

Андреева Анна Петровна

ОПТИМИЗАЦИЯ ФИТОГОРМОНАЛЬНОГО БАЛАНСА ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ АНАБАЗИСА В УСЛОВИЯХ IN VITRO

Адрес статьи: www.gramota.net/materials/1/2011/4/22.html

Статья опубликована в авторской редакции и отражает точку зрения автора(ов) по рассматриваемому вопросу.

Источник

Альманах современной науки и образования

Тамбов: Грамота, 2011. № 4 (47). С. 97-98. ISSN 1993-5552.

Адрес журнала: www.gramota.net/editions/1.html

Содержание данного номера журнала: www.gramota.net/materials/1/2011/4/

© Издательство "Грамота"

Информация о возможности публикации статей в журнале размещена на Интернет сайте издательства: www.gramota.net

Вопросы, связанные с публикациями научных материалов, редакция просит направлять на адрес: almanac@gramota.net

**МЕДИЦИНА, ХИМИЯ, ВЕТЕРИНАРНЫЕ НАУКИ, ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ НАУКИ,
БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ, СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ НАУКИ, НАУКИ О ЗЕМЛЕ**

УДК 581.19

Анна Петровна Андреева

Карагандинский государственный технический университет, Казахстан

**ОПТИМИЗАЦИЯ ФИТОГОРМОНАЛЬНОГО БАЛАНСА
ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ АНАБАЗИСА В УСЛОВИЯХ *IN VITRO***

Анабазис (*Anabasis aphylla* L.) содержит биологически активные алкалоиды: анабазин, афиллин, афиллиндин и др. На основе алкалоида анабазин разработан и внедрен в ветеринарную практику новый препарат с выраженной антириштовозной активностью «Антилишай». В качестве альтернативного источника получения алкалоида анабазин предложено использовать культуру клеток анабазиса *in vitro*.

Установлено, что в основе регуляции биохимических процессов на уровне растительной клеточной массы, фитогормоны имеют первостепенное значение [3]. По своему действию они близки к естественным стимуляторам роста и дифференцировки. В больших концентрациях они угнетают рост и развитие культуры клеток растений, оптимальные концентрации ведут к увеличению каллусной массы и активизируют биосинтез вторичных метаболитов в условиях *in vitro*. Для изучения роли эндогенных гормонов на процесс клеточного деления, дедифференцировку специализированных тканей и поддержание каллусных клеток анабазиса в делящемся состоянии, ведущих к образованию первичного каллуса, необходимо учитывать сложные взаимодействия между фитогормонами ауксинового и цитокинового ряда.

Из литературных источников известно, что низкое соотношение фитогормонов в питательной среде (2,4Д 1,0 мг/л и кинитин 0,1 мг/л) способствует формированию почек (гемогенез). Концентрация гормонов в соотношении ИУК - 1,75 мг/л и кинитин - 2,15 мг/л в составе питательной среды вызывает эмбриоидогенез. Гормон ауксинового ряда 2,4Д - 2,0 мг/л чаще других используется в экспериментах, однако есть данные, которые указывают на его способность подавлять синтез вторичных метаболитов в культуре клеток растений [1; 2; 4].

Для культивирования эксплантов анабазиса использовали питательную среду Мурасиге-Скуга (М-С). Оптимизация фитогормонального баланса позволит получить растительные штаммы-продуценты алкалоида анабазин. Были испытаны физиологические регуляторы роста и дифференцировки растительных клеток: фитогормоны 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д), индолилуксусная кислота (ИУК), 6-бензиламинопурин (БАП) и кинитин. Для определения оптимальных концентраций фитогормонов в составе питательной среды для культивирования *in vitro*, активизирующих синтез вторичных метаболитов, нет общих правил. Разработан алгоритм культивирования, в котором учитываются физиологические особенности растительного материала его гетерогенность и лабильность клеточной популяции. Продуктивным подходом для моделирования оптимальных условий культивирования, является использование двухэтапного режима культивирования. В питательной среде М-С для получения первичного каллуса анабазиса оптимизирован состав фитогормонов, стимулирующей накопление растительной биомассы (первый-этап). Состав продуцирующей питательной среды должен индуцировать биосинтез алкалоида анабазин (второй этап культивирования).

Методом бумажной хроматографии проведен полуколичественный анализ содержания анабазина в каллусах анабазиса.

Использование стандартной концентрации 2,4-Д 2,0 мг/л при культивировании каллусов анабазиса, стимулировало деление и растяжение растительных клеток. Первичный каллус, полученный на питательной среде М-С с добавлением гормона 2,4-Д имел рыхлую консистенцию, был обводненным и легко распадался на отдельные клетки, был бесцветным или светло бурой окраски. Отсутствие зеленых хлорофилл содержащих органелл, свидетельствовало о низкой физиологической активности протопластов, и как следствие слабom биохимическом потенциале. Полученные каллусы плохо поддавались субкультивированию, что свидетельствовало о низкой адаптивной устойчивости к химическим и физическим параметрам культивирования. Такой тип каллусов называли неморфогенным. Использование только гормона 2,4-Д вело к подавлению биосинтеза продуктов вторичного метаболизма. Таким образом, полученные данные показали, что данный ауксин мало пригоден для культивирования клеток анабазиса.

Чаще всего в качестве стимуляторов роста клеток в культуре используют два типа соединений: ауксины и цитокинины. Для решения первоочередной задачи двухэтапного культивирования использован дуплет фитогормонов для стимуляции растяжения растительной клетки и одновременно активизации деления каллусных клеток. В совокупности этих физиологических процессов в растительной клетке анабазиса, должно увеличиться накопление биомассы и биосинтез алкалоида анабазин.

При действии на изолированные растительные клетки анабазиса, ИУК 1,75 мг/л и кинитин 2,15 мг/л наблюдалось формирование морфогенного каллуса. Как известно ИУК обладает ауксиновой активностью, и участвует в регуляции деления клеток, образовании корней, но в сочетании с кинитином усиливает синтез

этилена в клетках, что ведет к угнетению процесса ризогенеза. Из новообразованных клеток обычно развивается эмбриоидогенный каллус или множественные проростки. Эмбриоидогенный каллус анабазиса имел кустообразную или глобулярную форму, плотную консистенцию и ярко зеленый цвет. Оптимальное соотношение фитогормонов ауксинов и цитокинов в питательной среде М-С способствовало формированию морфогенной каллусной массы, которая в течение 3-4-х недель обладала способностью образовывать органогенные структуры. Биомасса каллусов анабазиса, была больше, и уровень накопления анабазина выше. Предложенный состав питательной среды М-С с оптимальным балансом фитогормонов, является наиболее перспективным для получения морфогенной культуры клеток анабазиса.

Таким образом, анализируя полученные данные можно сделать следующие выводы, что индукция накопления биомассы возможна при правильном подборе концентраций и соотношений фитогормонов в питательной среде М-С. В результате эксперимента была выявлена оптимальная концентрация ИУК 1,75 мг/л и кинитин 2,15 мг/л (РИ=67,8±1,2), отвечающая поставленной цели первого этапа культивирования. Первый этап культивирования являлся предварительным для получения необходимого количества клеточной массы. Второй этап культивирования необходим для индукции синтеза алкалоида анабазин, для этого фитогормон кинитин заменили БАП. Таким образом, для второго этапа культивирования, была рекомендована питательная среда М-С с фитогормональным фоном ИУК 1,0 мг/л и БАП 0,1 мг/л.

Обращено внимание на то, что каллусы анабазиса на первом этапе культивирования изменялись от неорганизованного размножения к вторичной дифференцировке с образованием морфогенных структур. Морфологические изменения в каллусной массе анабазиса имели ярко выраженные характеристики: цвет зеленый, консистенция плотная, форма глобулярная.

Полученный клеточный материал анабазиса на втором этапе культивирования, сушился, экстрагировался и подвергался химическому анализу методом БХ. Результат химического анализа показал, что на втором этапе культивирования кроме алкалоида анабазин в каллусах анабазиса синтезируется и другие алкалоиды. Среднее количество алкалоида анабазин 0,8 мг на 100 гр. сухой массы каллусов.

Анализируя полученные результаты необходимо отметить, во-первых, для получения каллусной массы анабазиса необходимо, чтобы экспланты были детерминированы в соответствии с задачами культивирования. Во-вторых, для реализации эмбриоидогенного пути развития растительной клетки анабазиса необходимо наличие оптимального фитогормонального баланса в питательной среде М-С. Для получения эмбриоидогенного первичного каллуса анабазиса, важно использовать питательную среду М-С и замена гормона 2,4-Д на ИУК. Установлено, что на первом этапе культивирования при высоких концентрациях фитогормонов ауксин/цитокин (более 4,0 мг/л) в питательной среде М-С, в каллусной массе анабазиса наблюдался ризогенез. При низких концентрациях фитогормонов ауксин/цитокин (менее 0,5 мг/л) в питательной среде М-С, в каллусной массе анабазиса наблюдался гомогенез.

Таким образом, на первом этапе культивирования анабазиса, для получения первичного эмбриоидогенного каллуса рекомендуется использовать концентрацию фитогормонов в питательной среде М-С ИУК 1,75 мг/л и кинитин 2,15 мг/л (РИ=67,8±1,2%). На втором этапе культивирования анабазиса, для биосинтеза алкалоида анабазин в условиях *in vitro* рекомендуется использовать концентрацию фитогормонов в питательной среде М-С ИУК 1,0 мг/л и БАП 0,1 мг/л (алкалоид анабазин 0,8 мг на 100 гр. сухой массы каллусов).

Список литературы

1. Андреева А. П., Аманов С. Б., Ли К. Г., Адекенов С. М. Культура каллусной ткани *Artemisia glabella* Kar. et Kir. продуцента сесквитерпенового лактона арглабин // Поиск, разработка и внедрение новых лекарственных средств и организация фарм. деятельности: международ. конф. Томск, 2000. С. 14.
2. Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М.: ФБК-Пресс, 1999. 160 с.
3. Бутенко Р. Г. Гормональная регуляция дифференцировки растительной клетки в культуре *in vitro* // Рост и гормональная регуляция жизнедеятельности растений. Иркутск, 1974. С. 66-83.
4. Носов А. М. Культура клеток высших растений: от теории к практике // Биология в школе. 2004. № 5. С. 4-8.

УДК 628.16.09

Светлана Николаевна Дербуш, Лариса Павловна Ивлева
Карагандинский государственный технический университет

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ В БИОТЕХНОЛОГИИ[©]

Корни биотехнологии уходят в далёкое прошлое, они связаны с хлебопечением, виноделием и другими способами приготовления пищи, освоенными человеком на протяжении многих столетий. Древнейшим биотехнологическим процессом было брожение с участием микроорганизмов. В пользу этого свидетельствует