

УДК 581.143

А.Н. АРЗУМАНЯН

ПОЛУЧЕНИЕ ИЗОЛИРОВАННОЙ КУЛЬТУРЫ ЗВЕРОБОЯ ПРОДЫРЯВЛЕННОГО (*HYPERICUM PERFORATUM* L.) И ЕЕ МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

Введено в изолированную культуру растение зверобоя продырявленного (*Hypericum perforatum* L.). Разработаны питательные среды как для роста каллусной ткани, так и для индукции процессов морфогенеза, роста растений и клонального микроразмножения. Изучена динамика накопления сырого и сухого веществ в каллусной ткани зверобоя по суткам культивирования. Дана цитологическая характеристика каллусной ткани. Определены размеры клеток и ядер.

Метод культуры тканей и органов растений, позволяющий биологическое моделирование на различных уровнях структурной и функциональной организации, является подходом к решению многих проблем фундаментального и прикладного значения. Экспериментально созданная система – клетки и ткани высших растений, выращиваемые вне организма на искусственных питательных средах, – позволяет легче и глубже изучать такие сложные процессы, как рост, клеточная дифференцировка и развитие целого организма, а также создавать принципиально новые клеточные технологии для промышленности, сельского хозяйства и медицины. В настоящее время имеется достаточно данных, свидетельствующих о возможности получения продуктов растительного происхождения с использованием изолированных тканей [1, 2]. К их числу относится и синтез *in vitro* фармакологически активных соединений [3–6].

Одним из широко используемых в медицине лекарственных растений является зверобой продырявленный (*Hypericum perforatum* L.), в надземных частях которого синтезируется богатый набор вторичных метаболитов – сапонины, антоцианы, дубильные вещества, флавоноиды и др. [7–9]. Литературные данные об изолированных культурах растений рода *Hypericum* немногочисленны [5, 10]. Поэтому становится актуальным получение изолированной культуры зверобоя и изучение условий выращивания *in vitro* для индукции в ней биосинтеза вторичных метаболитов.

Целью настоящей работы являлось введение в изолированную культуру зверобоя продырявленного местной популяции, отработка состава питательной среды, обеспечивающей оптимальный рост каллусной ткани, а

также изучение цитоморфологии и характера роста изолированной культуры.

Материал и методы исследований. Объектом исследований являлась каллусная ткань зверобоя продырявленного, полученная нами по общепринятой методике [11]. Растения зверобоя, отобранные на участке "Армянская флора" Института ботаники НАН РА, стерилизовались диацетидом в течение 15 мин., затем промывались в трех порциях стерильной воды по 20 мин. в каждой. Фрагменты листьев и стеблей, а также цветочные бутоны высаживались на агаризованную питательную среду и содержались в термальной камере при температуре 26°C в темноте.

В опытах использовались питательные среды: В-5 Гамборга, Мурасиге и Скуга (МС) [12], а также модифицированная среда МС (условно обозначенная нами как № 7) путем добавления 6-бензиламинопурина (БАП) – 1 мг/л, кинетина – 1 мг/л, α -нафтилуксусной кислоты (НУК) – 0,5 мг/л, гибберелловой кислоты (ГК) – 0,2 мг/л.

Для характеристики ростовой активности определялись сырая масса ткани в г; сухой вес в % (полученный высушиванием ткани до постоянного веса при температуре 80°C); ростовой индекс (отношение сырого веса полученного каллуса к первоначальному) [3]. Средний прирост биомассы определялся путем взвешивания сырой массы ткани из 3–4 колб.

Для цитологических исследований материал фиксировался по Карнуа в смеси спирта с уксусной кислотой (3:1). Давленные препараты готовились ацетокарминовым методом. Размеры клеток и ядер определялись с помощью окуляра- и объектмикрометров [13].

Результаты и их обсуждение. Первые признаки каллусообразования у листовых эксплантов наблюдались на 17–20 сутки на среде В-5 Гамборга. Каллус белый, рыхлый, без признаков органогенеза, скорость нарастания биомассы была очень низкой. На среде № 7 на эксплантах цветочных бутонов уже через 2 недели нарастал обильный каллус желтоватого цвета с высоким органогенным потенциалом. При переносе такого каллуса в условия освещения из него образовывались многочисленные побеги, а в основании нарастал новый каллус. Рост массы укороченных побегов длиной 1,5–2 см шел по поверхности агара, из-за чего ткань приобретала мохообразный вид (рис. 1б). Это объясняется повышенным содержанием цитокининов в среде № 7 (2 мг/л), которые снимают апикальное доминирование и стимулируют развитие пазушных почек. При переносе такого органогенного каллуса с образовавшимися укороченными побегами и почками на среду МС с пониженным содержанием цитокининов (0,2 мг/л) происходил рост растений в высоту, листья увеличивались, образовывались корни, т. е. формировались нормальные растения (рис. 1а), которые клонально размножались делением куста на фрагменты.

Однако при использовании растительных клеток в качестве продуцентов биологически активных соединений одним из условий является получение стабильного недифференцированного роста каллусной ткани, которую можно наращивать круглый год вне зависимости от сезонных изменений. Поэтому для дальнейшей работы нами был отобран каллус, полученный из цветочных бутонов, как более активно растущий. Для подавления процессов дифференциации были испытаны различные питательные среды, в которые добавлялись ауксины (ИУК, НУК, 2,4-Д). Оказалось, что только повышенные концентрации 2,4-Д подавляют рост каллуса и способствуют

побегообразованию. На среде, содержащей 0,5 мг/л 2,4-Д, образовывался каллус средней плотности, крупнозернистый, коричневого цвета с вишневым оттенком. К концу пассажа (35–40 дней) из-за выделения пигментов в среду последняя окрашивалась в темно-желтый цвет (рис. 2).

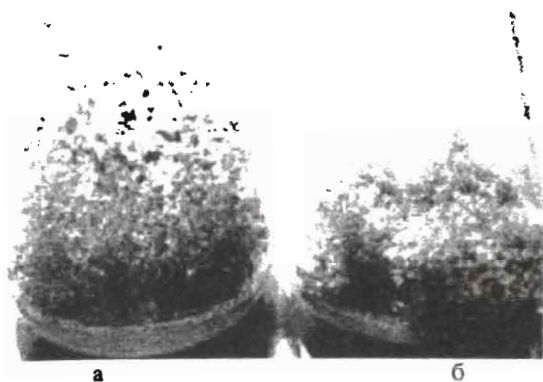


Рис. 1. Органогенез в каллусной ткани зверобоя продырявленного на средах: а – среда МС, б – среда № 7.

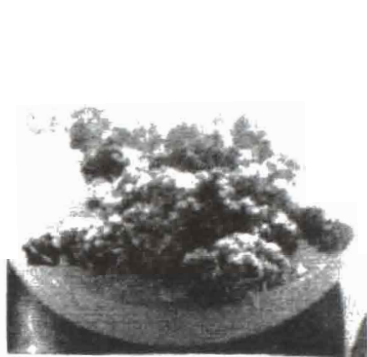


Рис. 2. Каллусная ткань зверобоя продырявленного.

Изучение динамики роста каллусной ткани зверобоя показало, что увеличение сырой массы происходит по нарастающей кривой (рис. 3). Lag-фаза длится 4–5 дней. Удвоение сырого веса наблюдается на 8 сутки культивирования, а к концу пассажа сырой вес каллуса увеличивается в 20–25 раз, после чего рост прекращается; каллусная ткань буреет и размягчается из-за сильной оводненности клеток.

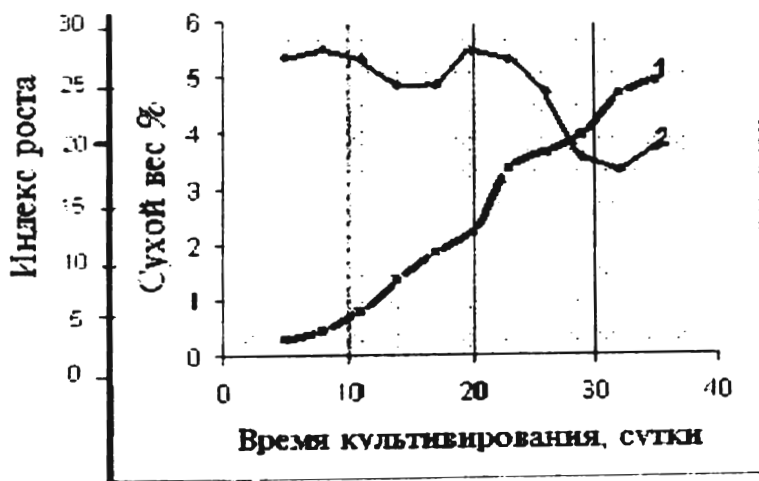


Рис. 3. Динамика сырого (1) и сухого (2) веса каллусной ткани зверобоя продырявленного.

Наблюдения за динамикой накопления сухого вещества каллусной ткани показали, что первое незначительное увеличение сухого веса приходится на 8–9 сутки, что связано, по-видимому, с началом интенсивного деления клеток (рис. 3). Второй пик увеличения сухого веса приходится на 20

сутки ее культивирования, после чего сухой вес резко снижается, хотя сырой вес продолжает увеличиваться. Вероятно, в этот период происходит растяжение клеток и их вакуолизация. К моменту наступления стационарной фазы роста (35 суток) сухой вес каллуса стабилизируется.

При введении растения в изолированную культуру и образовании каллусной ткани происходит реорганизация ее структур и функций: специализированные соматические клетки переходят в эмбрионально-активное состояние. При этом в ряде случаев наблюдается цитогенетическая нестабильность, проявляющаяся в нарушении процессов митоза, изменении структур и числа хромосом [12]. Поэтому анатомическое строение полученной нами каллусной ткани зверобоя представляло определенный интерес.

При микроскопировании каллусной ткани выявлены следующие типы клеток: меристематические, паренхимные, трахеидоподобные. Клетки меристематического типа с основной функцией деления имеют интенсивно окрашиваемые ядра (митозы, как правило, локализованы именно в таких клетках). В клетках паренхимного типа протекают специфические синтезы и происходит отложение запасных питательных веществ [14]. Ядра окрашены слабее или не видны. Трахеидоподобные элементы – гидроциты – выполняют функцию проведения воды и питательных веществ [15]. Гидроциты каллуса отличаются от водоносных анатомических элементов других типов тем, что в них сравнительно долго сохраняются клеточные ядра.

Так, в образцах каллусной ткани зверобоя, находящейся в экспоненциальной фазе роста (особенно в пробе, соответствующей пику сухих веществ), наблюдаются клетки на стадиях ранней и поздней профазы, метафазы митоза (рис. 4). В профазе ядра увеличены в размерах, отчетливо видны уже спирализованные хромосомные нити. В период метафазы хромосомы, достигнув максимальной спирализации, перемещаются к экватору клетки. Клетка уже имеет митотическое веретено. Гидроцитов немного, они встречаются в виде длинных отдельных клеток, имея на стенках одревесневшие утолщения с сетчатыми окаймленными порами.

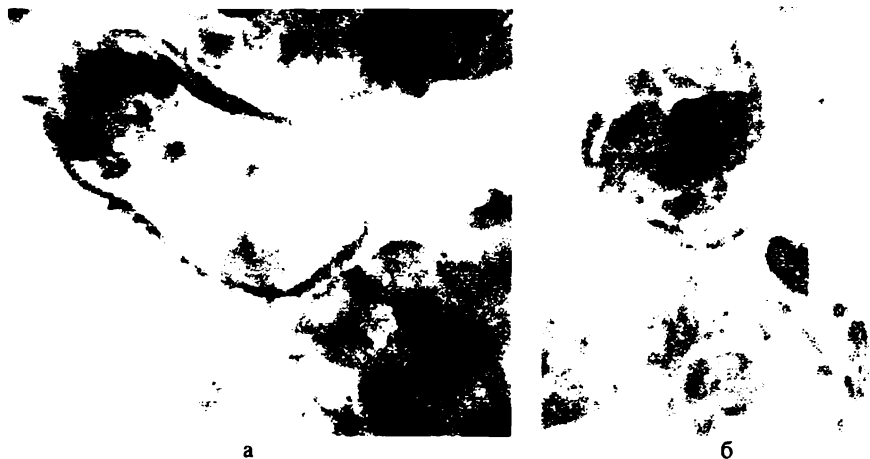


Рис. 4. Клетки каллусной ткани зверобоя продырявленного, находящиеся в стадиях метафазы (а) и профазы (б) митоза.

В клетках каллусной ткани, находящейся в стационарной фазе, ядра не видны, т. е. преобладают клетки паренхимного типа. Возрастает ко-

личество гидроцитов, встречающихся уже в виде компактных скоплений (рис. 5).



Рис. 5. Гидроциты в каллусной ткани зверобоя проросшего.

Клетки каллусной ткани имеют разнообразную форму: круглую, овальную, удлинённую. Размеры клеток варьируют $11,5-31,7 \mu$ в длину и $15,1-20,3 \mu$ в ширину. Диаметр ядер колеблется в пределах $4,3-5,8 \mu$.

Таким образом, нами получена хорошо растущая каллусная ткань зверобоя проросшего, которую можно в дальнейшем использовать в качестве потенциального продуцента биологически активных соединений.

Кафедра физиологии растений и микробиологии

Поступила 05.10.2001

ЛИТЕРАТУРА

1. Бутенко Р. Г. Биотехнология. М.: Наука, 1984.
2. Запрометов М.Н. Культура клеток растений. М.: Наука, 1981.
3. Березнеговская Л.Н. и др. Культура тканей и клеток алколондных растений. Томск: Изд-во Томского ун-та, 1975.
4. Носов А.М. – Физиология растений, 1994, т. 41, с. 873–878.
5. Butcher D.N. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Berlin, Heidelberg, N-Y, Springer-Verlag., 1977, p. 668–693.
6. Haslam E. Metabolites and metabolism: A commentary on secondary metabolism. Oxford: Clarendon press, 1985.
7. Гаммерман А.Ф. и др. Лекарственные растения. М.: Высшая школа, 1985.
8. Wagner H., Blandt S. – J. of Geriatric Psychiatry and Neurology, 1994, v. 7, Suppl.1, p. 65–68.
9. Zhenjun Diwu – Photochemistry and Photobiology, 1995, v. 61, № 6, p. 529–539.
10. Kramarova E., Horka M., Klems M., Klejdus B. – Synthetic abilities of Hypericum perforatum in vitro under stress. Abstracts of 17th International conference on plant growth substances. Brno, 2001, p.191.
11. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М.: Наука, 1964.
12. Калинин Ф.Л. и др. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев: Наукова думка, 1980.
13. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. М.: Колос, 1970.
14. Марьяхина И.Я. Культура клеток растений. Киев: Наукова думка, 1978.
15. Александров В.Г. Анатомия растений. М.: Высшая школа, 1966.

ՍՐՈՀՈՒՆԴ ԽՈՅՎԱԾԻ (*HYPERICUM PERFORATUM* L.)
ՄԵԿՈՒՍԱՑՎԱԾ ԿՈՒՆՏՈՒՐԱՅԻ ՍՏԱՑՈՒՄԸ ԵՎ ՆՐԱ
ՄՈՐՖՈՖԻԶԻՈԼՈԳԻԱԿԱՆ ԲՆՈՒԹԱԳԻՐԸ

Ամփոփում

Ստացված է սրոհունդ խոցվածի (*Hypericum perforatum* L.) մեկուսացված կուլտուրան: Մշակված են սննդամիջավայրեր ինչպես կալլուսային հյուսվածքի աճի, այնպես էլ օրգանոգենեզի, բույսերի աճի և կլոնալ միկրո-բազմացման գործընթացների ինդուկցիայի համար: Ուսումնասիրված է սրոհունդի կալլուսային հյուսվածքի չոր և թաց քաշերի կուտակման դինամիկան աճեցման ընթացքում: Տրված է կալլուսային հյուսվածքի բջջաբանական բնութագիրը, որոշված են բջիջների և կորիզների չափսերը:

A.N.ARZUMANIAN

OBTAINING OF ISOLATED CULTURE OF ST. JOHN'S WORT
(*HYPERICUM PERFORATUM* L.) AND ITS MORPHOPHYSIOLOGICAL
CHARACTERISTIC

Summary

The plant of St. John worth *Hypericum perforatum* L. was introduced into the isolated culture. The nutrient media both for callus tissue growth and for induction of processes of morphogenesis, plant growth and clonal micro-propagation were elaborated. Dynamics of the accumulation of raw and dry matters in callus tissue during cultivation as well as the cytological characteristic of callus tissue were studied. The cell and nucleus dimensions were defined.