

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ХВОЙНЫХ В УСЛОВИЯХ IN VITRO

Ж.А. Плынская, Е.Н. Аёшина, Н.А. Величко

ГОУ ВПО «Сибирский государственный технологический университет»
660049 Красноярск, пр. Мира, 82; e-mail: Jannet-plynskay@yandex.ru

Традиционные способы переработки лекарственного сырья не обеспечивают высокие потребительские свойства производимой продукции. В целях совершенствования использования ресурсов лекарственных растений края необходимо применять меры к внедрению современных технологий переработки сырья, ориентированных на выпуск экологически чистой продукции с высокими потребительскими качествами. Одной из таких технологий является культура клеток и тканей растений in vitro, которая, кроме того, рассматривается как нетрадиционный метод охраны лекарственных растений. Целью данной работы явилось введение в культуру in vitro эфедры односемянной (*Ephedra monosperma* C.A. Meyer) и можжевельника сибирского (*Juniperus sibirica*), исследование химического состава интактного растения и каллусной ткани этих хвойных.

Ключевые слова: культивирование, культура клеток, каллус, регуляторы роста, биологически активные вещества

Traditional ways of processing of medicinal raw material do not provide high consumer properties of made production. With a view of perfection of use of resources of herbs of territory, it is necessary to apply measures to introduction of modern technologies of processing of the raw material, focused on release of non-polluting production with high consumer qualities. One of such technologies is the culture of cells and fabrics of plants in vitro, which besides it is considered as a no conventional method of protection of herbs. The purpose of the given work was introduction in culture in vitro *Ephedra monosperma* C.A. Meyer and a *Juniperus sibirica*, research of chemical compound intact plants these coniferous.

Key words: cultivating, culture of cells, callus, regulators of growth, biologically active substances

ВВЕДЕНИЕ

С использованием метода культивирования тканей и органов растений в настоящее время создан ряд клеточных технологий, позволяющих получать ценные вторичные продукты метаболизма растений, такие, как гликозиды, алкалоиды, некоторые другие биологически активные вещества, имеющие широкое применение в качестве лекарственных препаратов, пищевых красителей, ароматизаторов и др. (Грандберг, 1987; Гринкевич, 1991).

Преимуществом создаваемых клеточных культур по сравнению с традиционным растительным сырьем (дикорастущие или выращиваемые на плантациях растения) является:

- получение продукта независимо от внешних климатических, почвенных условий и возможность культивирования клеток растений;
- оптимизация и стандартизация условий выращивания.

Культивируемые клетки и ткани могут служить адекватной моделью при изучении метаболизма и его регуляции в клетках и тканях, а также онтогенеза, генетики, растительной вирусологии и др. Простота клеточных моделей, возможность быстро получать достаточную биологическую массу в асептических, контролируемых по многим параметрам условиях выращивания является преимуществами такого моделирования (Рубцов, 1971; Машковский, 1978; Гаммерман, 1990).

Применение методов культуры изолированных

органов и тканей in vitro открывает большие перспективы для массового воспроизводства и сохранения ценного генофонда древесных и травянистых растительных форм с помощью клонального микро-размножения. За последние десять лет различными биотехнологическими лабораториями вводятся в культуру многие виды растений. Кроме того, создаются коллекции для их дальнейшего тиражирования, поскольку при клональном микро-размножении появляется возможность круглогодичного воспроизводства растений в требуемых количествах для целей интродукции, оздоровления и ювенилизации растительного материала. Таким образом, проблема сохранения генофонда может быть решена с помощью биотехнологических подходов (Муравьева, 1983; Минаева, 1991; Полевой, 1978).

Настоящая работа посвящена изучению возможности введения в асептическую культуру *Ephedra monosperma* C.A. Meyer и *Juniperus sibirica*.

Ephedra monosperma C.A. Meyer (эфедра односемянная) относится к семейству хвойниковых (*Ephedraceae*). Представляет собой кустарник высотой до 30 см. Цветет во второй половине мая – первой половине июня, семена созревают в конце августа. Место произрастания – сухие каменистые склоны, каменистые степи (Муравьева, 1983).

Juniperus sibirica (можжевельник сибирский) представлен семейством кипарисовых (*Cupressaceae* F.W.Nege). Двудомный, густоветвистый, низкорослый, стелющийся кустарник. Побеги легко укореняются, они невыраженно трехгранные с укороченными междоузлиями, кора буроватая, хвоя игольчатая, серповидная, прижатая к ветвям,

узколанцетная, колючая. Шишкоягоды 2-3 семянные, шаровидные, до 12 мм в поперечнике, темно синего или черного цвета, семена светло-бурые, трехгранные, на спинке сетчато-морщинистые, длиной 4-5 мм (Минаева, 1991).

МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ КУЛЬТУРЫ

При работе с культурами клеток необходимо вести контроль роста и жизнеспособности культуры. При культивировании каллусной ткани для одного измерения обычно используют от 3 до 10 повторностей (пробирок с растущим эксплантом).

В работе при проведении оценки роста культуры использовали независимую выборку по 10 пробирок для обобщения средних экспериментальных значений каждой точки на вариантах среды. Для оценки роста каллусной культуры применяли весовой метод, взвешивая на аналитических весах извлеченный из пробирки пинцетом каллус. Измерения производились каждые 4 дня (Бутенко, 1971; Катаева, 1980).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Введение в культуру *in vitro* *Ephedra monosperma* C.A. Meyer и *Juniperus sibirica*. Обязательным условием для микроклонального размножения является использование объектов, полностью сохраняющих генетическую стабильность. Этому условию удовлетворяют молодые побеги (8 – 12 мм) и пазушные почки стеблевого происхождения (5-7 мм).

На начальном этапе важно было подобрать оптимальные условия для стерилизации эксплантов *Ephedra monosperma* C.A. Meyer и *Juniperus sibirica*. В результате эксперимента было установлено, что наиболее приемлемым стерилизующим агентом для *Juniperus sibirica* оказался 0,1 % раствор диацета с добавлением твина-80 (1-2 капли на 1 л воды). А для стерилизации *Ephedra monosperma* C.A. Meyer была более оптимальна двухступенчатая стерилизация. На первой ступени в роли стерилизующего агента использовали 0,1 % раствор KMnO_4 , а на второй ступени 0,1 % раствор диацета с добавлением

твина-80 (1-2 капли на 1 л воды). Стерилизация при этих условиях составила 97 %. Стерильные побеги вводили на агаризованные питательные среды с минеральным составом по Murashige and Skoog (1962), Schenk and Hildebrandt (1972), Uata (1939), Knop (1865) и Sierlis (1964) без добавления регуляторов роста. Полученные результаты эксперимента показали, что наиболее благоприятной средой для культивирования эксплантов оказалась питательная среда, содержащая соли по Murashige and Skoog (MS) с добавлением 30 г/л сахарозы и витаминов: пиридоксина, тиамина хлорида и ниацина в количестве по 1 мг/л (Бутенко, 1971; Катаева, 1980; Гутман, 1980).

Известно, что наиболее важными компонентами питательной среды, определяющими каллусогенез, являются регуляторы роста. Для культивирования *Ephedra monosperma* C.A. Meyer и *Juniperus sibirica* в условиях *in vitro* были использованы регуляторы роста.

Каллусогенез инициировали из молодых побегов *Ephedra monosperma* C.A. Meyer и *Juniperus sibirica* на средах с различными концентрациями 2,4-Д (2,4-Дихлорфенокси-уксусная кислота), α -НУК (α -Нафтилуксусная кислота), 6-БАП (6-Бензиламинопурина) и КИН (6-Фуфуриламинопурина (кинетин)). Присутствие в питательной среде экзогенного регулятора 2,4-Д оказало наибольшее влияние на процесс инициации каллусогенеза можжевельника сибирского и эфедры односемянной. Образование каллусной ткани эфедры односемянной происходило на средах с присутствием α -НУК и 6-БАП, чего не наблюдалось на эксплантах можжевельника сибирского. Полученные результаты свидетельствуют о том, что культуру можжевельника можно отнести к ауксинозависимой, а культуру эфедры односемянной как к ауксинозависимой, так и цитокининзависимой.

Представляло интерес сравнения химического состава интактного растения и каллусной ткани *Ephedra monosperma* C.A. Meyer и *Juniperus sibirica*, полученной при культивировании на питательной среде Murashige and Skoog.

Сравнение химического состава интактного растения и каллусной ткани *Ephedra monosperma* C.A. Meyer и *Juniperus sibirica* приведено в таблице 1.

Таблица 1 - Групповой химический состав интактного растения и каллусной ткани *Ephedra monosperma* C.A. Meyer и *Juniperus sibirica*

Наименование компонента	Содержание компонента, % к а.с.м.			
	<i>Ephedra monosperma</i> C.A. Meyer		<i>Juniperus sibirica</i>	
	Интактное растение (одревесневший стебель)	Каллусная ткань	Интактное растение (хвоя)	Каллусная ткань
Легкогидролизуемые полисахариды	26,50±0,05	28,18±0,07	13,90±0,08	12,46±0,10
Трудногидролизуемые полисахариды	15,76±0,02	14,03±0,04	24,27±0,01	23,82±0,14
Лигноподобные вещества	35,80±0,02	20,11±0,02	19,13±0,08	22,41±0,34
Экстрактивные вещества	16,15±0,05	28,45±0,04	37,46±0,07	36,52±0,35
Зольные компоненты	7,40±0,04	9,95±0,03	4,77±0,06	4,50±0,12

Из результатов таблицы 1 следует, что наибольшую часть в каллусной ткани *Ephedra*

monosperma C.A. Meyer в отличие от интактного растения составляют экстрактивные вещества 28,45

%, зольные компоненты 9,95 %, легкогидролизуемые полисахариды 28,18 %. А каллусная ткань *Juniperus sibirica* наиболее богата лигноподобными веществами 22,41 %, в отличие от интактного растения. По другим компонентам группового состава хвоя и каллусная ткань *Juniperus sibirica* незначи-

тельно отличается.

Наибольшую ценность в каллусной ткани и интактном растении представляют биологически активные вещества. Содержание некоторых биологически активных веществ *Ephedra monosperma* С.А. Meyer и *Juniperus sibirica* приведено в таблице 2.

Таблица 2 – Содержание биологически активных веществ в интактном растении и каллусной ткани *Ephedra monosperma* С.А. Meyer и *Juniperus sibirica*

Наименование компонента	Содержание компонента, % к абсолютно сухой массе			
	<i>Ephedra monosperma</i> С.А. Meyer		<i>Juniperus sibirica</i>	
	Интактное растение (одревесневший стебель)	Каллусная ткань	Интактное растение (хвоя)	Каллусная ткань
Сапонины	4,205±0,04	2,410±0,05	0,310±0,09	0,190±0,08
Флавоноиды	0,021±0,04	0,050±0,04	0,028±0,02	0,135±0,02
Алкалоиды	0,041 ±0,08	1,128±0,03	0,290±0,01	0,710±0,06
Витамин Р	0,910±0,06	1,614±0,01	4,680±0,06	5,520±0,05
Витамин С	0,001±0,02	0,002±0,09	21,780±0,08	11,520±0,04
Дубильные вещества	1,871±0,08	1,993±0,05	5,400±0,06	6,780±0,08

Из таблицы 2 следует, в одревесневших стеблях *Ephedra monosperma* С.А. Meyer алкалоиды найдены в небольших количествах, и поэтому использовать их для приготовления лекарственных средств на основе алкалоидов неэффективно. Однако они характеризуются высоким содержанием сапонинов 4,205 %, вследствие чего могут найти применение в парфюмерной и текстильной промышленности. В каллусной ткани *Ephedra monosperma* С.А. Meyer содержание алкалоидов 1,128 %, это во много раз больше, чем в интактном растении. Также каллусная ткань богата витамином Р и дубильными веществами и флавоноидами.

Каллусная ткань *Juniperus sibirica* по отношению к интактному растению содержит значительное количество флавоноидов 0,135%, алкалоидов 0,710 %, витамин Р 5,520 % и дубильных веществ 6,780 %.

ВЫВОДЫ

Исследования показали, что обе культуры *Ephedra monosperma* С.А. Meyer и *Juniperus sibirica* успешно введены в культуру *in vitro*. Результаты по введению в культуру *in vitro* свидетельствуют о том, что культуру можжевельника можно отнести к ауксинозависимой, а культуру эфедры односемянной как к ауксинозависимой, так и цитокининзависимой.

Проведенные исследования по содержанию биологически активных веществ показали, что каллусная ткань *Ephedra monosperma* С.А. Meyer и

Juniperus sibirica являются перспективным объектом для биотехнологии и могут быть рекомендованы в качестве потенциального сырья для получения биологически активных веществ.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Бутенко, Р.Г. Культура тканей и клеток растений [Текст] / Р. Г. Бутенко, - М.: Знание, 1971. - 46 с.
- Грандберг, И.И. Органическая химия [Текст] / И.И. Грандберг. - М.: Высш. шк., 1987. - 480 с.
- Гринкевич, Н.И. Лекарственные растения [Текст] / Н.И. Гринкевич. - М.: Высш. шк., 1991. - 420 с.
- Гутман, Г.С. Новый способ получения культуры тканей высших растений / Г.С. Гутман, Г.А. Ширяева // Растительные ресурсы. - 1980. - 16 № 4. - С.601-606.
- Катаева, Н.В. Клональное размножение растений в культуре ткани / Н.В. Катаева, В.А. Аветисов // Культура клеток растений и биотехнология. - М.: Наука, 1980. - С.116-121.
- Лекарственные растения: справ. пособие. 4-е изд. [Текст] / А.Ф. Гаммерман, [и др.]. - М.: Высш. шк., 1990. - 543 с.
- Машковский, М.Д. Лекарственные средства [Текст] / М.Д. Машковский. - М.: Медицина, 1978. - Ч.1. - 265 с.
- Минаева, В.Г. Лекарственные растения Сибири. 5-е изд., перераб. и доп. [Текст] / В. Г. Минаева. - Новосибирск: Наука. Сиб. отделение, 1991. - 431 с.
- Муравьева, Д.А. Тропические и субтропические лекарственные растения [Текст] / Д.А. Муравьева. - М.: Медицина, 1983. - 336 с.
- Полевой, В.В. Физиология растений: учеб. для вузов [Текст] / В.В. Полевой. - Л., 1978. - 382 с.
- Рубцов, М.В. Синтетические фармацевтические препараты [Текст] / М.В. Рубцов, А.Г. Байчиков. - М.: Медицина, 1971. - 320 с.

Поступила в редакцию 8 февраля 2008 г.
Принята к печати 16 мая 2008 г.