

ПОЛУЧЕНИЕ КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ ЭХИНАЦЕИ ПУРПУРНОЙ КОРНЕВОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ И ОЦЕНКА ЕЕ РОСТОВОЙ АКТИВНОСТИ

ДИТЧЕНКО Татьяна Ивановна, к.б.н., доцент

КОРОБКИНА Алеся Валерьевна, студент

ЮРИН Владимир Михайлович, д.б.н., профессор

Белорусский государственный университет

Тип экспланта, используемый для инициации каллусной культуры, способен оказывать существенное влияние на ее ростовые и биосинтетические характеристики. В случае травянистых растений каллусные ткани могут быть получены из изолированных отрезков стеблей и корней, фрагментов листьев, органов цветка и др. [1, с. 21]. Несмотря на процесс дедифференциации, предшествующий каллусогенезу и приводящий к упрощению структуры клеток и некоторой их стандартизации, различное тканевое происхождение клеток экспланта является одной из причин гетерогенности получаемой каллусной ткани, причем некоторые функциональные особенности могут передаваться в ряду клеточных поколений как стойкие модификации.

Представители рода *Echinacea* применяются в медицинской практике для профилактики и лечения заболеваний, связанных с состоянием иммунодефицита, а также инфекционных и воспалительных заболеваний. При этом эхинацея пурпурная (*Echinacea purpurea* L. Moench) является лидером по содержанию ценных биологически активных соединений, в частности, гидроксикоричных кислот и их производных, полисахаридов, флавоноидов и др. В качестве лекарственного сырья используют траву эхинацеи пурпурной либо корневища с корнями [2, с. 674]. При исследовании уровней накопления гидроксикоричных кислот в вегетативных органах эхинацеи пурпурной в разные сроки вегетации установлено, что в фазах кущения и бутонизации содержание данных вто-

ричных метаболитов фенольной природы находится практически на одинаковом уровне в корнях и листьях растений [3]. Можно предположить, что и каллусная культура эхинацеи пурпурной, полученная из корневых эксплантов, не будет уступать по своему продукционному потенциалу каллусам, инициированным из листовых эксплантов, и, следовательно, может быть использована в качестве источника ценных фенолпропаноидов.

В связи с этим целью настоящей работы явилось получение каллусной культуры *Echinacea purpurea* корневого происхождения и анализ ее ростовых характеристик в зависимости от состава и концентрации гормональных эффекторов в питательной среде.

В работе использовалась питательная среда по прописи Мурасиге и Скуга (МС), включающая 30 г/л сахарозы. Для индукции каллусогенеза у изолированных отрезков корней *Echinacea purpurea* протестированы 4 комбинации 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) и кинетина в концентрациях 1-2 мг/л. С целью оптимизации состава питательной среды для культивирования полученной каллусной культуры исследовано 10 комбинаций синтетических ауксинов (2,4-Д, нафтилуксусная кислота (НУК)) и цитокининов (кинетин, 6-бензиламинопурин (БАП)) в составе среды МС.

Поскольку проращивание простерилизованных семян в асептических условиях дает наиболее пригодный материал для получения каллусов, первый этап настоящей работы заключался в проведении процедуры стерилизации семян *Echinacea purpurea*. В качестве стерилизующего агента использовали дезинфицирующее средство «Domestos», содержащее активный хлор. Процесс получения стерильных семян включал следующие стадии: 1) предварительная стерилизация (промывание семян светло-розовым раствором KMnO_4 в течение 20 мин с последующей обработкой 70 %-ным этанолом в течение 1 мин); 2) собственно стерилизация (инкубация в растворе «Domestos»); 3) постстерилизация (4-5-кратное промывание стерильной водой); 4) перенос простерилизованных семян в пробирки с безгормональной агаризованной средой МС. На этапе собственно стерилизации было протестировано 6 режимов, которые различались по продолжительности воздействия дезинфицирующего средства «Domestos» (15 и 30 мин) и его концентрации (50, 33 и 25 % (v/v)).

Установлено, что при 30-ти минутной инкубации семян в растворах стерилизующего агента независимо от его концентрации эффективность стерилизации составила 100 %, однако семена полностью теряли всхожесть. При 15-ти минутной экспозиции и концентрациях раствора антисептика 33 и 50 % (v/v) также обеспечивалась достаточно высокая эффективность стерилизации семян – на уровне 89 и 92%, соответственно, при нулевой энергии прорастания. При использовании «Domestos» в концентрации 25 % (v/v) эффективность стерилизации была самой низкой – 66 %. Однако в отличие от предыдущих режимов стерилизации в этом варианте жизнеспособность семян сохранялась на приемлемом уровне: энергия прорастания и всхожесть составили в среднем 51 % и 63 %, соответственно. Инкубация простерилизованных семян производилась на свету при освещенности 5000 лк в условиях фитостата с периодичностью освещения 14 часов свет/10 часов темнота. В результате были получены стерильные проростки, которые в возрасте 3 недель использовали в качестве источника эксплантов для получения первичного каллуса. Изоляцию эксплантов производили в условиях ламинар-бокса, с помощью стерильного скальпеля корни разрезали на отрезки длиной 1-1,5 см и стерильно переносили на чашки Петри с питательной средой МС, содержащей 2,4-Д и кинетин в разных концентрациях для индукции каллусогенеза. Инкубацию эксплантов осуществляли в условиях термостата в темноте при 25°C. Установлено, что наиболее эффективное формирование первичной каллусной ткани *Echinacea purpurea* корневого происхождения происходило на варианте питательной среды МС, включающем 1,0 мг/л 2,4-Д и 1,0 мг/л кинетина. Появление признаков каллусогенеза на корневых эксплантах наблюдалось в среднем через 18-20 суток. На 40-42 сутки формировалась первичная каллусная ткань в объеме, позволяющем провести ее субкультивирование.

Поскольку гормональные эффекторы являются важнейшими компонентами питательных сред, оказывающими влияние на процессы пролиферации клеток, далее в работе были протестированы разные комбинации синтетических ауксинов и цитокининов на показатели роста полученной каллусной культуры *Echinacea purpurea*. В первой серии экспериментов (6 вариантов сред) питательные среды содержали 2,4-Д в концентрациях 0,2; 0,5 и 1,0 мг/л, а также кинетин в концентрациях 0,5 и 1,0 мг/л на фоне 2,0 мг/л ИУК. Установлено, что наиболее высокие значения индекса роста ($2,81 \pm 0,14$) и скорости роста ($0,086 \pm 0,004 \text{ сут}^{-1}$) были обнаружены при использовании варианта питательной среды, включающего 0,5 мг/л 2,4-Д, 0,5 мг/л кинетина, 2,0 мг/л ИУК. При повышении концентрации кинетина до 1,0 мг/л при всех использованных концентрациях 2,4-Д значения ростовых параметров снижались в среднем в 1,6–1,7 раза. Во второй серии экспериментов (4 вариан-

та сред) в качестве ауксина использовали НУК в концентрациях 0,5 и 1,0 мг/л, в качестве цитокинина – БАП в аналогичных концентрациях. Также, как и в первой серии, все среды были дополнены ИУК в концентрации 2,0 мг/л. Среди испытанных вариантов следует отметить среду, включающую 0,5 мг/л НУК и 0,5 мг/л БАП, на которой индекс роста и скорость роста каллусов составили $2,84 \pm 0,2$ и $0,079 \pm 0,006 \text{ сут}^{-1}$, соответственно, т.е. практически не отличались от показателей роста каллусов в присутствии 0,5 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетина. Для каллусных культур, выращиваемых в присутствии 1,0 мг/л НУК и 0,5 мг/л БАП, наблюдалась вторичная дифференцировка по типу ризогенеза.

Таким образом, среди протестированных комбинаций 2,4-Д и кинетина, а также НУК и БАП для стимуляции ростовых процессов каллусной культуры *Echinacea purpurea* корневого происхождения могут быть рекомендованы варианты, включающие по 0,5 мг/л каждого фитогормона на фоне 2,0 мг/л ИУК. Повышение концентрации кинетина от 0,5 до 1,0 мг/л оказывает негативное влияние на прирост биомассы полученной культуры, аналогичное повышение концентрации НУК приводит к формированию адвентивных корней, что может сопровождаться увеличением продукционного потенциала культуры. Проведенная оптимизация питательной среды по содержанию фитогормонов позволяет эффективно нарабатывать биомассу каллусной культуры *Echinacea purpurea* корневого происхождения с целью дальнейшего установления ее биосинтетических характеристик в отношении вторичных метаболитов фенольной природы.

Список использованных источников

1. Бутенко, Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе / Р. Г. Бутенко. – Москва ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
2. Куркин, В.А. Фармакогнозия: Учебник для студ. фармацевтических вузов / В.А. Куркин. – Самара: ООО «Офорт», ГОУВПО «СамГМУ», 2004. – 1180 с.
3. Динамика накопления гидроксикоричных кислот в различных частях растений эхинацеи пурпурной и рудбекии волосистой, выращенных в условиях светокультуры / И. В. Дойко [и др.] // Химия растительного сырья. – 2002. – №3. – С. 35-37.