

УДК 58

**ОЧИТОК СУПРОТИВОЛИСТНЫЙ – БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ
АСПЕКТЫ ПОЛУЧЕНИЯ КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР****Гревцова Светлана Алексеевна**

кандидат биологических наук

Рехвиашвили Этери Илларионовна

доктор биологических наук

Кабулова Марина Юрьевна

кандидат биологических наук

Айлярова Мадина Камболатовна

старший преподаватель

Горский государственный аграрный университет, Владикавказ

author@apriori-journal.ru

Аннотация. Растения издавна являются поставщиками соединений для различных отраслей химической промышленности, целого ряда сложных вторичных метаболитов. В настоящее время, разрабатывают новые принципы биотрансформации и выделения, новых продуктов вторичного метаболизма. Реализация морфогенетического потенциала в культуре *in vitro* осуществляется путём как активации существующих в растении меристем, так и индукции возникновения почек или эмбриоидов (соматических зародышей) *de novo* непосредственно из тканей экспланта и из каллуса, образованного клетками экспланта. Используя в качестве объекта боковые почки, зародыши, молодые ткани, можно клонировать растения, т.е. получать растения, генетически идентичные исходному. Культивируемые клетки и ткани растений можно выращивать в виде неорганизованной клеточной массы (каллус), способной к синтезу видоспецифичных биологически активных соединений, и заменять ими традиционное растительное сырьё.

Ключевые слова: клональное микроразмножение; очиток супротиволистный; эксплант.

BIOTECHNOLOGY FOR THE PRODUCTION OF CALLUS CULTURES FROM *SEDUM OPPOSITIFOLIUM*

Grevtsova Ssvetlana Alekseevna

candidate of biological sciences

Rechviashvili Eter Illarionovna

doctor of biological sciences

Kabulova Marina Yuryevna

candidate of biological sciences

Ailyarova Madina Cambeltowna

senior lecturer

Gorsky State Agrarian University, Vladikavkaz

Abstract. In the foundation of clonal micropropagation is the use of the unique ability of plant cells to realize their inherent totipotentiality under the influence of experimental effects and give rise to a whole plant body. The realization of morphogenetic potential of in vitro culture is carried out by activation of existing in the plant meristem and induction of occurrence of the kidneys or embryoids (somatic embryos) de novo directly from tissue explants and from callus formed by the cells of the Explant. Using as the object of lateral buds, embryos, young tissue, you can clone plants, i.e. to obtain plants genetically identical to the original. Cultured cells and tissues of plants can be grown in the form of an unorganized cell mass (callus), is able to synthesize species-specific biologically active compounds, and to replace traditional vegetative raw materials.

Key words: clonal micropropagation; stonecrop spritiuality; explant.

Достижения в области культуры in vitro привели к созданию эффективных и экономически выгодных технологий клонального микроразмножения растений. В основе клонального микроразмножения лежит использование уникальной способности растительных клеток реализовать

присущую им тотипотентность под влиянием экспериментальных воздействий и дать начало целому растительному организму. Реализация морфогенетического потенциала в культуре *in vitro* осуществляется путём как активации существующих в растении меристем, так и индукции возникновения почек или эмбриоидов (соматических зародышей) *de novo* непосредственно из тканей экспланта и из каллуса, образованного клетками экспланта. Используя в качестве объекта боковые почки, зародыши, молодые ткани, можно клонировать растения, т.е. получать растения, генетически идентичные исходному. Культивируемые клетки и ткани растений можно выращивать в виде неорганизованной клеточной массы (каллус), способной к синтезу видоспецифичных биологически активных соединений, и заменять ими традиционное растительное сырьё.

Актуальным направлением клеточных технологий в настоящее время является сохранение и воспроизводство редких видов растений.

Цель работы – получение каллусных культур из очитка супротиволистного.

Объектами наших исследований явились растения семейства толстянковые *Crassulaceae* DC., рода очитковых *Sedum* s.l.: Очиток супротиволистный *Sedum – oppositifolium*;

Очиток супротиволистный (*Sedum oppositifolium* Sims, 1815). Растет в сухих местностях Кавказа и в Северном Иране. Встречается на каменистых склонах, осыпях и скалах [1].

Вечнозеленый почвопокровный многолетник. Вид чрезвычайно близкий к очитку ложному, но отличается светлой окраской цветков (белые или бледно-желтые). В первый же год жизни дает много лежащих на земле, укореняющихся по всей длине побегов, и быстро образует сплошной ковер) [5].

Корневище ползучее, длинное; корни тонкие, волокнистые. Стебли приподнимающиеся, у основания ползучие, со следами опавших листьев, опушенные; генеративные стебли длиной 6-15 см, бесплодные короче.

Листья супротивные, обратно-яйцевидно-клиновидные, 1-2,5 x 0,5-1,5 см, с коротким черешком, туповато-усеченные или притупленные на верхушке, в верхней части до половины городчато-крупнозубчатые, с тонким пушком или голые, реснитчатые и узкоперепончатые) [3].

Соцветие густое, зонтиковидно-щитковидное, с прицветниками, не превышающими соцветие, раскидистое, с короткими цветоножками или цветки почти сидячие. Чашелистики ланцетные, тупые, прямые, светло-зеленые, в 2-3 раза короче венчика. Лепестки линейно-ланцетные, заостренные, длиной 0,7-1,3 мм, белые или бледно-желтовато-кремовые. Тычинок 10, с беловатыми нитями и желтыми, потом темными пыльниками, немного или значительно короче лепестков. Нектарные железки выемчатые, с шириной, превышающей длину, прикреплены к плодолистикам основанием и боковыми краями, образуя как бы карман. Листовки прямые. Семена яйцевидные, меньше 1 мм, полосатые. Цветет летом (июль-август) [2].

Средние пробы зеленой массы растений отбирали в соответствии с ГОСТ 23637-79.

Для изучения питательной ценности исследуемых объектов, проводили анализ зеленой массы очитков по основным физическим, физико-химическим и органолептическим показателям по методикам ВИЖа (А.Е. Петухова и др., 1989).

Целью получения растительных культур *in vitro* исследуемых очитков *S. oppositifolium*, в условиях *in vitro* послужило:

- получение экологически чистой биомассы;
- синтез новых веществ (вторичных метаболитов), не содержащихся в интактном растении;
- сохранение генофонда лекарственных растений;
- определение биоресурсного потенциала исследуемых растений в условиях интродукции.

Эксплантами для каллусогенеза послужили проростки, полученные при определении всхожести семян очитка супротиволистного листочки взрослого растения очитка супротиволистного (*S. oppositifolium*)

Питательной средой была подобрана модифицированная среда Мурасиге-Скуга. Питательной средой была подобрана модифицированная среда Мурасиге-Скуга. Стерилизацию питательной среды MS проводили автоклавированием при 1 атм, 150 °С в течение 20 минут.

Стерилизацию исходного материала проводили раствором гипохлорита натрия (10 %) 20 минут, затем тщательно промывали 4 раза стерильной водой.

Колбы и пробирки с питательными средами закрывали ватно-марлиевыми пробками, обернули в оберточную бумагу и автоклавировали при температуре 120 °С и давлении 1 атм. В течение 20 минут.

Для того чтобы вызвать каллусогенез, стерильные листочки взрослого растения искусственно травмировали. На предметном стекле листочки повреждали иголкой оп направлению жилок. Затем подготовленные стерильные проростки и листочки помещали в пробирки со средой MS. Первое культивирование проводили в пробирках объемом 20 мл с ватно-марлиевыми пробками.

Все мероприятия проводили в стерильном боксе.

Условия культивирования следующие: выращивание каллусов проводили на свету; длительность светового периода 10-11 часов в сутки; при температуре 20-25 °С, влажности 70 %.

Так как для суспензионного культивирования необходима каллусная культура рыхлой структуры, нами была подобрана культура очитка супротиволистного (*S. oppositifolium*), полностью отвечающего требованиям.

Суспензионное культивирование осуществляли в стеклянных сосудах объемом 200 и 400 мл, закрытых ватно-марлиевыми пробками и фольгой с жидкой, стерильной модифицированной питательной средой

Мурасиге-Скуга того же состава (Табл. 1), что и для культивирования, которое мы проводили в пробирках и чашках Петри.

Таблица 1

**Состав модифицированной питательной среды MS
для культивирования каллусных культур очитков**

Компоненты	Количество, мг/л
Макро-соли (по Мурасиге-Скугу)	50
Микро-соли (по Мурасиге-Скугу)	1
Пиридоксин	1
Тиамин	1
Аскорбиновая кислота	1
Феруловая кислота	1
Индолилуксусная кислота	1
Кинетин	1
Fe-хелат	5
Сахароза	20000
Агар	7000
pH – 5,8	

Для инициации культуры взяли 2 г каллусной ткани из пробирок. Необходимым условием для суспензионного культивирования является аэрация и перемешивание. В связи с этим, объем емкости для культивирования заполнили на 1/3, а перемешивание осуществлялось с помощью электромагнитной мешалки. Время культивирования составило 5 дней.

Получен каллус *S. oppositifolium* серо-розового цвета, который имеет рыхлую структуру, состоящую из сильно обводненных клеток, легко распадающихся на отдельные агрегаты; средней плотности, с хорошо выраженными меристематическими очагами

Результаты представлены на рисунках 1, 2.

Возрастающая потребность в сырье не может быть удовлетворена возобновлением вида в природных условиях. Данная проблема подробно изучена Т.Б. Батыгиной, В.Е. Васильевой [4].



Рис. 1. Калусная ткань очитка супротиволистного (*S. oppositifolium*)

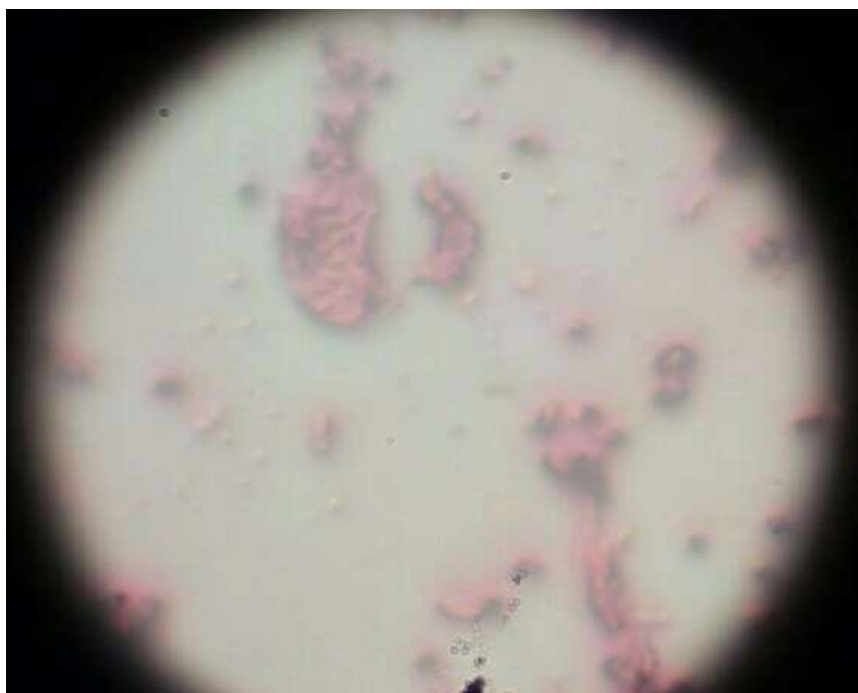


Рис. 2. Каллус *S. oppositifolium* под микроскопом

Методы культуры изолированных органов, тканей и клеток растений *in vitro* в настоящее время широко используются для решения как теоретических, так и прикладных задач биотехнологии и физиологии расте-

ний. Культивируемые клетки представляют собой пластичные системы, обладающие способностью менять процессы дифференциации под воздействием определенных физических и химических факторов. Это свойство дает возможность подобрать условия для максимальной реализации морфогенетического потенциала культивируемого экспланта, заканчивающейся формированием растений-регенерантов при разработке технологий размножения. Кроме того, регенерация растений в строго контролируемых экспериментальных условиях определяет и практическую значимость методов культуры *in vitro*.

Список использованных источников

1. Банникова В.П., Хведынич О.А. Основы эмбриологии растений. Киев: Наукова думка, 1982. С. 73.
2. Барыкина Р.П., Веселова Т.Д., Девятое А.Г., Джалилова Х.Х., Ильина Г.М., Чубатова Н.В. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы. М.: Изд-во МГУ, 2004. С. 231.
3. Батыгина Т.Б. Эмбриодогения новый тип вегетативного размножения // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 3: Системы репродукции / ред. Т.Б. Батыгина. СПб.: Мир и семья, 2000. С. 334-349.
4. Батыгина Т.Б., Васильева В.Е. Размножение растений. СПб.: Изд-во Санкт-Петербургского университета, 2002. С. 145.
5. Бутенко Р.Г. Биология культивируемых клеток и биотехнология растений. М.: Наука, 1991. С. 112.