

Особенности каллусообразования экдистероидсодержащих видов рода *Silene* L. (Caryophyllaceae Juss.) в культуре *in vitro*

А. А. ЭРСТ, Л. Н. ЗИБАРЕВА*

Центральный сибирский ботанический сад СО РАН
630090, Новосибирск, ул. Золотодолинская, 101
E-mail: annaerst@yandex.ru

*Национальный исследовательский Томский государственный университет
634050, Томск, просп. Ленина, 36
E-mail: zibareval@inbox.ru

АННОТАЦИЯ

Получены стабильно растущие каллусные культуры трех видов рода *Silene* – *S. linicola*, *S. aprica* и *S. frivaldszkjana*. Показано, что генотип растения и тип экспланта оказывают влияние на процессы каллусообразования. Наибольшие индексы роста имели каллусы гипокотильного происхождения $10,1 \pm 1,4$, $11,6 \pm 3,4$ и $7,4 \pm 1,1$ (*S. linicola*, *S. aprica* и *S. frivaldszkjana* соответственно).

Ключевые слова: культура клеток, р. *Silene*, экдистероиды, индекс роста.

В настоящее время актуален поиск как новых биологически активных соединений, так и альтернативных источников их получения. В этом отношении значительный интерес представляет клеточная биотехнология, позволяющая нарабатывать ценные растительные вещества и являющаяся нетрадиционным методом охраны лекарственных растений [1]. Интерес к культуре клеток и тканей *in vitro* обусловлен и тем, что пассируемые клетки растений – удобные модельные системы для изучения ростовых и метаболических процессов, происходящих в клетках, выведенных из-под контроля организма.

Большой интерес к использованию в качестве растительного сырья для получения новых адаптогенных лекарственных препаратов, тонизирующих пищевых добавок,

косметических композиций представляют экдистероидсодержащие растения. С момента обнаружения экдистероидов в растениях в 60-х гг. XX в. – полигидроксилированных стероидов, структурно идентичных или близких по структуре истинным гормонам линьки членистоногих, известно более 400 различных по структуре соединений этого типа [2], большая часть из которых синтезируется растениями. Они обнаружены у представителей более 100 семейств покрытосеменных растений, в том числе и у представителей сем. Caryophyllaceae [3, 4]. Следует, однако, отметить, что лишь очень немногие виды растений, для которых характерно высокое содержание экдистероидов (до 1–3%), пригодны для практического использования в технологиях получения фитоэкдистероидов [5, 6]. В связи с этим акту-

альными направлениями исследований являются поиск новых растительных источников с высоким содержанием экидистероидов и разработка научных основ технологий получения экидистероидов из растительного сырья и клеточных культур.

Задача данной работы – выявить особенности роста каллусов экидистероидсодержащих видов рода *Silene* L. в культуре *in vitro*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования в работе использованы 4 вида рода *Silene* (*S. linicola* C. C. Gmelin, *S. aprica* Turcz. ex Fisch et C. A. Mey, *S. frivaldszkyana* Hampe, *S. repens* Patr. ex Pers.), являющиеся суперпродуцентами экидистероидов. Эти виды впервые рекомендованы в качестве источников фитоэкидистероидов [7–10] и введены в культуру в Сибирском ботаническом саду ТГУ (СибБС ТГУ) в 1994–2007 гг. Установленный состав экидистероидов, синтезируемых этими видами [11–13], в том числе и новых соединений, позволит осуществлять контроль их уровней в процессе каллусообразования.

Для получения культуры клеток взяты семена указанных культивируемых растений. Семена стерилизовали в 20 % растворе Domestos с последующим трехкратным промыванием в стерильной дистиллированной воде и помещали на 0,6 % агар и 0,6 % агар с добавлением гибберелловой кислоты (ГК₃) для проращивания. Условия культивирования семян – температура (22 ± 1) °С, фотоперид 16/8 свет/темнота или темнота.

Для получения каллусной культуры проростки делили на 4 типа эксплантов – корень, эпикотиль, семядольный и настоящий лист. Каллусные и суспензионные культуры выращивали на среде МС с добавлением сахаразы 30 г/л, мезоинозита 100 мг/л, 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) 5 мкМ, бензиламинопурина (БАП) 1 мкМ, гидролизата казеина 1 г/л, витаминов по Стаба, мг/л: фолиевой кислоты – 0,5; рибофлавина (В₂) – 0,5; биотина – 1,0; Са-пантотената – 1,0; кобаламина (В₁₂) – 0,0015, пиридоксина (В₆) – 1; тиамин хлорида (В₁) – 1; никотинамида (РР) – 2, агара 6 г/л. рН до автоклавирования 5,8.

Каллусные культуры культивировали в колбах объемом 150 мл в темноте при температуре (24 ± 2) °С с интервалом 21 день.

При проведении экспериментов оценивали следующие параметры каллусной массы, цвет, структуру, прирост сырой и сухой биомассы (мг). Для определения сырой и сухой массы каллусов их отделяли от питательной среды и взвешивали до и после высушивания при температуре 55 °С до постоянной массы. Анализ прироста биомассы проводили через каждые 3 дня в течение 28 дней. Индекс роста рассчитывали по формуле: $I = (m_{\max} - m_0) / m_0$, где m_0 и m_{\max} – масса каллусов в начале и конце цикла выращивания.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В своей работе мы исходили из представлений, что рост каллуса и содержание в нем экидистероидов зависят от генотипа растения, типа экспланта, среды для культивирования.

Семена исследуемых видов смолевок прорастали на 2–3-й день при всех испытанных режимах. На 4–5-й день культивирования проростки делили на части (корень, гипокотиль, семядольный лист, настоящий лист) и пересаживали на среды для каллусообразования (рис. 1).

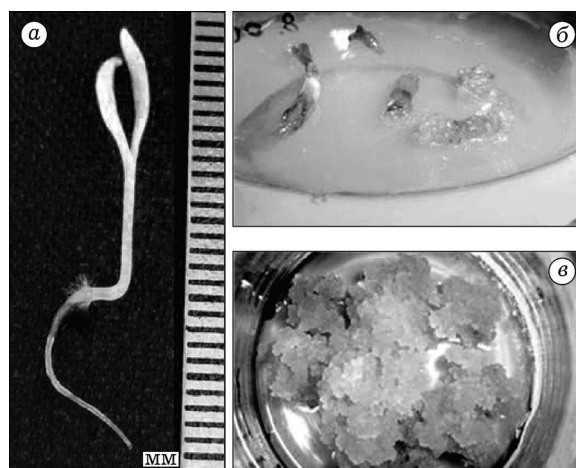


Рис. 1. Основные стадии получения каллусных культур *Silene linicola*: а – исходный материал – проростки; б – начальные этапы каллусообразования из гипокотилей; в – масса каллусов в конце пассажа

Характеристика основных параметров роста каллусных культур представителей р. *Silene*

Вид растения	Тип экспланта	Характеристика каллуса	Индекс роста биомассы	
			сырой	сухой
<i>Silene linicola</i>	Корень	Желтоватого цвета, рыхлый	4,1±0,6	4,0±1,3
	Гипокотиль	То же	9,7±1,6	10,1±1,4
	Семядольный лист	Нет	–	–
	Настоящий лист	»	–	–
<i>Silene aprica</i>	Корень	Светло-коричневого цвета, рыхлый	5,6±1,8	6,7±1,6
	Гипокотиль	То же	13,8±3,1	11,6±3,4
	Семядольный лист	»	9,1±1,5	7,9±2,5
	Настоящий лист	Темно-коричневый	0	0
<i>Silene frivaldszkyana</i>	Корень	Желтоватого цвета, плотный	3,5±0,6	3,4±0,8
	Гипокотиль	То же	4,9±1,1	7,4±1,1
	Семядольный лист	»	2,5±1,5	5,3±1,4
	Настоящий лист	Коричневого цвета, плотный	0	0
<i>Silene repens</i>	Корень	Светло-коричневый, рыхлый, темнеющий	0	0
	Гипокотиль	То же	0	0
	Семядольный лист	»	0	0
	Настоящий лист	»	0	0

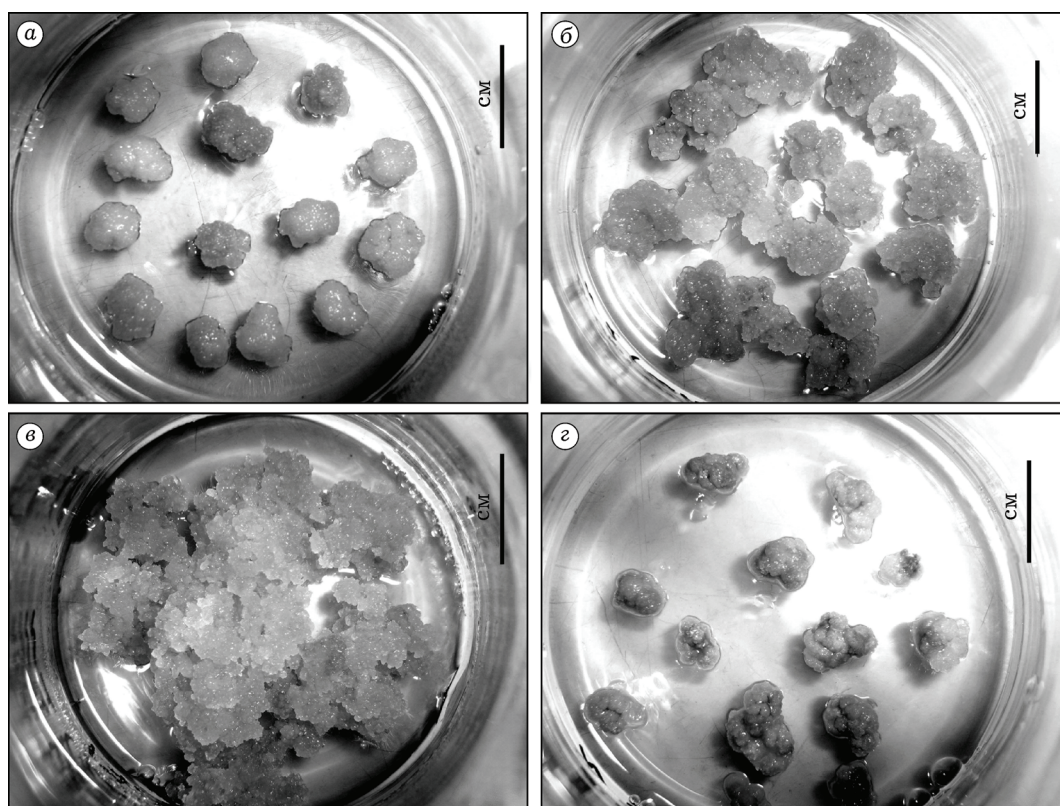


Рис. 2. Внешний вид каллусов в конце пассажа: а – *S. frivaldszkyana* корневого происхождения; б – *S. aprica* гипокотильного происхождения; в – *S. linicola* гипокотильного происхождения; г – *S. repens* семядольного происхождения

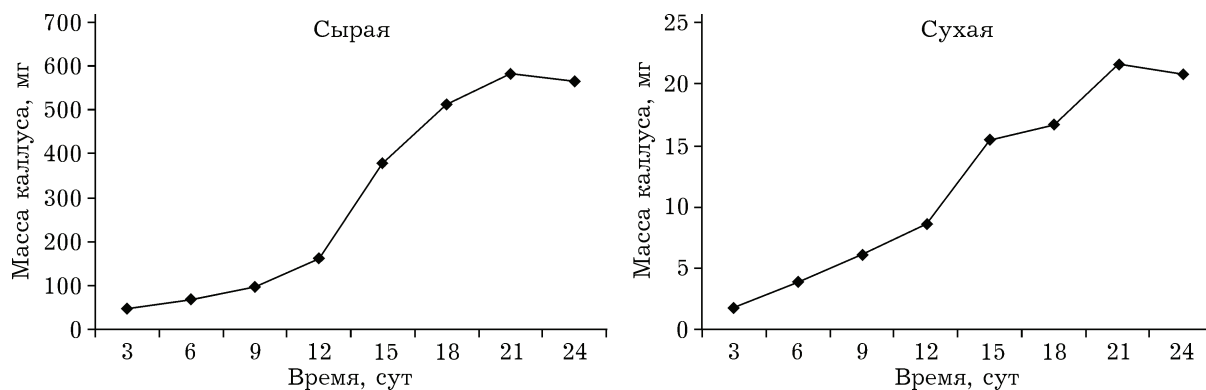


Рис. 3. Динамика роста каллуса гипокотильного происхождения *Silene linicola*

Увеличение скорости роста отмечено при длительном выращивании клеточных культур, поскольку в системе *in vitro*, как правило, происходит отбор клеток по максимальной или устойчивой пролиферации [14]. Наблюдение скорости роста проводили после четвертого пассажа, так как к этому вре-

мени наблюдается стабилизация роста каллусов. Основные результаты наблюдений представлены в таблице и на рис. 2.

Из таблицы следует, что не все исследуемые виды дают хорошо растущие каллусы. Стабильно растущую каллусную культуру удалось получить только у трех видов

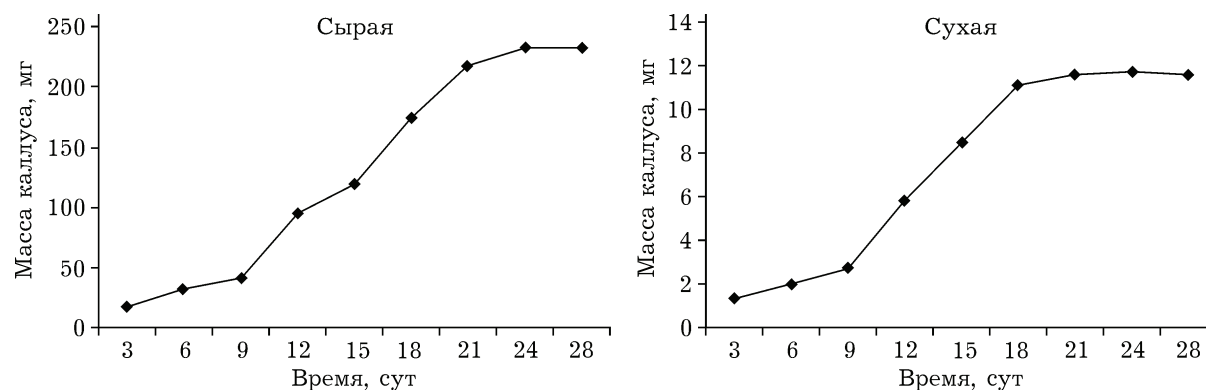


Рис. 4. Динамика роста каллуса семядольного происхождения *Silene aprica*

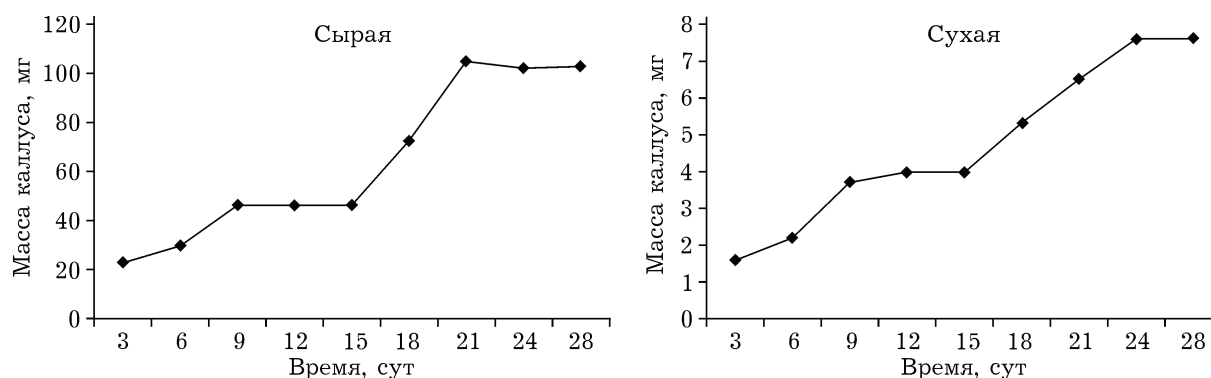


Рис. 5. Динамика роста каллуса корневого происхождения *Silene frivaldszkyana*

смолевок – *S. linicola*, *S. aprica* и *S. frivaldszkyana*. При этом наибольший индекс роста по сухой биомассе имели экспланты гипокотильного происхождения, наименьший – экспланты из настоящих листьев. Каллус из настоящих листьев либо не формировался, либо развивался, но быстро темнел и погибал. В целом близкие показатели индексов роста сырой и сухой биомассы свидетельствуют о незначительной оводненности клеток каллуса.

Ростовые кривые каллусных культур различного происхождения имели стандартную S-образную форму, включающую латентную, экспоненциальную, линейную стадии, стадию замедленного роста и стационарную (рис. 3–5).

Из графиков видно, что в экспоненциальную фазу роста клетки вступали на 9-й день культивирования, в стационарную – на 21-е сутки. Из рис. 4 следует, что прирост сухой биомассы *Silene aprica* заканчивается на 19-е сутки, а прирост сырой – на 23-и сутки, что свидетельствует о том, что после прекращения роста клетки еще некоторое время поглощают воду из среды.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показано, что на каллусообразование экдистероидсодержащих видов рода *Silene* оказывают влияние генотип растения и тип экспланта. Из четырех изученных нами видов рода *Silene* только у трех видов – *S. linicola*, *S. aprica* и *S. frivaldszkyana* – удалось получить стабильно растущие каллусные культуры. Наибольший индекс роста получен из эксплантов гипокотильного происхождения, наименьший – из настоящих листьев. Таким образом, подобранные нами культуральные среды, типы эксплантов обеспечивают возможность получения из первичных эксплантов стабильно растущие культуры каллусов, а из них – суспензионные культуры.

Исследование проведено при финансовой поддержке федеральной целевой программы “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” на 2009–2013 годы (соглашение № 14.В37.21.2004).

ЛИТЕРАТУРА

1. Репях С. М., Юшкова Е. В., Величко Н. А. Влияние химических и физических факторов на рост и развитие каллусных тканей левзеи сафлоровидной // Биотехнология. 1996. № 8. С. 45–49.
2. <http://ecdybase.org/>
3. Distribution of phytoecdysteroids in the *Caryophyllaceae* / L. Zibareva, V. Volodin, Z. Saatov, T. Savchenko, P. Whiting, R. Lafont, L. Dinan // *Phytochemistry*. 2004. Vol. 64, N 2. P. 499–517.
4. Зибарева Л. Н. Фитоэкдистероиды растений семейства *Caryophyllaceae*. Изд-во Lambert (Германия), 2012. 195 с.
5. Лафон Р. Фитоэкдистероиды и мировая флора: Разнообразие, распространение, биосинтез и эволюция // *Физиология растений*. 1998. № 3. С. 326–346.
6. Володин В. В. Экдистероиды в интактных растениях и клеточных культурах: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 1999. 49 с.
7. Зибарева Л. Н., Еремина В. И. Динамика содержания экдистероидов в видах *Silene* // *Раст. ресурсы*. 1996. Т. 32, вып. 1–2. С. 106–110.
8. Зибарева Л. Н., Еремина В. И., Иванова Н. А. Новые экдистероидоносные виды рода *Silene* L. и динамика содержания в них экдистерона // *Там же*. 1997. Т. 33, вып. 3. С. 73–76.
9. Мунхжаргал Н. Экдистероидсодержащие растения Западной Монголии (скрининг, химический состав, перспективы использования): автореф. дис. ... канд. биол. наук. Томск, 2009. 18 с.
10. Мунхжаргал Н., Зибарева Л. Н., Лафон Р., Прибытков Л. Н., Писарева С. И. Изучение качественного состава и содержания экдистероидов дикорастущей в Монголии и интродуцированной в Западной Сибири *Silene repens* // *Химия растительного сырья*. 2009. № 4. С. 133–138.
11. Mamadalieva N., Zibareva L., Saatov Z. Phytoecdysteroids of *Silene linicola* // *Chemistry of Natural Compounds*. 2002. Vol. 38. P. 268–271.
12. Зибарева Л. Н., Лафон Р., Мунхжаргал Н., Иванова Н. А. Идентификация фитоэкдистероидов в некоторых видах рода *Silene* L. (*Caryophyllaceae*) // *Вестн. ТГУ*. 2008. № 307. С. 157–160.
13. The Phytoecdysteroid Profiles of 7 Species of *Silene* (*Caryophyllaceae*) / L. Zibareva, V. I. Yeriomina, N. Munkhjargal, J.-P. Girault, L. Dinan, R. Lafont // *Archives of insect biochemistry and physiology*. 2009. Vol. 72, N 4. P. 234–248.
14. Орлова И. В., Носов А. М., Лукша В. Г., Володин В. В. Синтез экдистероидов в растениях и культурах клеток *Rhaponticum carthamoides* Willd. (Плjin) // *Физиология растений*. 1994. Т. 41, № 6. С. 907–912.

Callus Formation of Ecgysteroid Species *Silene* L. (Caryophyllaceae Juss.) in Culture *in vitro*

A. A. ERST¹, L. N. ZIBAREVA²

¹FSIS Central Siberian Botanical Garden SB RAS
630090, Novosibirsk, Zolotodolinskaya st., 101
E-mail: annaerst@yandex.ru

²Siberian Botanical Garden of TSU
634050, Tomsk, pr. Lenina, 36)
E-mail: zibareval@inbox.ru

Continuously growing callus cultures of three species of *Silene* genus – *S. linicola*, *S. aprica* and *S. frivaldszkyana* were obtained. It was shown that the genotype and type of explant influence the processes of callus. The highest growth indexes had calluses from hypocotyl – $10,1 \pm 1,4$, $11,6 \pm 3,4$ and $7,4 \pm 1,1$ (*S. linicola*, *S. aprica* and *S. frivaldszkyana* respectively).

Key words: cell culture, *Silene*, ecgysteroids, growth index.