерилизующего агента использовали дезинфицирующее средство «Доместос», включающее в свой состав гипохлорит натрия. В растворе «Доместос» в трех вариантах разведения (1:1, 1:2, 1:3) экспланты выдерживали 20 минут. По окончании стерилизации стеблевые экспланты промывали стерильной водой – 3 раза по 10 минут, разрезали на отрезки длиной около 2 мм и переносили на агаризованную питательную среду с минеральной основой среды Мурасиге и Скуга с добавлением 0,1 мг/л кинетина, 1 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты и 30 г/л сахарозы. Экспланты культивировали в термостате в темноте при 24⁰С и при относительной влажности воздуха 60-70 %.

Для оценки ростовых процессов каллусных культур каллизии душистой определяли индекс роста, удельную скорость роста и время удвоения биомассы.

Результаты и обсуждение

В результате проведенной стерилизации, было выявлено, что при обработке «Доместосом» в разведении дистиллированной водой в объемном отношении 1:1, количество жизнеспособных эксплантов было наименьшим и составило всего 55%, при разведении 1:3 – показатель был выше и составил 85%, однако в этом варианте микробное заражение сохранялось в 15% случаев. Количество жизнеспособных стеблевых эксплантов при разведении «Доместос» 1:2 составило 90%, микробных заражений не наблюдалось.

Таким образом, режим стерилизации стеблевых эксплантов каллизии душистой с использованием 2% перманганата калия (15 минут), 70% этанола (20 минут) и раствора «Доместос» в разведении 1:2 (20 минут) можно считать оптимальным и рекомендовать для введения в культуру. Использование установленного режима стерилизации позволило получить жизнеспособные экспланты в 90% случаев на которых происходило каллусообразование.

В дальнейшем культивирование каллусов *Callisia fragrans* проводили на четырех вариантах питательных сред, которые различались по содержанию регуляторов роста – ауксинов и цитокининов в течение 28 суток (конец культивирования). Минеральная основа питательной среды соответствовала прописи Мурасиге и Скуга (МС) (таб.1). Содержание сахарозы во всех вариантах составляло 30 мг/л. рН сред всех вариантов доводили перед автоклавированием до 5,6 – 5,8

Таблица 1 – Варианты питательных сред, использованных для культивирования каллусов *Callisia fragrans*

Варианты сред гормоны	I (мг/л)	II (мг/л)	III (мг/л)	IV (мг/л)
2,4 – Д	1	1	0,5	0,5
кинетин	0,1	0,2	0,1	0,25

В процессе культивирования каллусов *Callisia fragrans* на четырех вариантах питательных сред были обнаружены значительные различия в интенсивности ростовых процессов (рис.1). Установлено, что наиболее оптимальным среди протестированных питательных сред является вариант I, для которого были обнаружены самые высокие значения удельной скорости роста (рис. 2) и соответственно самые низкие величины времени удвоения биомассы каллусов (рис. 3). Наиболее низкие значения индекса роста и удельной скорости роста характерны для каллусной культуры *Callisia fragrans*, культивируемой на варианте IV питательной среды.

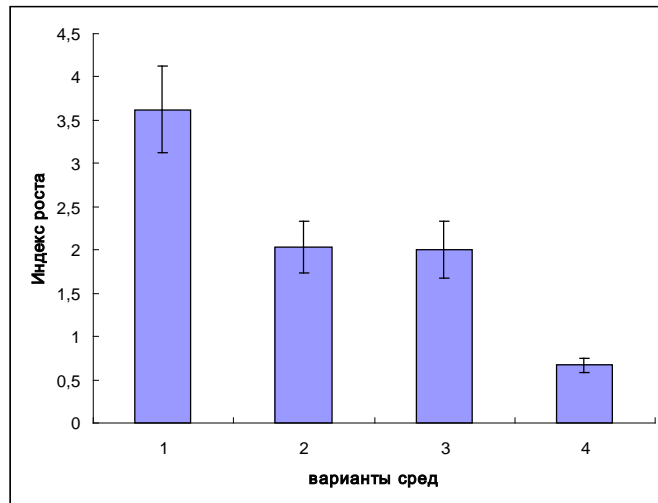


Рисунок 1 – Индекс роста каллусной культуры Каллизии душистой на разных вариантах сред на 28 сутки культивирования

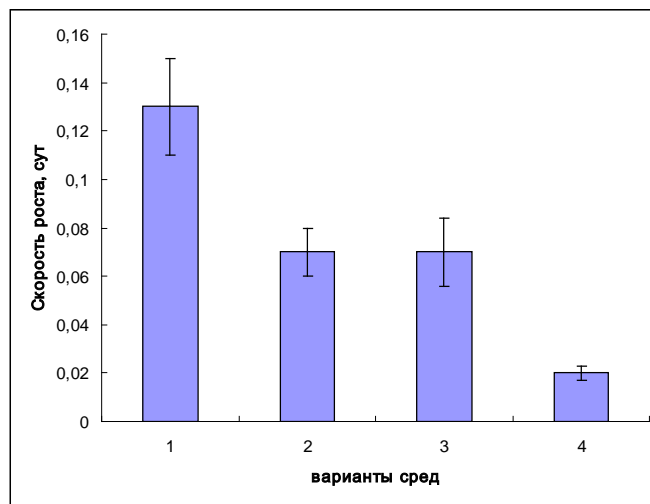


Рисунок 2 – Удельная скорость роста каллусной культуры Каллизии душистой на разных вариантах сред на 28 сутки культивирования

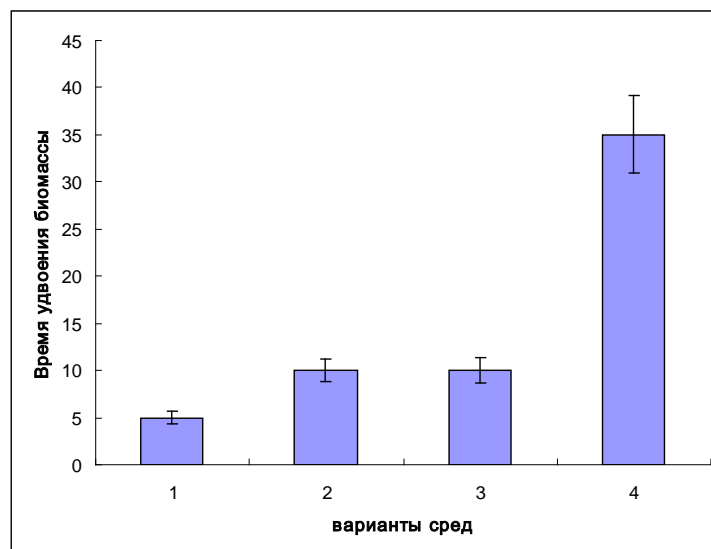


Рисунок 3 – Время удвоения биомассы каллусной культуры Каллизии душистой на разных вариантах сред на 28 сутки культивирования

Выводы

Определяющими факторами питательной среды, эффективно регулируемыми активностью ростовых процессов растительных клеток культивируемых *in vitro*, являются фитогормоны. Специфичность реакции разных клеточных линий растений по отношению к регуляторам роста разного химического строения, по-видимому, определяется различной способностью поглощать и метаболизировать эти соединения.

Ауксины и цитокинины – важнейшие фитогормоны, участвующие в регуляции деления и дифференциации растительных клеток. Было доказано, что они играют важную роль в индукции каллусогенеза у растений. [5]

Изменение соотношения ауксин/цитокенин в питательной среде приводит к существенным изменениям в развитии клеток *in vitro*.

Анализ полученных результатов позволяет заключить, что оптимальным для роста каллусной культуры является первый вариант среды, в котором соотношение гормонов 2.4-Д и кинетин равно 10 и концентрации - 1 и 0,1 мг/л соответственно. Уменьшение как соотношения данных фитогормонов, так и их концентраций в среде приводило к снижению ростовых показателей. Таким образом, вариант I среды может быть рекомендован для инициации каллусогенеза в стеблевых эксплантах каллизии душистой и дальнейшего наращивания каллусной биомассы.

Список литературы

1. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи/В.А. Кунах - Киев. Логос, 2005. С.730
2. Бутенко Р.Г. Культура клеток растений и биотехнология/Р.Г. Бутенко// Москва, Наука, 1986.
3. Полевая М.А. Золотой ус или Домашний женьшень.-Москва. Весь 2008. С.128
4. Огарков В.Н. "Все о золотом усе "- Москва.: АСС-Центр 2004. С. 112
5. Charrie.re F, Sotta B, Miginiac E . , Nahne G Induction of adventitious or somatic embryos on *in vitro* cultured zygotic embryos of *Helianthus annuus*: variation of endogenous hormone levels/ J. of plant physiology biochemistry. -1999-Vol.37, P.751–757.