

Биология

УДК 581.143

Н. Ж. СААКЯН, Дж. А. АГАДЖАНЫН, М. Т. ПЕТРОСЯН, Ю. Г. ПОПОВ

ПОЛУЧЕНИЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ КУЛЬТУР *AJUGA GENEVENSIS L.*
И *AJUGA CHIA SCHREB.* И ИХ ХАРАКТЕРИСТИКА

Получены изолированные культуры распространенных в армянской флоре лекарственных растений *Ajuga genevensis L.* и *Ajuga chia Schreb.* Приводятся ростовые показатели и цитоморфологическая характеристика культур.

Введение. Растения являются природными источниками многих ценных продуктов вторичного метаболизма. В условиях *in vitro* растительные клетки сохраняют способность интактного растения к их синтезу, а также могут образовывать вещества, не обнаруживаемые в исходном растении. Культивирование изолированных клеток и тканей растений на искусственных питательных средах имеет особое значение в связи с возможностью их использования в биотехнологии [1]. Кроме того, меняя условия культивирования, можно контролировать синтез вторичных метаболитов. Интерес к культуре *in vitro* обусловлен и тем, что пассируемые клетки являются удобными моделями для изучения ростовых и метаболических процессов, происходящих в растениях.

Представители рода *Ajuga* (живучка) известны высокой продуктивностью ценных вторичных метаболитов, благодаря чему широко используются в народной медицине; по литературным данным некоторые виды этого рода обладают и антибактериальной активностью [2–5]. В Армении описаны несколько видов этого рода, распространенных в различных районах, среди них живучка женеvская (*Ajuga genevensis*) и живучка хиосская (*A. chia*) [5–7]. С медицинской точки зрения эти виды имеют большое значение: *A. genevensis* содержит иридоиды, флавоноиды, гликозиды, терпеноиды, дубильные вещества, стероиды, обладает противовоспалительным, гемостатическим, ранозаживляющим свойствами, а *A. chia* содержит алкалоиды, витамин С, дубильные вещества, эфирное масло, обладает гемостатическим действием [6].

Настоящая работа посвящена изучению ростовых показателей *A. genevensis* и *A. chia* при их введении в изолированную культуру с целью последующего исследования возможностей получения вторичных метаболитов.

Методы исследования. Для исследования собраны растения видов *A. genevensis* и *A. chia* в фазе цветения в районе горы Арагац. В качестве

экспланта использовались листья. Каллусные культуры обоих видов получены по общепринятой методике на традиционной питательной среде Мура-сиге–Скуга (МС) [8], а суспензионные культуры – на качалке при 120 об/мин в жидкой питательной среде МС. В дальнейшем стабильный рост каллусной ткани поддерживался на модифицированной среде, условно обозначенной нами №7, отличающейся от МС по составу фитогормонов. В ней отсутствуют индоллил-3-уксусная кислота и глицин, добавлено 0,2 мг/л гибберелловой кислоты, 0,5 мг/л α -нафтилуксусной кислоты (НУК), 1 мг/л 6-бензиламинопурина, а количество кинетина доведено до 1 мг/л. Для характеристики ростовой активности определялись: сырая масса ткани в г, сухой вес в % и ростовой индекс (РИ) [9]. Средний прирост биомассы определялся путем взвешивания сырой массы ткани из 3–4 колб. Для индукции органогебеза каллусы живучки женеvской переносились на среду, в которой содержание НУК составляло 0,1 мг/л, а сахарозы – 2%. Для цитоморфологических исследований материал фиксировался по методу Карнуа в смеси спирта с уксусной кислотой (3:1), готовились давлённые препараты [10]. Для проведения анатомических исследований тонкие срезы каллусной ткани окрашивались водным раствором сафранина. Излишки красителя удалялись выдерживанием ткани в глицерине в течение 1–3 суток, затем готовились постоянные препараты. Размеры клеток определялись с помощью объект-микрометра и окуляр-микрометра.

Результаты и обсуждения. У обоих исследуемых видов первые признаки каллусообразования на эксплантах наблюдались на 18–20-е сутки культивирования на питательной среде МС. Образовавшиеся каллусы морфологически отличались друг от друга.

Если каллусная ткань *A. genevensis* имела довольно плотную, однородную консистенцию, то каллусная ткань *A. chia* была более рыхлой и оводненной, при встряхивании легко распадалась на отдельные агрегаты.

Окраска каллусных тканей обеих культур в начале пассажа светлая. К концу пассажа ткань *A. genevensis* приобретала желтовато-коричневый, а ткань *A. chia* – коричневый цвет. Причем пигмент *A. genevensis* не диффундировал в питательную среду, тогда как среда, на которой росла *A. chia*, в конце пассажа почти полностью окрашивалась в коричневый цвет. В условиях освещения на среде МС ткань *A. genevensis* интенсивно зеленела, сохраняя, однако, однородность.

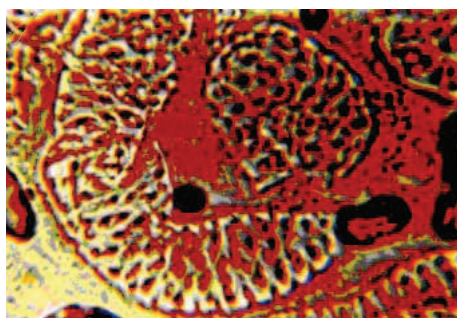


Рис. 1. Гидроциты в каллусной культуре *A. genevensis*.

Проведенные анатомические и цитоморфологические исследования показали наличие как меристематических, так и паренхимных клеток. В глубине каллуса встречались отдельные трахеидоподобные лигнифицированные клетки – гидроциты (рис. 1), что свидетельствует о дифференцированности ткани [11]. Клетки *A. genevensis* округлой формы, мелкие (длина 1,4–3,8 мкм, ширина 1,0–2,2 мкм), плотно

росла *A. chia*, в конце пассажа почти полностью окрашивалась в коричневый цвет. В условиях освещения на среде МС ткань *A. genevensis* интенсивно зеленела, сохраняя, однако, однородность.

Проведенные анатомические и цитоморфологические исследования показали наличие как меристематических, так и паренхимных клеток. В глубине каллуса встречались отдельные

упакованы. У *A. chia* они более крупные (длина 10,6–12,5 мкм, ширина 8,2–9,7 мкм), хорошо различимо межклеточное пространство. Диаметр ядер у обеих культур колеблется от 0,4 до 0,6 мкм. Встречаемые в каллусах *A. genevensis* гидроциты крупные и в зависимости от состава питательной среды имеют различные формы: овальную, круглую, сетчато-полосатую, точечно-пористую, спиралевидную – на среде МС и только сетчатую – на среде №7. У *A. chia* гидроциты мельче, почти одинаковые по форме и встречаются реже.

Эти культуры различались не только по морфологическим, но и по физиологическим показателям. Культура *A. genevensis* отличалась более интенсивным ростом и более длинным циклом культивирования, чем *A. chia*. Изучение динамики роста изолированной культуры *A. genevensis* показало, что увеличение сырого веса ткани шло по нарастающей кривой. Lag-фаза длилась 4–5 дней, и в конце пассажа, на 40-й день, РИ достигал 20. Изменение содержания сухих веществ происходило неравномерно: наибольшее количество их наблюдалось на 10-й день культивирования, что, вероятно, связано с началом интенсивного деления клеток; второй всплеск митотической активности отмечался на 30-е сутки, после чего сухой вес снижался, несмотря на то, что сырой вес продолжал расти (рис. 2). Это связано, вероятно, с растяжением и вакуолизацией клеток.

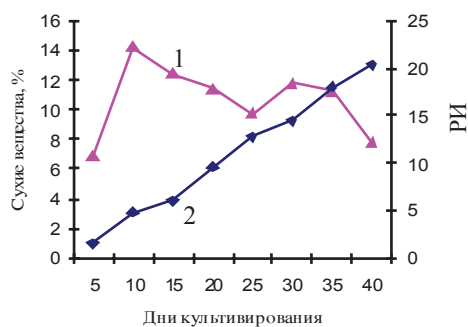


Рис. 2. Динамика роста каллусной ткани *A. genevensis* на среде МС (исх. вес 0,3–0,35 г). На рисунках 2–4: 1 – сухие вещества (%); 2 – РИ.

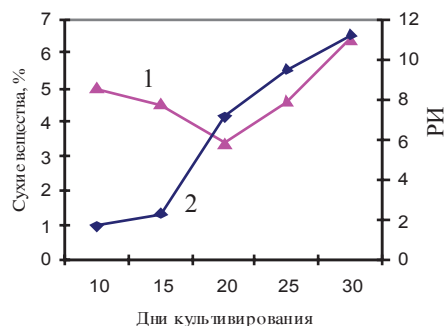


Рис. 3. Динамика роста каллусной ткани *A. chia* на среде МС (исх. вес 0,25 г).

Следует отметить, что такая картина изменения сухого веса – наличие более чем одного пика в течение пассажа – свойственна многим культурам [12–14].

При изучении динамики роста изолированной культуры *A. chia* на твердой питательной среде получалась следующая своеобразная картина: увеличение сырого веса происходило так же, как и у предыдущей культуры, но рост заканчивался на 25–30-е сутки культивирования. РИ при этом составлял 11,2. Наибольшее же количество сухих веществ отмечалось к концу пассажа (рис. 3).

Получена также суспензионная культура *A. genevensis*. Она состояла не из одиночных клеток, а из клеточных конгломератов. Рост культуры шел очень интенсивно и заканчивался к 20–25-му дню культивирования, т. е. в

жидкой питательной среде увеличение биомассы происходило почти вдвое быстрее, чем на агаризованной (рис. 4).

Отличительной чертой каллусной культуры *A. genevensis* является ее

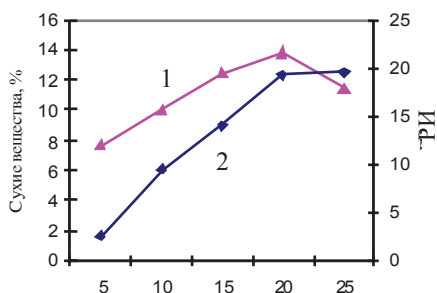


Рис. 4. Динамика роста каллусной ткани *A. genevensis* в суспензионной культуре (исх. вес 0,25 г).

высокая предрасположенность к регенерации. На регенерационной среде как в темноте, так и на свету, в каллусной ткани *A. genevensis* образовывались побеги, из которых в дальнейшем можно было получить целые растения. Цикл роста полученных мериклонов заканчивался к 60-му дню культивирования.

Таким образом, нами получены изолированные культуры *A. genevensis* и *A. chia*, обладающие довольно высокими ростовыми показателями, которые в бу-

дущем можно использовать в качестве продуцентов биологически активных веществ.

Кафедра микробиологии, биотехнологии
микроорганизмов и растений

Поступила 22.12.2006

ЛИТЕРАТУРА

1. Сельскохозяйственная биотехнология. Под ред. акад. РАСХН В.С. Шевелухи. М.: Высшая школа, 1998.
2. Ben Jannet H., Chaari A., Bakhrouf A., Mighri Z – J. NatProd. Res., 2006, v. 20, № 3, p. 299–304.
3. Hao Chen., Ren Xiang Tan., Zhi Li Liu., Yong Zhang, L. – Nat. Prod., 1996, v. 59, № 7, p. 668–670.
4. Cantrell CL., Rajab MS., Franzblau SG. et al. – Pl. Med., 1999, v. 65, p. 732–734.
5. Соколов П.Ф. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование. Л.: Наука, 1974.
6. Золотницкая С.Я. – Лекарственные ресурсы флоры Армении. Т. II. Ер., 1965.
7. Флора Армении. Под редакцией А. А. Тахтаджяна. Т. 8. Ер., 1987.
8. Murashige T., Skoog F.A. – Physiol. Plantarum, 1962, v. 15, № 18, p. 473–479.
9. Бугенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М.: Наука, 1964.
10. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. М.: Колос, 1970.
11. Александров В.Г. Анатомия растений. М.: Высшая школа, 1966.
12. Березнеговская Л. Н. и др. Культура тканей и клеток алкалоидных растений. Томск, 1975.
13. Фролова Л.В., Шамина З.Б. Динамика клеточной популяции в культуре ткани *Vicia faba*. Киев: Наукова думка, 1978.
14. Щербакова Е.Н. Рост культивируемых *in vitro* тканей герани и ириса и биосинтез в них эфирных масел. Автореф. дис. на соискание уч. ст. канд. биол. наук. Ер., 1985.

Ն. Ժ. ՍԱՀԱԿՅԱՆ, Զ. Ա. ԱՂԱՋԱՆՅԱՆ, Մ. Թ. ՊԵՏՐՈՍՅԱՆ, Յու. Գ. ՊՈՊՈՎ

AJUGA GENEVENSIS L.-ի ԵՎ *AJUGA CHIA SCHREB.*-ի ՍԵԿՈՒՍԱՅԱԾ
ԿՈՒՆՏՈՒՐԱՆԵՐԻ ԱՏԱՅՈՒՄԸ ԵՎ ԲՆՈՒԹԱԳԻՐԸ

Ա մ փ ո փ ու մ

Ստացվել են Հայաստանի ֆլորայում տարածված *Ajuga genevensis L.* և *Ajuga chia Schreb.* դեղաբույսերի մեկուսացված կուլտուրաները: Որոշվել են աճի ցուցանիշներն ու բջջամորֆոլոգիական հատկանիշները:

N. J. SAHAKYAN, J. A. AGHAJANYAN, M. T. PETROSYAN, Yu. G. POPOV

OBTAINING OF ISOLATED CULTURES OF *AJUGA GENEVENSIS L.*
AND *AJUGA CHIA SCHREB.* AND THEIR CHARACTERISTICS

Summary

The isolated cultures of medicinal plants of Armenian flora *Ajuga genevensis L.* and *Ajuga chia Schreb.* were obtained. The growth indices and cytomorphological characteristics were shown.