

УДК 582.736.3:057.086.83/88

ВЛИЯНИЕ МАРГАНЦА НА РОСТОВЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ *ASTRAGALUS DASYANTHUS* (PALL.) В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Теплицкая Л.М., Юркова И.Н., Кутявина Ю.Н., Решетник Г.В.

Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Украина
E-mail: lm_teplicskaya@ukr.net

Показано влияние различных концентраций марганца в питательной среде на ростовой индекс и цитоморфологические особенности каллусной культуры *Astragalus dasyanthus* Pall. *in vitro*.

Ключевые слова: *Astragalus dasyanthus*, каллусная культура *in vitro*, марганец.

ВВЕДЕНИЕ

Астрагал шерстистоцветковый (*Astragalus dasyanthus* Pall.) – ценное лекарственное растение. Ранее этот вид был широко распространён в степных и лесостепных районах [1, 2]. В настоящее время местонахождение этого растения считают реликтовыми, ареал его стал разорванным, фрагментарным. С 1980 года астрагал шерстистоцветковый занесен в Красную книгу Украины [3]. В растениях *Astragalus dasyanthus* обнаружены тритерпеновые гликозиды (аналогичные по действию сердечным гликозидам), флавоноиды, полисахариды, дубильные вещества, аминокислоты, витамины, макро- и микроэлементы. Важной особенностью растений, является способность избирательно накапливать марганец из почвы. Марганец представляет собой физиологически важный микроэлемент, незаменимый в жизнедеятельности человека и животных. Дефицит марганца отрицательно сказывается на стабильности мембран нервных клеток и нервной системы в целом. Усвоение марганца с увеличением возраста снижается, хотя потребность в нем сохраняется прежняя. Это создает благоприятный фон для развития злокачественных новообразований и сердечнососудистых заболеваний. Одним из источников микроэлементов наиболее доступной(биологически доступной) форме являются растения. Перспективным путём получения растительной биомассы, обогащенной микроэлементами, является культура *in vitro*. Этот метод позволяет в короткие сроки получать клеточные культуры растений, которые могут быть использованы как источник микроэлементов и биологически активных веществ.

Целью работы являлось изучение влияния Mn марганца на особенности роста каллусной культуры *Astragalus dasyanthus* (Pall.) в культуре *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследования служили пассируемые каллусные культуры астрагала шерстистоцветкового [4]. При выполнении экспериментальной работы использовали методы, общепринятые в исследованиях по культуре изолированных тканей растений [5]. Клеточные культуры V пассажа выращивали до стационарной фазы роста на модифицированной агаризованной питательной среде Мурасиге и Скуга (МС), дополненной 2,4 – Д – 2,0 мг/л, 6-БАП – 0,5 мг/л и кинетином – 0,5 мг/л. Содержание марганца (Mn) составляло 1,0., 2,0., 5,0., 10,0 и 15,0 мг/л.

Каллус культивировали в условиях термостатического помещения (25^{°C}) при относительной влажности воздуха 65 %, освещенности 2 тыс. люкс и 16 – часовом фотопериоде.

Индекс роста (отношение среднего объема каллусной культуры к исходному объему каллуса после 9 недель культивирования) определяли морфометрическим методом. Морфологию клеточных культур астрагала шерстистоцветкового оценивали визуально. Цитологические исследования каллуса астрагала шерстистоцветкового контрольного варианта, проводились на временных препаратах, окрашенных ацетокармином [6]. Наблюдение проводили на микроскопе МБИ – 5, с объективами ×5 и ×10. Для проведения микрофотосъемки использовали пакет прикладных программ «PVR Plus» фотоаппараты и «Praktika super», с специальной кольцевой фотонасадкой для микрофотосъемок МФН – 5.

Все полученные экспериментальные данные подвергались статистической обработке с помощью методов статистического анализа в Star Soft Statistica 6.0. Использовались критерии описательной статистики, критерий Колмогорова-Смирнова для определения нормальности выборок с целью определения достоверности различий [7, 8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование закономерностей роста каллусных культур астрагала шерстистоцветкового в зависимости от концентрации в питательной среде марганца показало, что при культивировании каллуса на питательных средах с постоянной концентрацией марганца снижение ростового индекса наблюдалось на концентрации марганца 1,0 и 15,0 мг/л на протяжении всего эксперимента. Максимальный прирост биомассы наблюдался на питательных средах содержащих марганец в концентрации 5,0, 10,0 мг и в контроле (табл. 1).

Как видно из таблицы 1. на протяжении первого месяца после пересадки каллуса на модифицированные среды MS наблюдалось увеличение каллусной массы во всех вариантах. Через два месяца культивирования нарастание каллусной массы происходило на среде MS с концентрацией марганца 2,0, 5,0, 10,0 мг/л и в контрольном варианте. Каллус представлял собой массу оводненных рыхлых клеток, окрашенных в светло-желтый цвет. В ходе исследования на контрольной безгормональной среде МС – 1 наблюдалось активное формирование каллуса на протяжении всего эксперимента (9 месяцев культивирования).

Таблица 1

Влияние концентраций марганца в питательной среде на каллусогенез *Astragalus dasyanthus* Pall.

№ п/п	Варианты питательной среды Мурасиге–Скуга	Состояние культуры и каллусогенез
1.	МС – 1 контроль	активное образование оводненного каллуса светло – желтого цвета на протяжении 9 месяцев культивирования.
2.	МС – 2 (1,0 мг/л Mn)	1 месяц – незначительный прирост массы. Каллус светло-желтого цвета. После 1 месяца культивирования прироста массы не отмечено
3.	МС- 3 (2,0 мг/л Mn)	1 месяц - незначительный прирост массы. Каллус желтого цвета. После 4 месяца культивирования наблюдался активный рост биомассы
4.	МС – 4 (5,0 мг/л Mn)	активное образование оводненного каллуса светло-желтого цвета в течение 9 месяцев культивирования
5.	МС – 5 (10,0 мг/л Mn)	активное формирование оводненного каллуса желтого цвета в течение 9 месяцев культивирования
6.	МС – 6 (15,0 мг/л Mn)	1 месяц – незначительный прирост массы. Каллус светло-желтого цвета. После 2 месяца прироста массы не отмечено

В процессе субкультивирования наблюдались незначительные изменения в цвете каллуса (от светло-желтого до светло – коричневого).

Каллус, культивируемый на питательной среде МС – 2 (рис.1, 2) и МС – 3 (рис.3) характеризовался незначительным ростом на начальных стадиях культивирования. В последующие месяцы слабый прирост биомассы наблюдался только на среде МС – 3. Каллус, культивируемый на питательных средах МС - 4 (рис.4) и МС - 5 (рис.5) характеризовался интенсивным ростом, значительной оводненностью и рыхлой структурой. На начальных стадиях культивирования цвет данных каллусных культур был светло – желтым. В процессе субкультивирования цвет каллуса значительно не изменялся. На питательной среде МС–6 также наблюдался незначительный прирост биомассы за весь период субкультивирования (рис.6).

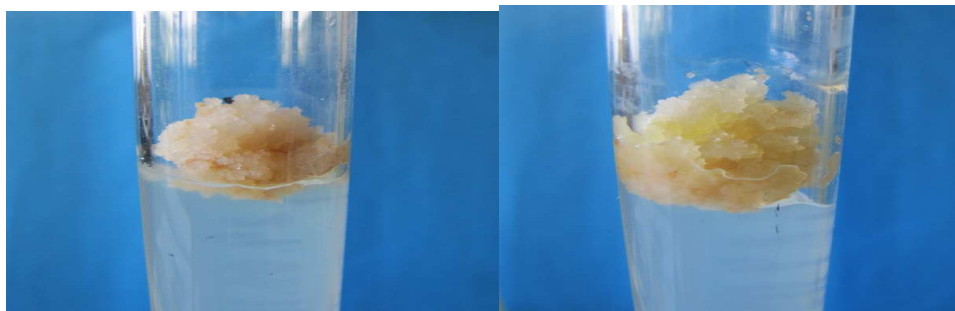


Рис. 1. Внешний вид каллуса астрагала шерстистоцветкового на среде Мурасига и Скуга, (МС-1) не содержащей Mn (контроль)

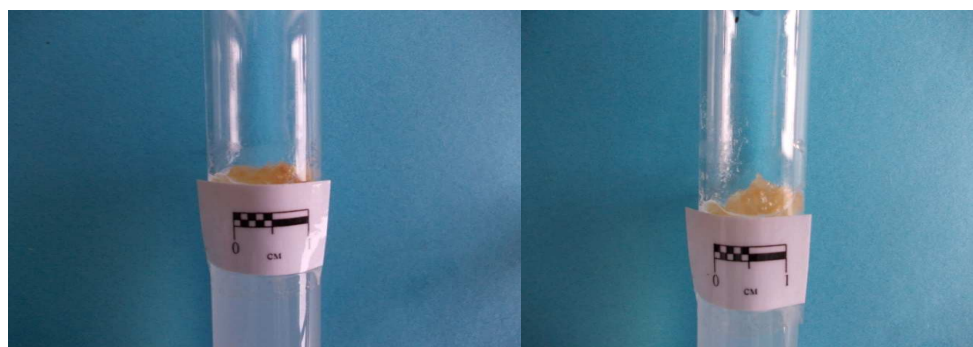


Рис.2. Внешний вид каллуса астрагала шерстистоцветкового на среде Мурасига и Скуга, (МС-2) содержащей Mn в конц. 1,0 мг/л.

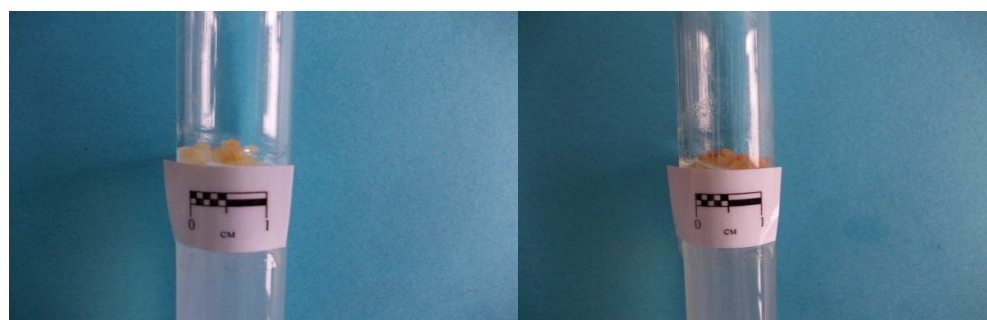


Рис.3. Внешний вид каллуса астрагала шерстистоцветкового на среде Мурасига и Скуга, (МС-3) содержащей Mn в конц. 2,0 мг/л.

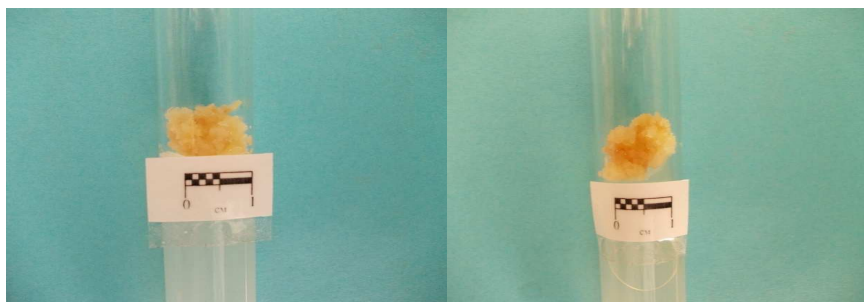


Рис.4 Внешний вид каллуса астрагала шерстистоцветкового на среде Мурасига и Скуга, (МС-4) содержащей Mn в конц. 5,0 мг/л

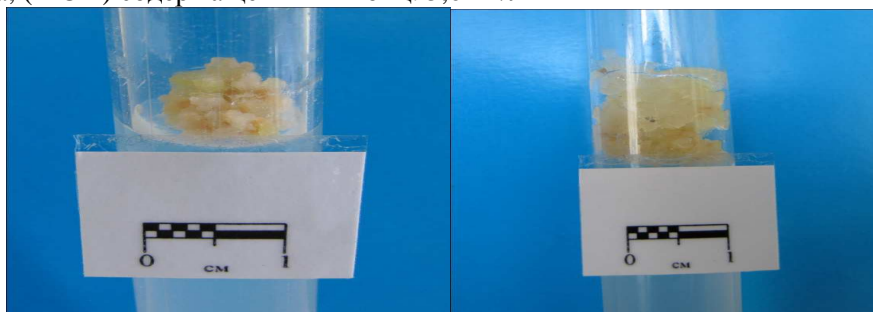


Рис.5. Внешний вид каллуса астрагала шерстистоцветкового на среде Мурасига и Скуга, (МС-5) содержащей Mn в конц. 10,0 мг/л.

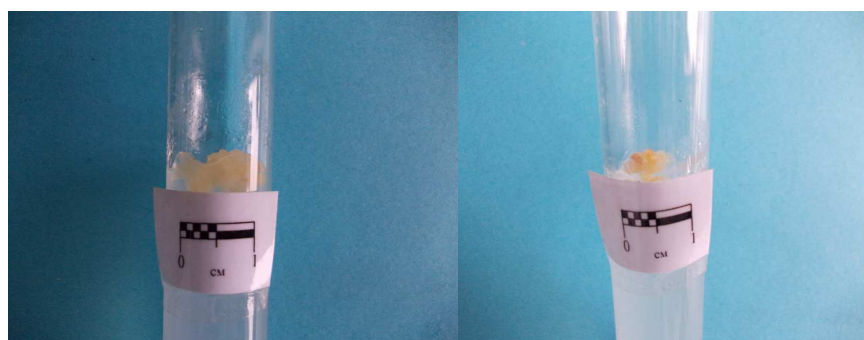


Рис.6. Внешний вид каллуса астрагала шерстистоцветкового на среде Мурасига и Скуга, (МС-6) содержащей Mn в конц. 15,0 мг/л.

Для интенсивного образования каллусной массы астрагала шерстистоцветкового, аккумулирующего марганец, оптимальной оказалась питательная среда МС – 4 и МС - 5, содержащая 2,4 –Д - 2,0 мг/л, 6-БАП – 0,5 мг/л, кинетин - 0,5 мг/л, аскорбиновую кислоту - 5,0 мг/л и марганец в концентрации 5 и 10 мг/л соответственно, на которой отмечено активное образование каллуса при длительном культивировании до 9 месяцев (рис. 7).

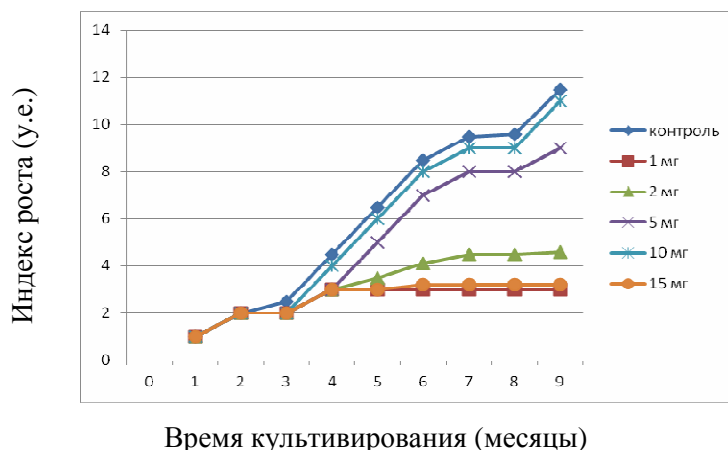


Рис.7. Изменение ростового индекса каллусной культуры *Astragalus dasyanthus* Pall. в процессе культивирования (9 месяцев).

В ходе исследований проводилось изучение цитоморфологических параметров клеток каллусной ткани. Цитологические исследования позволили установить, что каллус астрагала шерстистоцветкового состоит из клеток, которые можно отнести к двум основным морфологическим типам:

1) меристематического типа – сравнительно мелкие изодиаметрической формы, с интенсивно окрашенными цитоплазмой и ядром. За счет митотических делений этих клеток осуществляется рост каллусной культуры (рис.11).

2) паренхимного типа – различные по величине, с слабо окрашивающейся цитоплазмой и интенсивно окрашивающейся клеточной стенкой. Данный тип клеток составляет основную массу каллусной ткани. Такие клетки имели округлую, овальную, неправильную, вытянутую и червеобразную формы, располагались в основном вокруг локальных скоплений клеток меристематического типа (рис.8–11).

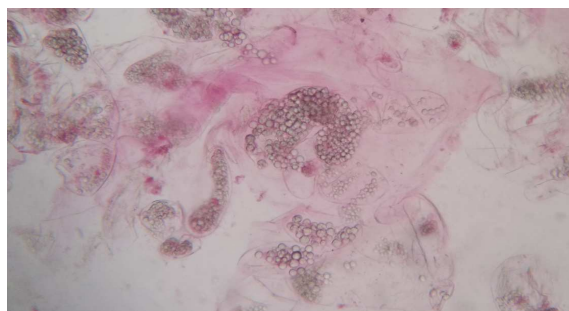


Рис. 8. Запасяющие клетки каллусной культуры астрагала шерстистоцветкового (*A.dasyanthus*)

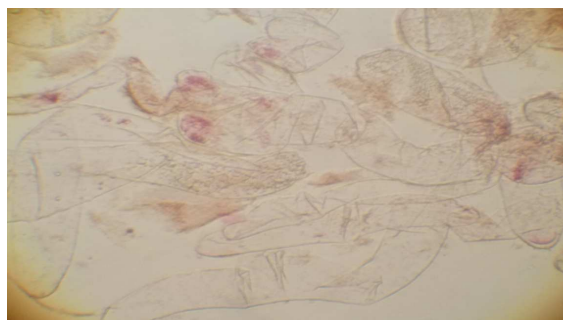


Рис. 9. Вытянутые и червеобразные клетки каллуса астрагала шерстистоцветкового (*A.dasyanthus*)



Рис. 10. Гигантские клетки каллуса астрагала шерстистоцветкового (*A.dasyanthus*)

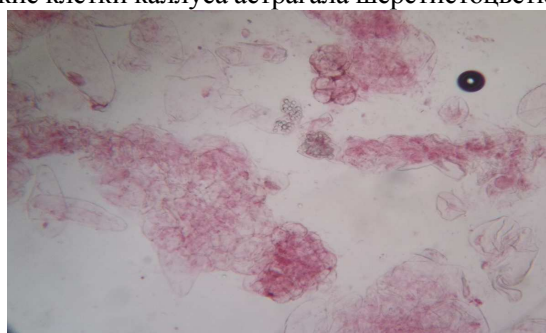


Рис. 11. Скопления клеток каллуса астрагала шерстистоцветкового меристематического и паренхимного типа.

Большинство клеток каллуса культивируемого на среде МС-1, представлено клетками меристематического типа, количество которых составляло 75,9% ($\pm 7,6$) (рис. 12) число клеток других типов составило незначительное число: неправильной формы 8,4 % ($\pm 0,9$), овальных – 6,0 % ($\pm 0,7$), вытянутых – 1,2 % ($\pm 0,2$), червеобразных и гигантских – 1,8 % ($\pm 0,2$) и 6,7 % ($\pm 0,7$). При цитоморфологическом анализе каллусных клеток культивируемых на среде с добавлением марганца МС-4 было установлено, что доля меристематических клеток снизилась до 66,3 % ($\pm 1,7$), количество клеток неправильной формы увеличилось до 11,7 % ($\pm 1,2$), овальных уменьшилось незначительно, число вытянутых увеличилось

до 1,7 % ($\pm 0,2$), червеобразных до 2,0 % ($\pm 0,3$). Значительно увеличилось количество гигантских клеток в 2 раза до 12,3 % ($\pm 1,3$).

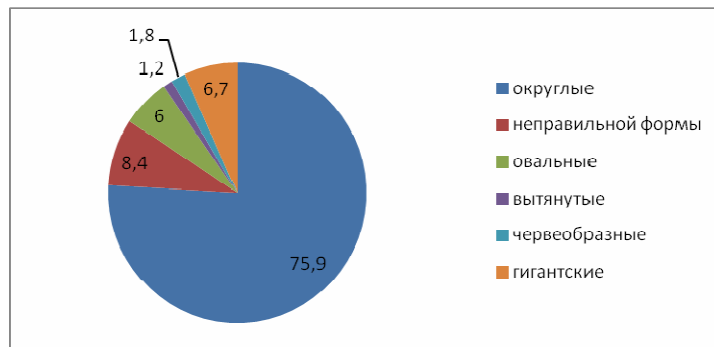


Рис.12. Соотношение различных типов клеток каллусной ткани астрагала шерстистоцветкового на среде МС – 1.

Результаты цитологического анализа каллусных культур показали, что они состояли из рыхло расположенных клеток, легко отделяющихся друг от друга в результате непрочного контакта между ними. При этом в каллусе не были обнаружены морфогенные структуры в виде зачатков почек или эмбриоидов. Установленный факт позволяет сделать заключение, что каллус астрагала шерстистоцветкового, индуцируемый на питательной среде, дополненной 2,4 - Д, БАП и кинетином может быть использован для получения суспензионной культуры, поскольку свойство каллуса легко распадаться на отдельные клетки и клеточные агрегаты является определяющим фактором при глубинном культивировании. С другой стороны, присутствие в каллусных культурах астрагала шерстистоцветкового крупных локальных скоплений клеток меристематического типа делает их удачным объектом для индукции органогенеза или соматического эмбриогенеза [9]. Именно эти клетки, сохраняющие способность к пролиферации, обычно являются своеобразными центрами индукции морфогенеза. В этой связи каллусная культура астрагала шерстистоцветкового может быть использована не только для получения клеточной суспензии, но и, для интенсивного клонального микроразмножения данного вида.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что оптимальной для интенсивного роста каллусной культуры *A.dasyanthus* является модифицированная питательная среда Мурасиге и Скуга вариант МС-4 и МС-5, содержащая 2,4-Д-2,0 мг/л, 6-БАП-50,5 мг/л, кинетин-0,5 мг/л, аскорбиновую кислоту -5,0 мг/л и марганец в концентрации 5,0 и 10,0 мг/л.
2. Показано, что показатель индекса роста каллусной культуры *A.dasyanthus* на оптимальных вариантах питательных сред составил 9 и 11 условных единиц.
3. Сравнительный цитоморфологический анализ каллусных культур показал наличие прямой связи между соотношением в культурах клеток различного типа и индексом роста.

Список литературы

1. Аркушина Г.В. Урбановфлора Кировограда : автореф. дис... канд. биол. наук / Г.В. Аркушина. – Ялта, 2007. – 20 с.
2. Балабай И. В. Растения, которые нас лечат / И.В. Балабай, А.К. Нистрян. — К., 1981. — С. 35.
3. Гончаров Н.Ф. Astragalus L. - Астрагал. / Гончаров Н.Ф. // Флора СССР. М. - Л. : Изд-во АН СССР, 1946. – т. 12. - С. 114-117.
4. Получение каллусных культур *Astragalus dasyanthus* Pall. и анализ их ростовой активности при выращивании на питательных средах с различной концентрацией селена / В.П. Тайкова, И.Н. Юркова, И.А. Бугара, А.М. Бугара // Биотехнология. Наука. Образование. Практика : материалы Межд. науч. конф. (Днепропетровск, 11-13 ноября 2008 г.): мат. Конф. – Днепропетровск : ДВНЗ, 2008. – С. 173-174.
5. Калинин Ф.Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф.Л. Калинин, В.В. Сарнацкая, В.Е.Полищук. - Киев : Наукова думка, 1980. – С. 488.
6. Паушева Л.А. Практикум по цитологии растений. Паушева Л.А. – М : Колос, 1980. - 304 с.
7. Лакин Г.Ф. Биометрия / Лакин Г.Ф..Издание 4-е пер. и док.- М. : Высшая школа, 1990. – 354 с.
8. Плохинский Н.А. Математические методы в биологии / Плохинский Н.А. – М. : из-во МГУ, 1978.-261с.
9. Бугара И.А. Получение и цитологический анализ каллусных культур астрагала шерстистоцветкового (*Astragalus dasyanthus* Pall) / И.А. Бугара, И.Н.Юркова, А.М.Бугара // Ученые записки Таврического национального университета. Серия «Биология и химия» - 2008. - Т.21(60), №2. - С. 9-14.

Теплицька Л.М. Вплив марганцю на ростові характеристики *Astragalus dasyanthus* (Pall.) в культурі *in vitro* / Л.М. Теплицька, І.М. Юркова, Ю.Н. Кутявіна, Г.В. Решетник // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І.Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2012. – Т. 25 (64), № 4. – С. 193-201.

Показано вплив різних концентрацій марганцю в живильному середовищі на ростовий індекс і цитоморфологічні особливості калусної культури *Astragalus dasyanthus* Pall. *in vitro*.

Ключові слова: *Astragalus dasyanthus* калусна культура *in vitro*, марганець.

Teplytskaya L.M. Influence manganese on growth characteristics *Astragalus dasyanthus* (Pall.) cultivated *in vitro* / L.M. Teplytskaya, I.N. Yurkova, J.N. Kutyavyna, G.V. Reshetnyk // Scientific Notes of Taurida V.Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No 4. – P. 193-201.

It was shown the effects of different concentrations of manganese in the culture medium for the growth index and cytomorphological features of callus *Astragalus dasyanthus* Pall. *in vitro*.

Keywords: *Astragalus dasyanthus*, callus *in vitro*, manganese.

Поступила в редакцію 12.11.2012 г.