

Биология

УДК 581.143

Н. Ж. СААКЯН

МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ИЗОЛИРОВАННЫХ
КУЛЬТУР ЖИВУЧКИ ЖЕНЕВСКОЙ (*AJUGA GENEVENSIS* L.),
ПРОИЗРАСТАЮЩЕЙ В РАЗЛИЧНЫХ ВЫСОТНЫХ ПОЯСЯХ

Получены изолированные культуры *A. genevensis*, собранной с различных высот склонов горы Арагац. Проведено сравнительное изучение тенденции к каллусообразованию и регенерации растений из полученных каллусов.

В последнее время все шире используются культуры изолированных тканей и органов для изучения физиолого-биохимических особенностей образования различных веществ вторичной природы [1–4]. Уже сейчас этот метод применяется для промышленного выращивания тканей наиболее ценных растений с целью получения физиологически активных соединений [2, 3, 5, 6]. Это объясняется несомненным преимуществом выращивания тканей в строго контролируемых условиях, а также независимостью их культивирования от климатических условий, сезонности и других факторов внешнего воздействия [1, 7]. Однако в течение культивирования *in vitro* геном растительных клеток претерпевает значительную перестройку, изменениям подвергаются как ядерные, так и внеядерные генетические структуры. Наблюдаемые *in vitro* изменения имеют двоякую природу. С одной стороны, определенная их часть уже имеется в исходных клетках до их введения в культуру *in vitro* – геномные изменения закономерно возникают в клетках в процессе их дифференцировки, а в ходе онтогенеза могут накапливаться и незапрограммированные, случайные изменения и мутации [8–10]. С другой стороны, установлены определенные закономерности изменчивости в культуре *in vitro* [8]. Согласно литературным данным, выделены три периода адаптации клеточных популяций *in vitro*: первичная популяция изолированных клеток; становление штамма; формирование штамма. В основе разделения на указанные периоды лежит как изменение генотипического состава клеточной популяции, так и изменение типа, направления и давления клеточного отбора, определяющего генетическую структуру клеточных популяций [8, 10].

Учитывая вышесказанное, мы попытались в процессе данной работы провести морфофизиологическое изучение изолированных культур, полученных из растений *A. genevensis*, произрастающих на различных высотах склонов горы Арагац.

Методы исследования. Растения вида *A. genevensis* были собраны в фазе цветения со склонов горы Арагац с высот около 1000 и 3000 м. По общепринятой методике на среде Мурасиге–Скуга (МС) из листовых эксплантов были получены каллусные культуры [11]. Каллусы из растений, собранных с высоты 1000 м, условно нами обозначены как К₁, а с 3000 м – К₂. С целью индукции органогенеза каллусы переносились на среду, в которой содержание α-нафтилуксусной кислоты (НУК) составляло 0,1 мг/л, сахарозы – 2 %. Корнеобразование у побегов происходило на среде МС, из которой исключался цитокинин. Концентрация НУК оставалась той же. Для характеристики ростовой активности определялся индекс роста по формуле: $I = m_0 / (m_{max} - m_0)$, где m_0 и m_{max} – массы каллусов в начале и в конце цикла выращивания соответственно. Стабильный рост каллусов поддерживался добавлением в питательную среду одного из антиоксидантов: глутатиона (5 мг/л), активированного угля (5 г/л), аскорбиновой кислоты (5 г/л). Анатомические исследования проводились на тонких срезах каллусной ткани, которые окрашивались водным раствором сафранина, после чего помещались в глицерин на 1–3 сутки для удаления излишков красителя. Постоянные препараты готовились заключением в глицерин-желатин. Антибактериальная активность определялась методом колодцев [12]. На засеянную тест-микроорганизмом поверхность агара помещали полые цилиндрики с диаметром 0,5 см, в которые закапывали исследуемый экстракт. Об антимикробной активности судили по величине зоны отсутствия роста тест-микроорганизмов вокруг колодца.

Результаты и обсуждение. Первые признаки каллусообразования у эксплантов, полученных из растений, собранных с низких склонов (1000 м) горы, наблюдались на 18–20-е сутки культивирования, а из растений с более высоких склонов (3000 м) – намного позже, примерно на 30-е сутки. Образовавшиеся каллусы морфологически отличались друг от друга. Обе каллусные ткани имели однородную консистенцию, хотя по плотности культура К₁ превосходила К₂. Последняя при пересадке распадалась на отдельные агрегаты. Окраски каллусов К₁ и К₂ довольно сильно отличались: если каллусы К₁ были белого цвета и только к концу пассажа приобретали желтовато-коричневый цвет, то К₂ с самого начала культивирования имели сероватый оттенок, а в конце пассажа становились более темными. В условиях освещения обе ткани интенсивно зеленели.

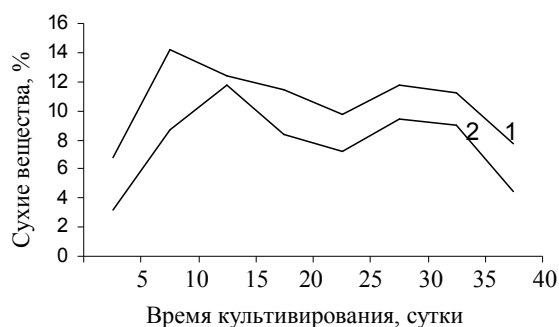


Рис. 1. Динамика изменения сухих веществ (%) каллусов *A. genevensis* в течение культивирования на среде МС (исх. вес 0,3–0,35 г): 1 – К₁; 2 – К₂.

Изученные каллусные культуры отличались не только морфологически, но и по физиологическим показателям: на 30-ый день культивирования индекс роста для К₁ составлял 20, против 8–9 для К₂.

У обеих культур изменение сухого веса происходило сходным образом: в течение одного пассажа на кривых наблюдались два пика увеличения сухого веса (рис. 1). У культу-

ры K_1 возрастание митотической активности наблюдалось на 8-е и 25–30-е сутки субкультивирования, тогда как у K_2 первый пик наблюдался только на 13-е сутки, хотя второй по времени совпадал со вторым пиком K_1 . Возможно, это связано с некоторым запаздыванием каллусообразования у растений *A. genevensis*, собранных с более высоких склонов. Сходную картину изменения сухого веса (наличие более чем одного пика в течение пассажа) описывали многие авторы [13–17]. Переход митотической активности в стационарную фазу роста ряд авторов объясняет гетерогенностью клеточной популяции по фазам митотического цикла в момент пересева на свежую питательную среду и повторным образованием меристематических зон [16].

Следует отметить, что главной отличительной чертой культуры K_1 является ее высокая способность к регенерации. На питательной среде МС на каллусах K_1 образовывались многочисленные побеги как в темноте, так и в условиях освещения (рис. 2). На сегодняшний день довольно слабо изучены механизмы гормональной регуляции дифференцировки–дедифференцировки–редифференцировки и сопровождающие их реорганизации генома [8]. Поэтому не совсем понятна повышенная регенерационная способность каллусной культуры K_1 , в то время как культура K_2 вовсе ею не обладает.



Рис.2 Каллусная культура с побегами K_1



Рис.3 Мериклон культуры K_1

При пересадке полученных регенерантов на питательную среду, содержащую из гормонов только НУК с концентрацией $0,1 \text{ мг/л}$, формировались растения с крупными листьями и развитой корневой системой (рис. 3), которые с апреля по июнь находились в стадии цветения.

Известно, что только немногие культуры в течение длительного культивирования способны к регенерации [7, 18]. По мере возрастания числа пассажей у K_1 постепенно снижался регенерационный потенциал, и уже к 55–60-му пассажу это свойство полностью терялось.

Проводилось сравнительное анатомическое изучение каллусных тканей K_1 и K_2 . На рис. 4 хорошо видны сильно лигнифицированные трахеальные элементы (область, окрашенная темным цветом) каллусов K_1 . Со всех сторон они окружены камбиальной зоной, заметны отдельно сформировавшиеся сосуды. Совсем иная картина наблюдается у каллусов K_2 : немногочисленные

трахеальные клетки встречаются довольно редко и разбросанно, что свидетельствует о слабой дифференциации данной культуры (рис. 5).

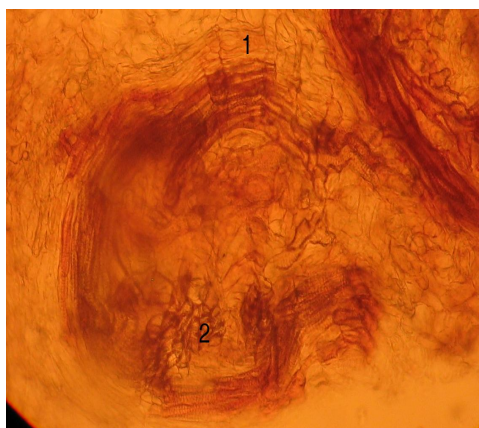


Рис. 4. Дифференцированная каллусная ткань K₁: 1–камбиальный слой; 2–сосуды

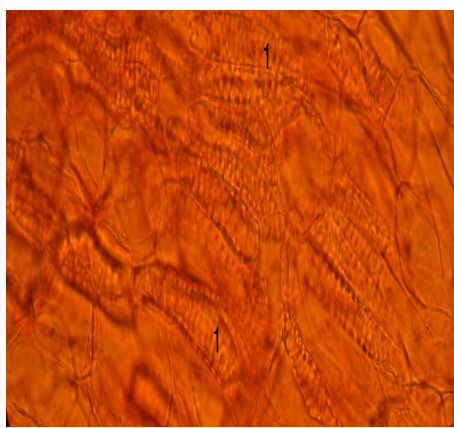


Рис. 5. Каллусная ткань K₂: 1–трахеальные клетки

Морфофизиологические различия каллусных тканей K₁ и K₂ сопровождались биохимическими различиями в составе экстрактов, полученных из них. В то время как экстракты из интактных растений, собранных как с высоты 1000 м, так и 3000 м, не обладали какими-либо противомикробными свойствами, экстракты из полученных каллусных культур проявляли ярко выраженную антибактериальную активность в отношении различных грамположительных (*Bacillus subtilis*, *Bac. mesentericus*, *Staphylococcus aureus*, *Staph. citreus*) и грамотрицательных (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Salm. derby*) микроорганизмов. Причем между активностями экстрактов из каллусных тканей K₁ и K₂ также наблюдались различия. Так, если диаметр зон отсутствия роста на газоне с *Bacillus subtilis* вокруг колодцев с экстрактом из K₁ был около 4 см, то для K₂ он составлял всего около 2,2 см.

Таким образом, нами была установлена тесная взаимосвязь между условиями произрастания живучки женеvской и ее способностью к каллусообразованию, регенерации, а также активностью синтеза веществ вторичной природы.

Кафедра микробиологии, биотехнологии
микроорганизмов и растений

Поступила 12.10.2007

ЛИТЕРАТУРА

1. Соколов П.Ф. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование. Л.: Наука, 1974.
2. Филиппова В. Биосинтез экидистероидов в культурах клеток серпухи венценоvной и живучки ползучей. 2001, <http://www.komisc.ru>.
3. Филиппова В. Особенности вторичного метаболизма в культурах растительных клеток. 2001, <http://www.komisc.ru>.
4. Вингер В.Г. Проблемы и перспективы использования культуры растительных клеток для промышленного получения продуктов вторичного метаболизма. 2005, <http://www.intelligent.ru>.

5. **Filippova V.N., Zorinyants S.E., Volodina S.O., Smolenskaya I.N.** Cell Cultures of Ecdyteroid-Containing *Ajuga reptans* and *Serratula coronata* Plants. 2002, <http://www.komisc.ru>.
6. **Носов А.М.** – Физиология растений, 1999, т. 46, № 6, с. 837–844.
7. Сельскохозяйственная биотехнология. Под ред. акад. РАСХН В.С. Шевелухи. М.: Высшая школа, 1998, 416 с.
8. **Кунах В.А.** – Физиология растений, 1999, т. 46, № 6, с. 919–929.
9. **Кунах В.А.** Тканевые и клеточные культуры в селекции растений. Под ред. Н.А. Турбина и др. М.: Колос, 1979, с. 38–51.
10. **Кунах В.А.** – Биополимеры и клетка, 1997, т. 13, с. 362–371.
11. **Бутенко Р.Г.** Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М.: Наука, 1964.
12. **Золотарев П.И.** – Вестник СамГУ. Естественно-научная серия, 2006, № 9(49), с. 145–154.
13. **Фролова Л.В., Шамина З.Б.** Динамика клеточной популяции в культуре ткани *Vicia faba*. В сб.: Культура клеток растений (Тр. II Всесоюз. конф.). Киев: Наукова думка, 1978, с. 27–32.
14. **Данилина А.Н., Данилов А. В.** Митотическая активность в популяции клеток культуры ткани *Vicia faba*. Там же, с. 37–42.
15. **Ковалева Т.А.** Цитоморфологические изменения культуры ткани раувольфии змеиной (*Rauwolfia serpentina* Benth). В сб.: Культура изолированных органов, тканей и клеток растений (Тр. II Всесоюз. конф.). М.: Наука, 1970, с. 136–140.
16. **Бычкова Т.С., Бутенко Р.Г.** Синхронизация клеточных делений в суспензионной культуре женьшеня настоящего (*Panax ginsens* C.A. Mey) с помощью 5-аминоурацила. В сб.: Культура клеток растений (Тр. II Всесоюз. конф.). Киев: Наукова думка, 1978, с. 16–32.
17. **Щербакова Е.Н.** Рост культивируемых *in vitro* тканей герани и ириса и биосинтез в них эфирных масел: Автореф. дисс. на соискание уч. степени канд. биол. наук. Ер.: Ин-т ботаники АН Арм. ССР, 1985, 24 с.
18. **Кузовкина И.Н., Толочко В.В., Смирнов А.М., Чистякова О.Н.** – Растительные ресурсы, 1974, т. 10, с. 220–223.

Ն. Ժ. ՍԱՀԱԿՅԱՆ

ՏԱՐԲԵՐ ԲԱՐՁՐՈՒԹՅԱՆ ԳՈՏԻՆԵՐՈՒՄ ԱՃՈՂ ԺՆԵՎՅԱՆ ՃԱՆԿ-
ԽՈՏԻ (*AJUGA GENEVENSIS* L.) ՄԵԿՈՒՍԱՑՎԱԾ ԿՈՒՆՏՈՒՐԱՆԵՐԻ
ՄՈՐՖՈՖԻԶԻՉՈՒՆՈՒԹՅԱՆ ԱՌԱՆՁՆԱՀԱՏՎՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

Ամփոփում

Արագած լեռան լանջերի տարբեր բարձրություններից հավաքած *Ajuga genevensis*-ից ստացվել են մեկուսացված կուլտուրաներ: Կատարվել է դրանց մորֆոֆիզիոլոգիական հատկությունների, ինչպես նաև այդ կուլտուրաներից բույսերի ռեգեներացիայի ունակության համեմատական ուսումնասիրություն:

N. G. SAHAKYAN

MORPHOPHYSIOLOGICAL TRAITS OF ISOLATED CULTURES OF
BUGLE-WEED (*AJUGA GENEVENSIS* L.) GROWN IN DIFFERENT
ALTITUDES

Summary

Isolated cultures of *A. genevensis* collected from different altitudes of mountain Aragats were obtained. Comparative research of tendency of calli-formation and regeneration of plants from obtained calli was done.