УДК 635.6: 631.811.982
DOI: 10.29296/25877313-2018-01-09
© Коллектив авторов, 2018

ВЛИЯНИЕ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА НА ИНДУКЦИЮ И ПРОЛИФЕРАЦИЮ КАЛЛУСА *HEDYSARUM ALPINUM* L.

П.С. Савин
к.б.н., вед. науч. сотрудник,
Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва)
E-mail: savin-pavel@list.ru
М.В. Савенкова
аспирант, Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва)
Т.А. Савина
к.б.н., зав. отделом биотехнологии,
Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва)
С.Б. Мясникова
науч. сотрудник, Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва)

Установлено, что ауксин 2,4-Д является каллусообразующим фактором для большей части эксплантов копеечника альпийского. Выявлены лучшие экспланты для получения каллусной ткани – семядоли проростка растения. Показано, что для культивирования каллуса необходимо в питательную среду вносить ауксины 2,4-Д (0,1 мг/л), НУК (0,1 мг/л) и цитокинин БАП (1,0 мг/л).

Ключевые слова: *альпийский, эксплант, каллус, мангиферин.*

Культура растительных клеток и тканей в настоящее время является альтернативным источником сырья для производства ряда лекарственных препаратов. Использование растительных тканей, культивируемых на искусственных питательных средах в качестве продуцентов биологически активных веществ, основано на их способности синтезировать биологически активные соединения, характерные для целого растения [1].

Процент использования лекарственных препаратов, содержащих соединения растительного происхождения, в медицинской практике постоянно возрастает, поскольку установлено, что лечебное действие их значительно эффективнее, чем препаратов, полученных синтетическим путем. Однако существующие проблемы, связанные с сокращением ресурсов дикорастущих видов и с трудностями введения в полевые культуры, ограничивают внедрение многих лекарственных препаратов [2].

Одним из таких лекарственных растений является копеечник альпийский (*Hedysarum alpinum* L.), из травы которого выделен ксантоновый гликозид мангиферин, обладающий высокой биологической активностью. В медицине используют траву копеечника для производства препарата алпизарин [3, 4]. Актуальность данных исследований определяется необходимостью получения стабильно растущего каллуса копеечника альпийского, продуцирующего ксантон мангиферин, который является основой для производства ценного лекарственного средства.

Копеечник альпийский – многолетнее травянистое растение семейства бобовых, произрастает в России, на Украине и в некоторых районах Кавказа. Естественные заросли находятся в Забайкалье и Читинской области. Цветет копеечник альпийский в июле–августе, плоды созревают в конце августа–начале сентября. Семена характеризуются твердосемянностью. Мангиферин в основном содержится в листьях. В траве копеечника установлено также наличие флавоноидов (гиперезида, хедизарида и др.). В листьях обнаружено 220–1375 мг% аскорбиновой кислоты. В корневищах и корнях найдено до 30–40% полисахаридов – производных галактозы, ксилозы, галактуроновой кислоты и рамнозы [5].

Широкое распространение копеечника альпийского сдерживается из-за того, что биологической особенностью его является неравномерность прорастания семян. Это в дальнейшем приводит к позднему и неравномерному появлению всходов; также отмечена низкая всхожесть семян данного растения (от 7 до13%) [6–8].

Цель исследования – получение экспериментальных данных по введению в стерильную культуру и инициации каллуса из нативного растения копеечника альпийского.

Задачей являлось выявление зависимости каллусообразования от типа экспланта и от фитогормонов. Изучено действие регуляторов роста ауксиновой, цитокининовой природы и гиббереллина (ГК) с преимущественным содержанием гиб-

береллиновой кислоты ($ГК_3$) на каллусогенез из разных частей растения копеечника альпийского.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для исследования были взяты семена растения копеечника альпийского, выращиваемого на фармакологическом участке Ботанического сада ФГБНУ ВИЛАР, урожая 2013 г.

Для получения стерильных проростков семена (40 штук) подвергали стерилизации диацидом в течение 20 мин, затем промывали стерильной дистиллированной водой и высаживали в пробирки на агаризованную (0,8%) среду по прописи Готре [9]. Пробирки с семенами помещали в термостатированное помещение под лампы белого света с интенсивностью освещения 1000 люкс. В результате получили семь стерильных проростков копеечника альпийского. Из полученных растений выделили стерильные эксплантыи: корень, стебель, листья, семядоли, гипокотиль.

Для инициации и культивирования каллуса использовали питательную среду по прописи Мурасиге и Скуга с добавлением 0,6% агара. Гормональные добавки – ИУК, L-нафтилуксусную кислоту (НУК), 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д), кинетин и 6-бензилоаминопурин (БАП), гиббереллин с преимущественным содержанием $ГК_3$ в различных сочетаниях и концентрациях добавляли в питательную среду до автоклавирования.

Работы проводили в стерильных условиях с использованием боксов-ламинаров (Россия). Культуры инкубировались в термостатах ТС80М2 (Россия) при 26 °С.

Наличие образования и роста каллуса оценивали визуально по принципу есть (+) / нет (–) роста.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что каллусную ткань *in vitro* можно получить практически из любой живой ткани растения, однако из молодых тканей реальнее выделить каллусную культуру, чем из зрелых. Поэтому для индукции каллусогенеза в эксперимент были взяты экспланты, выделенные из стерильных проростков семян растения копеечника альпийского. С целью инициации образования каллусной ткани полученные стерильные экспланты (66 шт.) высаживали на питательные среды Мурасиге и Скуга, содержащие разные ростовые вещества (табл. 1).

Исследуемые факторы вводили в питательную среду согласно матрице эксперимента:

№ 1 – 2,4-Д 0,1 мг/л + кинетин 0,5мг/л;

№ 2 – 2,4-Д 0,1 мг/л + ИУК 0,5 мг/л;

№ 3 – кинетин 0,1 мг/л+ ИУК 0,05 мг/л.

В результате проведенного эксперимента было определено, что регуляторы роста в сочетаниях 2,4-Д + кинетин и 2,4-Д + ИУК инициировали образование первичного каллуса практически из всех эксплантов. Однако отмечено, что экспланты из разных частей растения по-разному откликались на состав регуляторов роста. Лист и гипокотель в 100% образовывали первичный каллус на средах с содержанием регуляторов роста в следующих сочетаниях: цитокинин + ауксин или только ауксины. Для эксплантов из корня проростка предпочтительней был состав регуляторов роста среды № 1 (80%), из стебля – состав регуляторов роста среды № 2 (80%). Для образования первичного каллуса из семядоли требовалось присутствие в питательной среде двух ауксинов. Питательная среда № 3 не давала положительных результатов ни с одним из изучаемых эксплантов.

Если рассматривать полученные результаты в процентном соотношении от общего числа посаженных эксплантов, то можно отметить, что на среде с добавлением кинетина 0,1 мг/л и ИУК 0,05 мг/л процент каллусообразования составил 3,9%. На среде с добавлением кинетина – 0,5 мг/л и 2,4-Д – 0,1 мг/л – 63%, а на среде с добавлением 2,4-Д 0,1 мг/л и ИУК 0,5 мг/л – 61%. Ауксин 2,4-Д

Таблица 1. ***Получение каллуса из стерильных проростков различного происхождения, шт.***

Тип экспланта	Варианты эксперимента					
	№1		№ 2		№ 3	
	Посажено эксплантов, шт.	Число эксплантов с каллусом, шт	Посажено эксплантов, шт.	Число эксплантов с каллусом, шт	Посажено эксплантов, шт.	Число эксплантов с каллусом, шт
Листья	3	3	4	4	3	0
Корень	5	4	4	1	6	0
Семядоли	3	0	3	2	3	0
Гипокотиль	2	2	2	2	3	0
Стебель	6	3	5	4	8	0

Таблица 2. ***Влияние разного состава сред по гормональному фактору на рост каллусной ткани копеечника альпийского***

Каллусная ткань (штаммы)		Среда 1	Среда 2	Среда 3	Среда 4
Источник получения	Число, шт.	2,4-Д – 0,1 мг/л, кинетин – 0,1 мг/л, БАП – 2,0 мг/л, НУК- 2,0 мг/л	$ГК_3$ – 0,1 мг/л, кинетин – 0,1 мг/л, БАП – 2,0 мг/л, НУК – 2,0 мг/л	2,4-Д – 1,0 мг/л, кинетин – 1,0 мг/л, НУК – 2,0 мг/л	2,4-Д – 0,1 мг/л, БАП – 1,0 мг/л, НУК – 0,1 мг/л
Листья	14	–	±	–	±
Корень	7	–	–	–	±
Семядоли	4	+	–	–	+
Гипокотиль	3	–	–	–	±
Стебель	12	–	–	–	±

П р и м е ч а н и е : «–» – нет роста; «±» – рост слабый; «+» – рост хороший.

присутствовал во всех вариантах, дающих положительный результат по образованию первичного каллуса, поэтому его можно отнести к каллусообразующему фактору для большей части эксплантов копеечника альпийского.

Для инициации образования вторичного, стабильно растущего каллуса экспланты с первично образованным каллусом (штаммы) переносились на питательные среды с расширенным качественным и количественным составом регуляторов роста (табл. 2).

Изучению подвергались регуляторы роста, входящие в разные группы: гиббереллoвая кислота ($ГК_3$), цитокинины – кинетин и БАП; ауксины – 2,4-Д и НУК.

Всего для эксперимента были взяты первично образованные каллусы 40 эксплантов из разных частей проростков. Каллусы разных эксплантов делились поровну по вариантам эксперимента или переносились поочередно на новую питательную среду.

В результате эксперимента отмечено, что сочетание регуляторов роста среды 1 инициировало активное нарастание первично образованной каллусной ткани, полученной из семядоли проростка. Первичные каллусы другого происхождения оказались не способными к пассируемому росту на питательной среде, содержащей полный набор изучаемых регуляторов роста, и находились в «спящем» состоянии. При введении в питательный субстрат $ГК_3$ взамен ауксина 2,4-Д (среда 2) на каллусной ткани, полученной из листа проростка, наблюдалось появление вытянутых образований. На остальных штаммах первично образованная каллусная ткань визуально увеличивалась в объеме первые 10 суток, в последующие сутки изменения в приросте биомассы не отмечались. Исключение из питательного субстрата цитокинина БАП на фоне увеличения в 10 раз концентраций кинетина и 2,4-Д также не способствовало началу активного роста каллусов всех эксплантов.

Исключение из питательного субстрата кинетина и значительное снижение концентраций БАП и НУК позволило активировать ростовые процессы полученных каллусов. Наилучший отклик на данный гормональный состав дал каллус, выделенный из семядоли проростка. Данное сочетание гормонов и их концентраций позволило инициировать небольшой прирост массы в виде светлых образований и у каллусов, полученных от других частей растения.

Результаты проведенных исследований показали, что экспланты разных частей растения и выделенные из них каллусы по-разному откликаются на гормональный состав питательной среды. Положительный отклик на гормональную инициацию роста клеток дал каллус, полученный из семядоли проростка. Значимыми для образования первичного каллуса и его последующего роста оказались регуляторы роста с ауксиновой активностью – 2,4-Д, НУК, и с цитокининовой активностью – БАП.

ВЫВОДЫ

1. Ауксин 2,4-Д присутствовал во всех вариантах, дающих положительный результат в образовании первичного каллуса, поэтому его можно отнести к каллусообразующему фактору для большей части эксплантов копеечника альпийского.
2. Лучшим эксплантом для получения каллусной ткани являются семядоли проростка растения, полученного из семени интактного растения.
3. Для получения первичного каллуса и дальнейшего его культивирования необходимо в

питательную среду вносить ауксины 2,4-Д (0,1 мг/л); НУК (0,1 мг/л) и цитокинин БАП (1,0 мг/л).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Васильева И.С., Пасешниченко В.А.* Стероидные гликозиды растений и культуры клеток диоскореи, их метаболизм и биологическая активность // Успехи биологической химии. 2000. Т. 4. С. 153–204.
2. *Носов А.М.* Лекарственные растения. М.: Эксмо. 2004. 350 с.
3. *Matkowski A., Kuś P., Góralska E., Woźniak D.* Mangiferin – a bioactive xanthonoid, not only from mango and not just antioxidant // Mini. Rev. Med. Chem. 2013 Mar. V. 13, № 3. P. 439–455.
4. *Вичканова С.А.* Эффективность алпизарина при герпесвирусных заболеваниях у детей и взрослых // Практическая фитотерапия. 2000. № 1. С. 34–39.
5. *Зиннер Н.С.* Биологические особенности *Hedysarum alpinum* L. и *Hedysarum theinum* Krasnob. при интродукции в условиях лесной зоны Западной Сибири: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Томск. 2011. 19 с.
6. *Хоциалова Л.И.* Интродукция лекарственного растения копеечника альпийского в нечерноземье: Автореф. дис. … канд. биол. наук. М. 1989. 24 с.
7. *Бушковская Л.М.,* Пушкина Г.П., Климахин Г.И. Применение микроэлементов в системе защиты лекарственных культур от вредителей // ООО АГРО XXI «Издательство Агрорус». 2007. № 10–12. С. 38–39.
8. *Кузнецова Е.И., Дыцкова Е.В., Жученко А.А.* Экологически безопасная технология возделывания копеечника альпийского // Вестник РГАЗУ. 2008. № 1. С. 36–37.
9. *Бутенко Р.Г.* Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М.: ФБК-ПРЕСС. 1999. 159 с.

Поступила 20 июля 2017 г.

PLANT GROWTH REGULATORS INFLUENCE ON THE INDUCTION AND PROLIFERATION OF CALLUS *HEDYSARUM ALPINUM* L.

© Authors, 2018

P.S. Savin
Ph.D. (Biol.), Leading Research Scientist, All-Russian Research Scientific Institute of Medicinal and Aromatic Plants (Moscow)
E-mail: savin-pavel@list.ru
M.V. Savenkova
Post-graduate Student, All-Russian Research Scientific Institute of Medicinal and Aromatic Plants (Moscow)
T.A. Savina
Ph.D. (Biol.), Head of Department of Biotechnology, All-Russian Research Scientific Institute of Medicinal and Aromatic Plants (Moscow)
S.B. Myasnikova
Research Scientist, All-Russian Research Scientific Institute of Medicinal and Aromatic Plants (Moscow)

The use of plant tissues cultivated on artificial nutrient media as producers of biologically active substances based on their ability to synthesize biologically active compounds, characteristic of the whole plant. One of such medicinal plants is *Hedysarum alpinum* L. grass which is allocated xantonova glycoside mangiferin with high biological activity. In medicine use the herb Hedysarum for the production of the drug alpizarin.

The purpose of this study was to obtain experimental data on the introduction into a sterile culture initiation of callus from native plants *Hedysarum alpinum* L.

The task was to identify, based on the type of Explant and plant hormone. Have studied the effect of growth regulators auxin, cytokinin nature and gibberellins on the callusogenesis from different parts of the plant Hedysarum Alpine.

It was found that to obtain the primary callus and its further cultivation is required in a nutrient medium to make the auxins 2,4-D (0.1 mg/l); NAA (0.1 mg/l) and cytokinin BAP (1.0 mg/l). Best explants for obtaining callus tissue was cotyledons of seedling plants derived from the seed of intact plants.

***Key words**: Sweetvetch Alpine, explant, callus, mangiferin.*

REFERENCES

1. Vasil'eva I.S., Paseshnichenko V.A. Steroidnye glikozidy rastenij i kul'tury kletok dioskorei, ih metabolizm i biologicheskaja aktivnost' // Uspehi biologicheskoj himii. 2000. T. 4. S. 153–204.
2. Nosov A.M. Lekarstvennye rastenija. M.: Jeksmo. 2004. 350 s.
3. Matkowski A., Kuś P., Góralska E., Woźniak D. Mangiferin – a bioactive xanthonoid, not only from mango and not just antioxidant // Mini. Rev. Med. Chem. 2013 Mar. V. 13, № 3. P. 439–455.
4. Vichkanova S.A. Jeffektivnost' alpizarina pri gerpesvirusnyh zabolevanijah u detej i vzroslyh // Prakticheskaja fitoterapija. 2000. № 1. S. 34–39.
5. Zinner N.S. Biologicheskie osobennosti Hedysarum alpinum L. i Hedysarum theinum Krasnob. pri introdukcii v uslovijah lesnoj zony Zapadnoj Sibiri: Avtoref. dis. ... kand. biol. nauk. Tomsk. 2011. 19 c.
6. Hocialova L.I. Introdukcija lekarstvennogo rastenija kopeechnika al'pijskogo v nechernozem'e: Avtoreferat dis. kand. biol. nauk. M. 1989. 24 s.
7. Bushkovskaja L.M., Pushkina G.P., Klimahin G.I. Primenenie mikrojelementov v sisteme zashhity lekarstvennyh kul'tur ot vreditelej // OOO AGRO HHI «Izdatel'stvo Agrorus». 2007. № 10–12. S. 38–39
8. Kuznecova E.I., Dyckova E.V., Zhuchenko A.A. Jekologicheski bezopasnaja tehnologija vozdelyvanija kopeechnika al'pijskogo // Vestnik RGAZU. 2008. № 1. S. 36–37.
9. Butenko R.G. Biologija kletok vysshih rastenij in vitro i biotehnologii na ih osnove. M.: FBK-PRESS. 1999. 159 s.