

УДК 582.675.1.086.83.:547.91

## ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ ИНДУКЦИИ КАЛЛУСООБРАЗОВАНИЯ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO* ВЕГЕТАТИВНЫХ ОРГАНОВ ЛОМОНОСА ВИНОГРАДОЛИСТНОГО

Сидякин А.И., Бугара А.М., Белова О.Н.

Исследованы особенности каллусообразования в культуре вегетативных почек и сегментов молодых листьев ломоноса виноградолистного (*Clematis vitalba* L.) *in vitro* на модифицированных питательных средах Гамборга и Эвелега (B5) и Лина и Стабы дополненных 2,4-Д и БАП. Установлено, что частота каллусообразования зависела от концентрации и соотношения регуляторов роста в питательной среде. Максимальная частота каллусообразования (97%) обнаруживалась при культивировании вегетативных органов на модифицированной питательной среде Гамборга и Эвелега (B5), содержащей 1,5мг/л 2,4-Д и БАП.

**Ключевые слова:** *Clematis vitalba* L., регуляторы роста, каллусная культура.

### ВВЕДЕНИЕ

Одним из важных этапов получения клеточных культур продуцентов вторичных метаболитов растений является оптимизация условий индукции каллусогенеза для дальнейшего скрининга высокопродуктивных линий. Известно, что способность к каллусообразованию в значительной степени зависит от типа и концентрации регуляторов роста в питательной среде [1, 2]. В большинстве известных работ для получения каллусных культур используется эмпирический подбор питательных сред по гормональному составу, основным недостатком которого является некоторая несистемность используемых вариантов, что может приводить к некорректной оценке полученных результатов.

Одним из подходов к оптимизации питательных сред является использование методов планирования эксперимента, суть которых сводится к построению графической зависимости между уровнем варьирования лимитирующих факторов и частотой каллусообразования [3]. Это позволяет избежать некорректности в оценке полученных экспериментальных данных и провести оптимизацию питательных сред по концентрации в них регуляторов роста.

Альтернативой такому подходу является выявление закономерностей индукции каллусообразования на питательных средах, содержащих экзогенные регуляторы роста в широком диапазоне концентраций. Поэтому цель настоящего исследования – на примере ломоноса виноградолистного исследовать особенности каллусогенеза на питательных средах различного состава и установить оптимальные концентрации и соотношения регуляторов роста для индукции этого процесса *in vitro*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследований служили вегетативные органы (вегетативные почки и сегменты молодых листьев) ломоноса виноградолистного *Clematis vitalba* L. Для получения асептических культур проводили ступенчатую стерилизацию материала 0,1% раствором  $KMnO_4$  (40 мин.), а затем 3% и 0,3% раствором перекиси водорода (2-3 мин.).

Для индукции каллусообразования экспланты культивировали на модифицированных агаризованных питательных средах Гамборга и Эвелеге (B5) [4] и Лина и Стабы [5] различающихся по содержанию макро- и микро элементов, витаминов, сахарозы и регуляторов роста – 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксисукусная кислота) и БАП (6-бензиламинопурин). Концентрация регуляторов роста в питательных средах соответствовала матрице эксперимента (табл.). Минимальная концентрация и шаг изменения концентраций составляли 0,5 мг/л. Максимальные концентрации регуляторов роста составляли 4,0 мг/л. Высокие концентрации БАП на фоне низких концентраций 2,4-Д не анализировали, так как могли приводить к проявлению различных морфогенетических реакций, а не к индукции каллусогенеза [6].

Таблица.

**Матрица плана эксперимента по оптимизации состава питательной среды для индукции каллусообразования в культуре вегетативных органов ломоноса виноградолистного**

Концентрация БАП, мг/л	Концентрация 2,4-Д, мг/л						
	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0
0,5	+	+	+	+	+	+	+
1,0	+	+	+	+	+	+	+
1,5	-	+	+	+	+	+	+
2,0	-	-	+	+	+	+	+
2,5	-	-	-	+	+	+	+
3,0	-	-	-	-	+	+	+
3,5	-	-	-	-	-	+	+
4,0	-	-	-	-	-	-	+

+ - анализируемые варианты регуляторов роста

- - не анализируемые варианты регуляторов роста.

Экспланты культивировали в химических пробирках (150x15мм), содержащих 10 -12 мл агаризованной питательной среды. На каждый вариант питательной среды было высажено по 10 эксплантов определенного типа. Пробирки с эксплантами помещали в условия термостатированного помещения с температурой 25-27<sup>0</sup>С и 16 часовым фотопериодом при освещенности 2-3 клк.

Частоту каллусообразования оценивали по количеству эксплантов, давших каллус, от общего числа эксплантированных (в процентах). Оптимальные концентрации регуляторов роста устанавливали при помощи построения графической зависимости показателя частоты каллусообразования от состава питательной среды.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Культивирование эксплантов на модифицированных питательных средах Гамборга и Эвелегга (В5) показало, что зависимость частоты каллусообразования от концентрации регуляторов роста носила сложный, нелинейный характер (рис.1). Высокие значения показателя частоты каллусообразования наблюдались в довольно широком диапазоне концентраций 2,4-Д и БАП.

Максимальная частота каллусообразования (97%) обнаруживалась при концентрации 2,4-Д и БАП 1,5 мг/л. Высокие показатели частоты каллусообразования (в пределах 93-95%), были отмечены на средах, содержащих указанные регуляторы роста в концентрациях 3,0 мг/л и 3,5мг/л, а также на средах дополненных 2,4-Д 4,0 мг/л и БАП 3,5мг/л.

Частота каллусообразования в пределах 80-90% была отмечена на питательных средах дополненных регуляторами роста в следующих концентрациях: 3,5мг/л 2,4-Д и 3,0мг/л БАП – 88%, 1,0 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л БАП - 86%, 3,0мг/л 2,4-Д и 2,5мг/л БАП – 83%, 1,5мг/л 2,4-Д и 1,0мг/л БАП, а также 3,5мг/л 2,4-Д и 2,0мг/л БАП – 80%.

Частота каллусообразования на уровне 70-75% наблюдалась на питательных средах содержащих: 3,5мг/л 2,4-Д и 1,5 мг/л БАП, 4,0мг/л 2,4-Д и 2,0 мг/л БАП, а также на среде содержащей по 4,0 мг/л обоих регуляторов роста.

При культивировании эксплантов на других модификациях питательной среды Гамборга и Эвелегга (В5) показатель частоты каллусообразования находился в пределах от 50 до 70%. Только на 2-х из 35-ти вариантов питательных сред были отмечены показатели частоты каллусообразования ниже 50% - на среде дополненной 3,5мг/л 2,4-Д и 1,0мг/л БАП, и на среде содержащей 4,0 мг/л 2,4-Д и 1,0 мг/л БАП.

На рисунке 2 представлены данные по частоте каллусообразования при культивировании эксплантов на модифицированных питательных средах Лина и Стабы. Из представленного графика видно, что как и в случае модификации среды Гамборга и Эвелегга (В5) зависимость частоты каллусообразования от гормонального состава носила нелинейный характер. Однако следует отметить, что общий уровень частоты каллусообразования при культивировании на этой среде был ниже. Максимальные показатели частоты каллусообразования (95%) отмечены на двух модификациях среды Лина и Стабы содержащей по 2,0 мг/л 2,4-Д и БАП, а также 3,5мг/л 2,4-Д и 2,0 мг/л БАП.

Высокие показатели частоты каллусообразования - на уровне 80%наблюдались на питательных средах дополненных по 1,5мг/л 2,4-Д и БАП; 2,5мг/л 2,4-Д и 2,0 мг/л БАП; 3,0мг/л 2,4-Д и 1,5мг/л БАП.

Частота каллусообразования на уровне 70-75% отмечалась на 3 модификациях среды Лина и Стабы, дополненных 4,0мг/л 2,4-Д и 3,5мг/л БАП, 4,0мг/л 2,4-Д и 2,0мг/л БАП, а также 4,0мг/л 2,4-Д и 3,0мг/л БАП.

При культивировании эксплантов на других модификациях питательных сред Лина и Стабы частота каллусообразования на уровне 60% отмечалась на 12 средах. Для остальных модификаций показатель частоты каллусообразования не превышал 50%. Низкие показатели частоты каллусообразования (менее 40%) выявлены на 9 питательных средах.

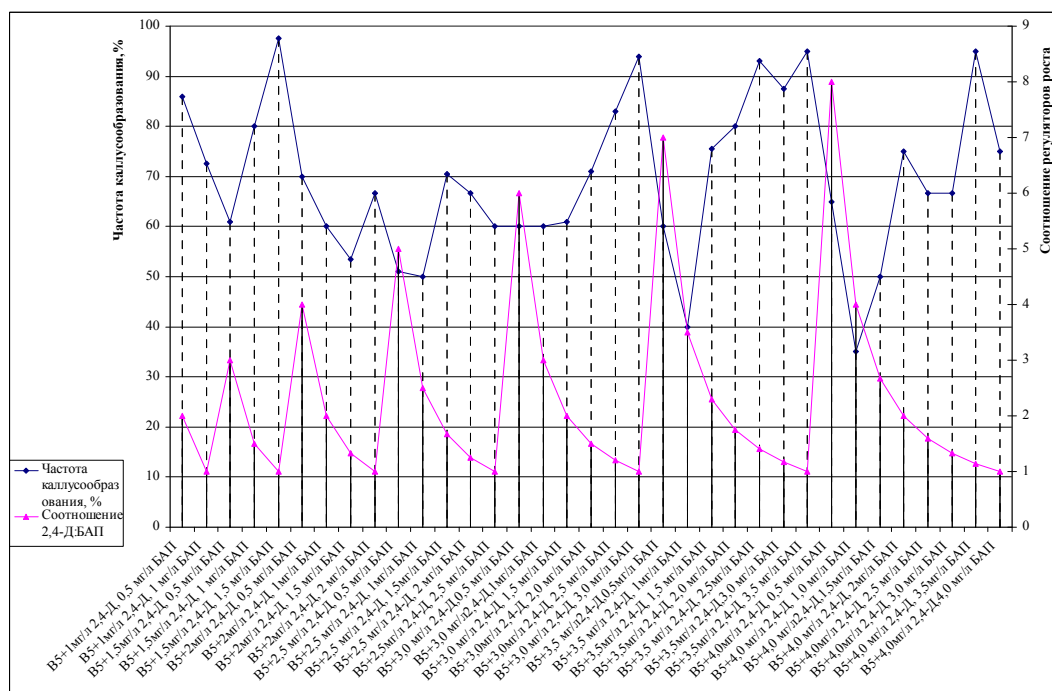


Рис. 1. Частота каллусообразования в культуре вегетативных органов ломоноса виноградолистного и соотношение концентраций регуляторов роста в модифицированных питательных средах Гамборга и Эвелга (B5).

Таким образом, проведенные нами исследования показали возможность получения каллусных культур из вегетативных органов ломоноса виноградолистного на модифицированных питательных средах Гамборга и Эвелга (B5), и Лина и Стабы, дополненных 2,4-Д и БАП в широком диапазоне концентраций. Полученные данные подтверждают тот факт что в культуре *in vitro* определяющим фактором, влияющим на способность эксплантов к каллусообразованию является наличие в питательной среде регуляторов роста, а минеральный и органический состав среды культивирования имеет второстепенное значение [7, 8]. Кроме того, проведенные исследования показали, что в культуре тканей ломоноса виноградолистного, независимо от минерального состава питательной среды, наблюдалась сходная картина по частоте каллусообразования в

зависимости от соотношения регуляторов роста. Высокие показатели частоты каллусообразования наблюдались только при определенных соотношениях концентраций регуляторов роста. Так, максимальная частота каллусообразования была выявлена на модификациях питательных сред с низким соотношением 2,4-Д:БАП. При увеличении этого отношения показатель частоты каллусообразования был значительно ниже. Аналогичная закономерность была показана ранее и для других видов растений [9].

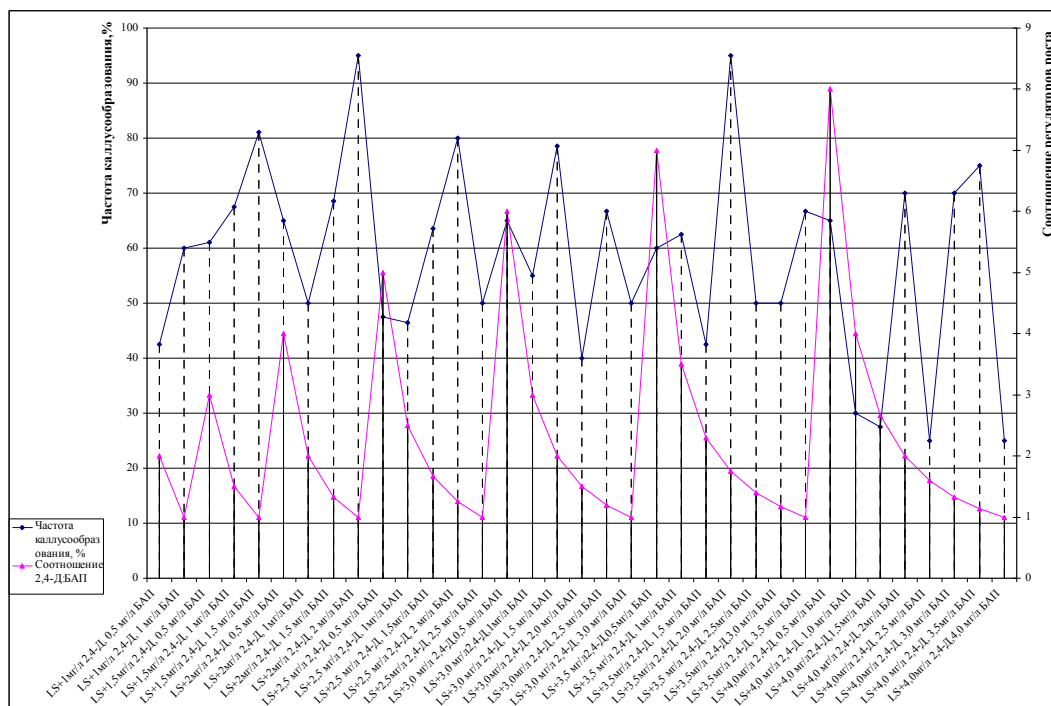


Рис. 2. Частота каллусообразования в культуре вегетативных органов ломоноса виноградолистного и соотношение концентраций регуляторов роста в модифицированных питательных средах Лина и Стабы.

Полученные нами результаты показали что 2,4-Д является основным дедифференцирующим фактором способствующим индукции каллусообразования в культуре вегетативных органов ломоноса виноградолистного. Однако для повышения частоты каллусообразования необходимо дополнительное введение в состав среды БАП. Аналогичная закономерность была ранее показана и другими авторами при изучении закономерностей каллусогенеза у различных видов растений [6 – 9].

Таким образом, основным фактором, определяющим процесс каллусообразования в культуре вегетативных органов ломоноса виноградолистного, является концентрация и соотношение гормональных добавок в питательной среде, что говорит об их лимитирующем влиянии индукцию каллусогенеза.

## ВЫВОДЫ

1. Основным фактором, влияющим на частоту каллусообразования в культуре вегетативных органов ломоноса виноградолистного, является содержание в питательной среде гормональных индукторов
2. Изучение влияния модифицированных питательных сред Гамборга и Эвелега (B5) и Лина и Стабы на индукцию каллусогенеза выявило преимущества модифицированных питательных сред Гамборга и Эвелега (B5), отличающихся повышенным содержанием минеральных компонентов, присутствием витаминов и микроэлементов.
3. Максимальная частота каллусообразования (97%) наблюдалась при культивировании эксплантов вегетативных органов ломоноса виноградолистного на модифицированной питательной среде Гамборга и Эвелега (B5) дополненной 1,5 мг/л 2,4-Д и 1,5 мг/л БАП

## Список литературы

1. Бутенко Р. Г. Культура изолированных органов и физиология морфогенеза растений / Бутенко Р. Г. – М. : Наука, 1964. – 272 с.
2. Калинин Ф. Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Калинин Ф. Л., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е. – К. : Наук. думка, 1980. – 488 с.
3. Зеленина Г. А. Морфогенез в культуре *in vitro* сегментов стебля и клональное микроразмножение *Arnica chamissonis* Less. ssp. *foliosa* (Nutt.) Maguire : дис. ... канд. биол. наук : 03.00.20 / Зеленина Галина Артемовна. – Одесса, 2006. – 141 с.
4. Gamborg O. L. Culture methods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley / O. L. Gamborg, D.E. Eveleigh //Can. J. Biochem. – 1968. – V. 46, № 5. – P. 417 – 421.
5. Lin M. Peppermint and spearmint tissue cultures. 1. Callus formation and submerged culture / M. Lin, E. Staba //Lloydia. – 1961. V 24, № 3. – P. 139 – 145.
6. Митрофанова І. В. Соматичний ембріогенез та органогенез як основа біотехнології одержання і збереження багаторічних садових культур : автореф. дис. На здобуття наук. Ступеня доктора біол. Наук : Спец. 03.00.20 – «Біотехнологія» / І. В. Митрофанова . – Ялта, 2007. – 38с.
7. Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи / В. А. Кунах. – К. : Логос, 2005. – С. 526-548.
8. Гамбург К. З. Ауксини в культурах клеток и тканей растений / Гамбург К. З., Рекославская Н. И., Швецов С.Г. – Новосибирск : «Наука. Сиб. отд-ние», 1990. – 243 с.
9. Киричук Ю. С. Особенности каллусообразования и регенерации растений свеклы столовой *Beta vulgaris* L. / Ю. С. Киричук, Е.М. Кищенко, Н.В. Кучук // IX Международная конф. «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология». Звенигород, 8-12 сент. 2008 г. : тезисы докл. – М., – 2008. – С. 180-181.

Сидякин А.И., Бугара О.М., Белова О.М. Оптимізація складу живильних середовищ для індукції калусоутворення в культурі *in vitro* вегетативних органів ломоносу виноградолистного // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2009. – Т. 22 (61). – № 1. – С. 71-77.

Досліджено особливості індукції каллусогенезу в культурі вегетативних органів *Clematis vitalba* L. на модифікованих живильних середовищах Гамборга і Евелега (B5) та Ліна і Стаби доповнених 2,4-Д та БАП. Встановлено, що частота калусоутворення залежала від концентрації та співвідношення регуляторів росту в живильному середовищі. Максимальна частота калусоутворення (97%) виявлена при культивуванні експлантів на модифікованому живильному середовищі Гамборга і Евелега, що містить 1,5 мг/л 2,4-Д та БАП.

**Ключові слова:** *Clematis vitalba* L., регулятори росту, калусна культура..

*Sidyakin A. I., Bugara A. M., Belova O.N. Optimization of nutrient medium for the induction calusogenesis in culture in vitro vegetative organs of Clematis vitalba // Uchenye zapiski Tavricheskogo Natsionalnogo Universiteta im. V. I. Vernadskogo. Series «Biology, chemistry». – 2009. – V.22 (61). – № 1. – P.71-77.*

Callus induction in the culture of the vegetative organs of *Clematis vitalba* on the modified nutrient media Gamborg-Eveleigh (B5) and the Lin-Staba supplemented 2,4-D and BAP were investigated. It was found that the frequency of callus induction depended on the concentration and ratio of growth regulators in the nutrient medium. The highest frequency of callus induction (97%) detected during cultivation of explants on a modified nutrient medium Gamborg-Eveleigh (B5) containing 1,5 mg/l 2,4-D and BAP.

**Keywords:** *Clematis vitalba*, growth regulator, callus culture.

*Поступила в редакцию 20.05.2009 г.*