

УДК 581.17:633.81

ЦИТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ КАЛЛУСНОЙ ТКАНИ ПОЛЫНИ ЭСТРАГОН

© 2011 г. А. Г. Инюткина, Н. А. Егорова

Институт эфиромасличных и лекарственных растений

Национальной академии аграрных наук Украины

(Симферополь, Украина)

Исследована динамика цитофизиологических параметров (масса и плотность каллусной ткани, жизнеспособность клеточной популяции и соотношение разных типов клеток) в цикле выращивания каллусной культуры полыни эстрагон (*Artemisia dracunculus* L.). Установлено, что цикл выращивания должен составлять не менее 50 суток, в течение которых происходит более чем 8-кратное увеличение массы каллуса. Определена продолжительность основных фаз ростового цикла: лаг-фаза – 4 суток, логарифмическая – с 6 по 16-е сутки, линейная – с 18 по 30-е сутки, фаза замедления роста – с 35 по 40-е сутки, стационарная фаза наступала с 45 суток культивирования. При цитологическом анализе выявлено, что каллусная ткань состоит из меристематических и паренхимных (округлых, гигантских, удлинённых) типов клеток. Показаны особенности изменения каждого типа в течение пассажа. В течение цикла выращивания наблюдали три пика повышения плотности каллуса. Максимальную плотность каллусной ткани и количество клеток меристематического типа отмечали на 16-е сутки культивирования, что, по-видимому, связано с повышением митотической активности клеток.

Ключевые слова: *Artemisia dracunculus* L., каллусная культура, цикл выращивания

В последнее время актуальным становится использование различных биотехнологических подходов при решении практических вопросов в растениеводстве (Шевелуха, 1998; Кунах, 2005). С одной стороны, это технологии клонального микроразмножения *in vitro* для массового получения оздоровленного посадочного материала, сохранения редких и исчезающих видов растений при помощи создания депонированных коллекций *in vitro*, с другой – различные клеточные технологии, основанные на манипуляциях с каллусными культурами (Бутенко, 1999). Генетическое разнообразие каллусных клеток позволяет использовать их не только для разработки методов получения новых генотипов для селекционных исследований (получение соматклонов, клеточная селекция, мутагенез *in vitro* и др.), но и для создания технологий получения веществ вторичного метаболизма. Работа с данными методами в большинстве случаев основана на использовании

каллусных культур, которые культивируются в течение длительного времени. Получение длительно пассируемых каллусных тканей представляет собой сложный и многоэтапный процесс, предусматривающий адаптацию клеток не только к изменённым условиям среды, но и формирование новой биологической системы, где клетки начинают выполнять функции организмов, способных к автономному развитию (Кунах, 2005). Поэтому, для разработки большинства клеточных технологий необходимо иметь данные о характере ростовых процессов и цитофизиологических изменениях, происходящих в каллусных тканях.

Для работы использовано перспективное эфиромасличное, лекарственное и пряноароматическое растение – полынь эстрагон (*Artemisia dracunculus* L.). Интерес к различным видам рода *Artemisia* L. объясняется тем, что у многих исследованных видов обнаружены сесквитерпеновые лактоны, представляющие собой фармакологически активные вещества (Гаммерман и др., 1990; Агларова и др., 2008). Для полыни эстрагон было показано, что у растений, собранных в фазе вегетации и в фазе плодоноше-

Адрес для корреспонденции: Инюткина Анна Геннадьевна, Институт эфиромасличных и лекарственных растений НААНУ, ул. Киевская, 150, Симферополь, 95493, АР Крым, Украина;
e-mail: artemisiadr@gmail.com

ЦИТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ

ния, накапливается эфирное масло, большей частью состоящее из сесквитерпеноидов (Ручкиных и др., 2000). Среди основных сесквитерпеноидов выделены: аг-куркумен, спатчуленол, кариофиллен- α -оксид, β -бисаболен, α -бисаболен. Кроме того, эстрагон входит в группу кумариноносных полыней, содержащих более 1,0% кумаринов, в его траве также обнаружено до 3,2% флавоноидов. По последним данным, культура клеток полыни эстрагон может быть использована для получения эфирного масла, а также таких веществ, как делоразепам и темазепам (Cotton et al., 1991; Kavvadias et al., 2000).

В связи с этим разработка биотехнологических приемов культивирования *in vitro* изолированных тканей и органов для данного вида растения является достаточно актуальной. Ранее нами были подобраны условия для индукции и длительного субкультивирования каллусной культуры (Инюткина и др., 2009). Целью настоящей работы было изучение динамики некоторых цитофизиологических параметров (массы каллуса, его плотности, жизнеспособности и соотношения разных типов клеток) в цикле выращивания каллусных тканей полыни эстрагон.

МЕТОДИКА

Материалом для исследований служила полынь эстрагон (*Artemisia dracunculus* L.) образца №5р.24. В качестве эксплантов для получения каллусных тканей использовали высежки из листовых пластинок. При приготовлении питательных сред, введении в культуру асептических эксплантов, культивировании каллусных тканей и анализе ростовых параметров применяли традиционные для работ по культуре тканей методики (Калинин, 1980). Масса транспланта составляла 120 мг. Каллусную ткань выращивали на агаризованной модифицированной среде Мурасиге и Скуга (МС) с добавлением 1,0 мг/л НУК и 0,5 мг/л БАП. Культивирование проводили в культуральной комнате при температуре +26°C, относительной влажности воздуха 70%, освещенности 600 лк с 16-ти часовым фотопериодом в пробирках с 10 мл питательной среды.

В течение цикла выращивания определяли следующие параметры: массу сырого каллуса, плотность каллусной ткани, соотношение разных типов клеток и их жизнеспособность. Измерение цитофизиологических показателей проводили в течение первых 20 дней культиви-

рования каллуса седьмого пассажа через 2 суток, затем через 5 суток. При определении массы сырого каллуса взвешивали не менее 15 трансплантов. Ростовый индекс (Р.И.) рассчитывали как отношение прироста массы каллуса к массе транспланта (Калинин, 1980). Плотность каллуса (количество клеток на 1 мг сырой массы) определяли путем подсчета клеток в камере Фукс-Розенталя в 6-кратной повторности. Для этого каллусные ткани предварительно мацерировали 20% раствором хромовой кислоты при температуре 60°C в течение 37 мин. Жизнеспособность культуры устанавливали по стандартной методике после окрашивания 0,5% метиленовым голубым (анализировали не менее 100 клеток в 10-ти кратной повторности) (Паушева, 1980). Анализ соотношения разных типов клеток проводили на препаратах, окрашенных ацетокармином, при этом подсчитывали не менее 100 клеток в 10-кратной повторности. Цитологические препараты исследовали под микроскопом БИОЛАМ. Полученные данные обработаны статистически с использованием стандартного приложения пакета статистики в Microsoft Excel. На рисунках представлены средние арифметические и доверительные интервалы при уровне значимости 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее в наших исследованиях было установлено, что максимальный прирост массы каллуса полыни эстрагон, полученного из листовых или стеблевых эксплантов, наблюдался на нескольких модификациях среды МС, содержащих 2,4-Д или НУК (1,0-2,0 мг/л), или эти ауксины в комбинации с БАП (0,5 мг/л) (Инюткина и др., 2009). Из четырех исследованных селекционных образцов лучшей способностью к пролиферации каллусной ткани обладали №5р.24 и №6р.17. Отмечено также, что каллус листового происхождения на большинстве испытанных питательных сред обладал лучшей пролиферативной активностью по сравнению со стеблевым каллусом. Поэтому для данных исследований нами был выбран каллус листового происхождения селекционного образца №5р.24. Каллусную ткань культивировали на агаризованной модифицированной среде МС с добавлением 1,0 мг/л НУК и 0,5 мг/л БАП.

При визуальном анализе каллусных тканей в течение цикла выращивания отмечали, что каллус был рыхлым, а его окраска варьировала от светло-бежевой до темно-бежевой.

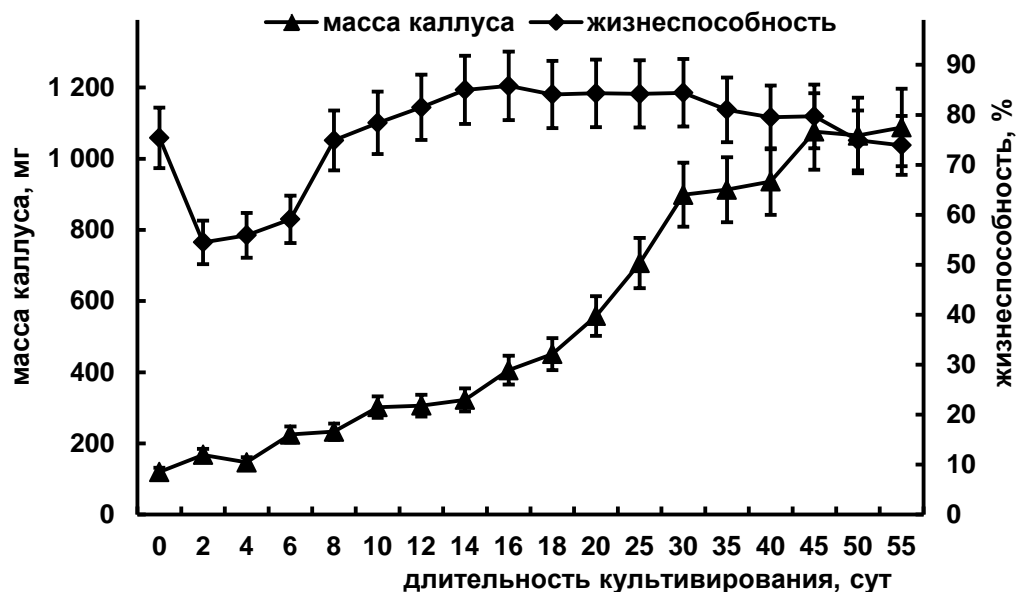


Рис. 1. Изменение массы каллуса и жизнеспособности клеточной популяции в течение цикла выращивания.

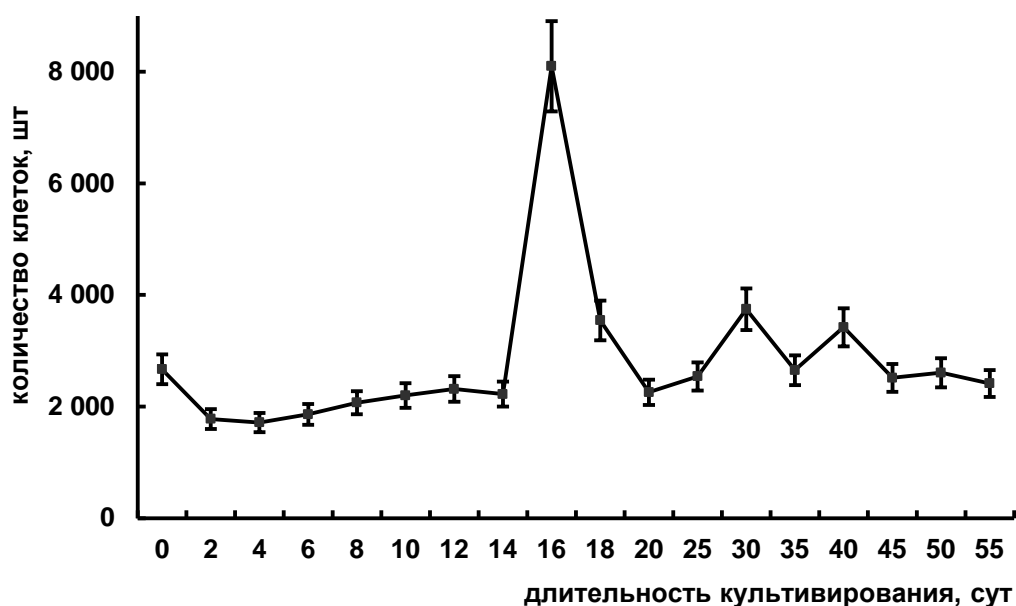


Рис. 2. Динамика плотности клеток в каллусной ткани полыни эстрагон в течение цикла выращивания.

Цитологический анализ позволил выявить, что каллусная ткань состоит из нескольких морфологически различных типов клеток, которые различались по форме и размеру. Среди них были выделены клетки меристематического и паренхимного типов, причем доля клеток каждого типа закономерно изменялась в течение пассажа.

Клетки меристематического типа – мелкие, округлые, с крупным ядром и густой, хорошо окрашиваемой цитоплазмой, обычно располагались очень плотно, группами, образуя

меристематические очаги. В очагах меристематической активности нередко располагались проводящие элементы. Клетки паренхимного типа имели более крупные размеры и одно слабо окрашенное небольшое ядро, расположенное в центре или вблизи клеточной стенки. Цитоплазма с одной крупной или несколькими мелкими вакуолями окрашивалась незначительно. Среди паренхимных клеток условно выделили три типа – округлые (с соотношением длины и ширины 1:1 или 1:2), гигантские (овальной или грушевидной формы, превышающие в несколько раз округлые), удлиненные (длина в не-

ЦИТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ



Рис. 3. Динамика содержания различных типов клеток (%) в каллусной ткани полыни эстрагон в течение цикла выращивания.

сколько раз превышала ширину). Иногда в каллусной ткани можно было увидеть фрагменты проводящих элементов ксилемы, которые из-за редкой встречаемости при анализе не выделяли в отдельный класс.

Установлено, что накопление биомассы каллуса в течение цикла выращивания характеризуется S-образной кривой. При этом за цикл выращивания отмечали почти 8-кратное увеличение массы каллуса (рис. 1). Для других эфиромасличных растений ранее было показано, что за цикл выращивания масса сырого вещества увеличивалась у аниса более чем в 40 раз, лаванды – в 18, розы эфиромасличной – в 17, герани – в 7 раз (Егорова, 2001; Егорова и др., 2008).

Установлено, что в течение первых 4-х суток культивирования каллусной ткани масса каллуса и количество клеток практически не изменялись, отсутствовал видимый рост клеток, что соответствовало лаг-фазе ростового цикла. В этот период жизнеспособность клеточной популяции снизилась до 54% (рис. 1).

На 6-е сутки культивирования отмечали достоверное повышение массы каллуса, она увеличилась с 146,8 мг до 225,2 мг. Каллусная ткань вступила в экспоненциальную (логарифмическую) фазу роста, которая длилась с 6-х по 16-е сутки культивирования. Жизнеспособность клеточной популяции в этот период повышалась до 85,8%. Вследствие интенсивных клеточных делений происходило увеличение в 3 раза количества клеток меристематического

типа, уменьшение числа клеток паренхимного типа (в 4 раза) и уплотнение каллусной ткани. Максимальную плотность клеток (8098,1 кл./мг) и количество клеток меристематического типа (75%) отмечали на 16-е сутки культивирования, что, по-видимому, связано с повышением митотической активности клеток каллусной ткани (рис. 2).

Затем с 18-х по 30-е сутки культивирования наступала линейная фаза роста. В этот период клетки почти не делятся, происходит в основном их рост растяжением, о чем свидетельствует снижение плотности клеток более чем в два раза. К концу данной фазы уменьшилось до 15,8% количество клеток меристематического типа. Увеличилось количество паренхимных клеток, мелких округлых насчитывали 69,0%. В этот период наблюдали второй менее выраженный пик увеличения плотности каллуса, он составил 3743,9 кл./мг.

На 40-е сутки культивирования отмечали третий, еще меньший пик увеличения плотности каллусной ткани, которая составляла 3421,6 кл./мг. Количество клеток паренхимного типа в этот период увеличилось до 76,2%. Таким образом, в течение цикла выращивания каллусных тканей полыни эстрагон отмечали три пика повышения плотности каллуса. Однако только первый пик, по-видимому, связан с увеличением митотической активности клеточной популяции, о чем свидетельствовало повышение количества меристематических клеток. Два последующих пика были менее выраженными и

связаны в основном с увеличением числа мелких паренхимных клеток. У многих видов растений, в том числе и эфиромасличных, ранее отмечали наличие нескольких пиков митотической активности. Так, например, у аниса и розы было выявлено два пика увеличения плотности каллусной ткани (Егорова, 2001; Егорова и др., 2008). У штамма женьшеня БИО-2 за цикл выращивания наблюдали 3-4 подъема митотической активности (Кунах и др., 2003), а у раувольфии насчитывалось пять пиков митотической активности (Кунах, 2005).

Переход популяции каллусных клеток полыни эстрагон в стационарную фазу роста отмечался примерно на 45-е сутки культивирования. В этот период снижалась жизнеспособность клеточной популяции (74%), прекращался достоверный прирост массы каллуса, стабилизировались плотность каллусной ткани и количество разных типов клеток (рис. 1-3). В популяции каллусных клеток в конце цикла выращивания преобладали клетки паренхимного типа, при этом округлых насчитывалось 67,1%, гигантских – 10,7%, а удлинённых – 11,3%.

Из литературных источников известно, что продолжительность основных фаз ростового цикла и цитологические характеристики каллусных культур зависят от большого числа факторов. Среди основных выделяют генотип, пассаж, штаммовые различия каллусных тканей, условия культивирования (Кунах, 2005). Так, у стевии цикл культивирования составлял 21 сутки (Юртаева и др., 1998), у гидрастиса – 25-27 сут (Александрова и др., 2004). Более позднее наступление стационарной фазы отмечали у унгернии (50-60 сутки культивирования) и раувольфии (60-70 сут) (Кунах, 2005; Кунах и др., 2007). Из эфиромасличных растений у лаванды показано наиболее раннее наступление стационарной фазы (на 26 сутки), а у розы эфиромасличной и герани – на 40-45 сутки (Егорова, 2001).

Таким образом, в результате исследований были определены продолжительность и особенности основных фаз ростового цикла у полыни эстрагон. Цикл выращивания каллусной ткани должен составлять не менее 45-50 суток. Показано, что лаг-фаза продолжалась с 0 по 4-е сутки культивирования, логарифмическая – с 6 по 16-е сутки, линейная – с 18 по 30-е сутки, фаза замедления роста – с 35 по 40-е сутки, а стационарная фаза наступала с 45 суток культивирования. Максимальный пик увеличения плотности каллуса, вероятно, связанный с увеличением митотической активности каллус-

ных клеток, наблюдали на экспоненциальной фазе роста.

Полученные данные о ростовых и цитофизиологических особенностях каллусной ткани могут являться основанием для разработки различных биотехнологий, основанных на манипуляциях с каллусными культурами у полыни эстрагон.

ЛИТЕРАТУРА

- Агларова А.М., Зилфикаров И.Н., Северцева О.В. Биологическая характеристика и полезные свойства полыни эстрагон – *Artemisia dracuncululus* L. (обзор) // Химико-фармацевтич. журн. – 2008. – Т. 4, № 2. – С. 31-35.
- Александрова И.В., Аверьянова В.А., Чернышев Р.В., Быков В.А. Каллусная ткань и суспензионная культура *Hydrastis canadensis* L.: ростовые, цитогенетические особенности и первичная оценка биосинтетических потенциалов // Биотехнология. – 2004. – № 1. – С. 39-46.
- Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
- Гаммерман А.Ф., Кадаев Г.Н., Яценко-Хмелевский А.А. Лекарственные растения. – М., 1990. – 543 с.
- Егорова Н.А. Цитофизиологическая характеристика каллусных культур некоторых эфиромасличных растений // Физиология и биохимия культ. растений. – 2001. – Т. 33, № 2. – С. 159-164.
- Егорова Н.А., Ставцева И.В. Получение и цитофизиологическая характеристика каллусной культуры аниса // Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2008. – Вып. 1 (13). – С. 65-70.
- Инюткина А.Г., Егорова Н.А. Влияние некоторых факторов на каллусогенез *Artemisia dracuncululus* L. в культуре *in vitro* // Экосистемы Крыма их оптимизация и охрана (Тематич. сб. науч. тр.). – 2009. – Вып. 1 (20). – С. 94-99.
- Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – Киев: Наук. думка, 1980. – 488 с.
- Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. – К.: Логос, 2005. – 730 с.
- Кунах В.А., Можилевская Л.П., Адонин В.И., Губарь С.И. Продуктивность и генетическая структура клеточных популяций женьшеня *Panax ginseng* С. А. Меу в культуре *in vitro* // Биотехнология. – 2003. – № 3. – С. 25-35.
- Кунах В.А., Можилевская Л.П., Потапчук Б.А. и др. Получение тканей *Ungernia victoris* и ее особен-

ЦИТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ

- ности при выращивании на питательных средах различного состава // Биотехнология. – 2007. – № 1. – С. 14-21.
- Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. – М.: Колос, 1980. – 304 с.
- Руцких И.Б., Ханина М.А., Серых Е.А. и др. Состав эфирного масла полыни тархун (*Artemisia dracunculus* L.) сибирской флоры // Химия растительного сырья. – 2000. – № 3. – С. 65-76.
- Шевелуха В.С., Калашикова Е.А., Дегтярев С.В. Сельскохозяйственная биотехнология. – М.: Высш. шк., 1998. – 416 с.
- Юртаева Н.М., Лобов В.П. Физиологическая и морфологическая характеристика каллюсов, полученных из различных форм *Stevia rebaudiana* Bertoni // Физиология и биохимия культ. растений. – 1998. – Т. 30, № 3. – С. 219-224.
- Cotton C.M., Gramshaw J.W., Evans L.V. The effect of α -naphthalene acetic acid (NAA) and benzylamino-purine (BAP) on the accumulation of volatile oil components in cell cultures of tarragon (*Artemisia dracunculus*) // J. Exp. Bot. – 1991. – V. 42, № 3. – P. 377-386.
- Kavvadias D., Abou-Mandour A.A., Czygan F.C. et al. Identification of benzodiazepines in *Artemisia dracunculus* and *Solanum tuberosum* rationalizing their endogenous formation in plant tissue // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2000. – V. 269. – P. 290-295.

Поступила в редакцию
31.03. 2011 г.

CYTOPHYSIOLOGICAL FEATURES OF TARRAGON CALLUS TISSUES

A. G. Inyutkina, N. O. Yegorova

*Institute of Essential Oil and Medicinal Plants
National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine
(Simferopol, Ukraine)*

The dynamics of cytophysiological parameters (fresh weight and density of callus tissue, viability of cell population and quantity of different morphological cell types) during callus tissue growth cycle for tarragon (*Artemisia dracunculus* L.) were investigated. It was established, that growth cycle must constitute no less than 50 days, for which there is more than 8-fold increase in mass of callus. Durations of the growth cycle main phases have been determined: lag phase – first 4 days, logarithmic phase – from the 6th to 16th days, linear phase – from the 18th to 30th days, growth slowdown phase – from the 35th to 40th days, stationary phase begins at the 45th day of cultivation. Cytological analysis revealed that the callus tissue consists of meristematic and parenchymal (roundish, giant, elongated) cell types, and showed particularities of each type of change during the passage. During the growing cycle three peaks of the callus density increasing were observed. Maximum callus tissue density and amount of the meristematic type cells noted at the 16th day of cultivation, which appears to be associated with an increase of the mitotic activity of the cells.

Key words: *Artemisia dracunculus* L., callus culture, growth cycle

ЦИТОФІЗИОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ КАЛЮСНОЇ ТКАНИНИ ПОЛИНУ ЕСТРАГОН

А. Г. Інюткіна, Н. О. Єгорова

*Інститут ефіроолійних і лікарських рослин
Національної академії аграрних наук України
(Сімферополь, Україна)*

Досліджена динаміка цитофізіологічних параметрів (маса і щільність калюсної тканини, життєздатність клітинної популяції і співвідношення різних типів клітин) в циклі вирощування калюсної культури полину естрагон (*Artemisia dracunculus* L.). Встановлено, що цикл вирощування повинен складати не менше 50 днів, протягом яких відбувається більш ніж 8-разове

ЦИТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ

збільшення маси калюсу. Визначена тривалість основних фаз ростового циклу: лаг-фаза – 4 доби, логарифмічна – з 6 до 16-ї доби, лінійна – з 18 до 30-ї доби, фаза уповільнення росту – з 35 до 40-ї доби, стаціонарна фаза наставала з 45-ї доби культивування. При цитологічному аналізі виявлено, що калюсна тканина складається з меристематичних і паренхімних (округлих, гігантських, подовжених) типів клітин. Показані особливості зміни кожного типу протягом пасажу. Протягом циклу вирощування спостерігали три піки підвищення щільності калюсу. Максимальну густину калюсної тканини і кількість клітин меристематичного типу відзначали на 16-у добу культивування, що, ймовірно, пов'язане з підвищенням мітотичної активності клітин.

Ключові слова: *Artemisia dracunculus L.*, калюсна культура, цикл вирощування