

*Биология*

УДК 581.3–581.4

Н. Ж. СААКЯН, М. Т. ПЕТРОСЯН, Дж. А. АГАДЖАНЫН

ОПТИМИЗАЦИЯ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ ВЫРАЩИВАНИЯ  
КУЛЬТУР *A. GENEVENSIS* L. И *A. CHIA* SCHREB.

Изучено влияние различных гормональных веществ на ростовую активность каллусных культур *A. genevensis* L. и *A. chia* Schreb. с учетом коэффициентов регрессии как для каждого отдельно взятого гормонального фактора, так и для взаимодействия различных факторов.

**Введение.** Преимуществом использования культур *in vitro* является возможность контроля и целенаправленного изменения их метаболизма. Неотселектированные дедифференцированные клетки накапливают небольшое, по сравнению с интактным растением, количество метаболитов. Неоднократные попытки различных исследователей определить для многих культур оптимальные условия накопления интересующих продуктов были неудачными. И только благодаря правильно разработанной стратегии можно получить культуры тканей с оптимальным уровнем ростовой активности и метаболизма [1].

Хотя более эффективной регуляцией метаболизма является экспериментальный мутагенез, воздействие условий культивирования также часто приводит к генетической гетерогенности – соматической изменчивости [2–4], на чем основана селекция высокопродуктивных штаммов [5].

Регулирование процессов метаболизма зависит от изменения факторов культивирования, влияющих на рост и биосинтетическую активность клеток [6–9]. Подбор физических и химических условий культивирования, несмотря на их простоту, может явиться эффективным подходом для повышения продуктивности культуры. Поэтому мы сочли целесообразным проведение исследований по выявлению влияния гормональных факторов, входящих в состав питательных сред, на ростовую и биосинтетическую активность изолированных культур *A. genevensis* и *A. chia*, т.к. данные растения обладают довольно высокой метаболической активностью [10, 11].

**Методы исследования.** Для изучения влияния различных фитогормонов на рост каллусных тканей *A. genevensis* L. и *A. chia* Schreb. был применен метод математического планирования эксперимента, который позволяет одновременно изучить большое число факторов, действующих в системе, и

оценить как действие каждого фактора, так и межфакторные взаимодействия [12]. Опыты ставились по матрице полного факторного эксперимента ПФЭ-2<sup>5</sup> (табл. 1). Изучалось влияние следующих гормональных факторов: ИУК, НУК, БАП, кинетин и 2,4-Д.

Таблица 1

Гормональные факторы	Минимальная концентрация, мг/л	Максимальная концентрация, мг/л
ИУК (X <sub>1</sub> )	0,1	2,0
НУК (X <sub>2</sub> )	0,5	2,0
БАП (X <sub>3</sub> )	0,1	2,0
Кинетин (X <sub>4</sub> )	0,2	2,0
2,4-Д (X <sub>5</sub> )	0,5	2,0

Об интенсивности ростовых процессов судили по следующим показателям: сырой вес ткани в граммах, сухой вес в %. Степень зависимости роста культур от эффекта совместного взаимодействия фитогормонов оценивалась по критерию Стьюдента [12].

Изначально обе культуры живучки были получены на питательной среде Мурасиге–Скуга. Стабильный рост каллусных культур обоих видов поддерживался как на исходной питательной среде, так и на ее модификациях с различным составом фитогормонов. Необходимость установки оптимального состава фитогормонов в питательной среде обусловила более детальное изучение влияния как отдельных гормональных факторов, так и их сочетаний и различных концентраций. Нами был использован метод математического планирования эксперимента [12, 13], в основе которого лежит реализация всех возможных комбинаций исследуемых факторов, каждый из которых проверяют одновременно и независимо друг от друга на двух уровнях – минимальном и максимальном (см. табл. 1).

**Результаты и обсуждение.** В табл. 2 приведены результаты опытов по изучению влияния гормональных факторов на накопление биомассы каллусных тканей *A. genevensis* и значения коэффициентов регрессии.

Как видно из табл. 2, максимальные концентрации каждого отдельного фактора на фоне минимальных концентраций остальных оказывают ингибирующее влияние на рост каллусной ткани *A. genevensis* – коэффициенты регрессии, соответствующие факторам X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, имеют отрицательное значение. Только максимальная концентрация ИУК на фоне минимальных концентраций остальных факторов оказывает стимулирующее действие –  $b_1$  для X<sub>1</sub> положительный.

Однако положительное влияние повышенной концентрации ИУК на рост каллусной ткани снимается добавлением любого другого отдельного фактора –  $b_i$  для X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>, X<sub>1</sub>X<sub>3</sub>, X<sub>1</sub>X<sub>4</sub>, X<sub>1</sub>X<sub>5</sub> отрицательные.

Анализ взаимодействия различных гормональных факторов выявил положительное влияние на рост каллусной ткани совместного присутствия в среде ИУК, НУК и БАП; НУК, БАП и кинетина; НУК и 2,4-Д; ИУК, НУК и

2,4-Д; БАП и 2,4-Д; ИУК, БАП и 2,4-Д; кинетина и 2,4-Д; БАП, кинетина и 2,4-Д –  $b_i$  для  $X_1X_2X_3$ ,  $X_2X_3X_4$ ,  $X_2X_5$ ,  $X_1X_2X_5$ ,  $X_3X_5$ ,  $X_1X_3X_5$ ,  $X_4X_5$  положительные.

Таблица 2

Номер варианта	Вес сырой ткани ( $\bar{y}$ ), $\bar{z}$	Коэффициент регрессии ( $b_i$ )	Сухие вещества, %	Комбинация фитогормонов в макс. концентрациях
1	1,1	8,93	4	контроль
2	3	1,13	9,7	$X_1$
3	1,47	-0,73	8,2	$X_2$
4	1,78	-0,66	5,6	$X_1X_2$
5	2,3	-1,13	6,9	$X_3$
6	2,4	-0,29	5,1	$X_1X_3$
7	1,3	0,01	6,0	$X_2X_3$
8	1,9	0,625	5,8	$X_1X_2X_3$
9	2,1	-0,93	5,1	$X_4$
10	2,07	-0,14	5,0	$X_1X_4$
11	2,8	-0,165	4,5	$X_2X_4$
12	2,4	0,194	4,8	$X_1X_2X_4$
13	2,3	0,086	5,1	$X_3X_4$
14	1,52	-0,16	5,9	$X_1X_3X_4$
15	1,73	0,54	5,1	$X_2X_3X_4$
16	2,0	-0,74	7,6	$X_1X_2X_3X_4$
17	2,3	-0,237	7,0	$X_5$
18	2,2	-0,58	5,6	$X_1X_5$
19	1,27	0,71	7,4	$X_2X_5$
20	1,6	0,51	6,1	$X_1X_2X_5$
21	2,8	0,867	5,5	$X_3X_5$
22	1,7	0,552	6,7	$X_1X_3X_5$
23	1,6	-0,358	6,7	$X_2X_3X_5$
24	2,2	-1,01	5,2	$X_1X_2X_3X_5$
25	2,1	0,91	5,3	$X_4X_5$
26	1,17	-0,04	8,1	$X_1X_4X_5$
27	2,3	-0,2	5,8	$X_2X_4X_5$
28	2,2	-0,21	5,7	$X_1X_2X_4X_5$
29	2,0	0,22	6,1	$X_3X_4X_5$
30	2,8	-0,33	4,6	$X_1X_3X_4X_5$
31	2,08	-1,36	6,3	$X_2X_3X_4X_5$
32	1,17	-0,38	7,5	$X_1X_2X_3X_4X_5$

Примечание:  $b_i > t_{0,95} \cdot S\{b_i\} = 0,19$ , где  $S\{b_i\}$  – ошибка определения  $b_i$  в эксперименте.

Отрицательное влияние совместного действия ИУК и НУК или ИУК и БАП снимается добавлением в среду или БАП (в первом случае), или НУК (во втором случае) – коэффициент регрессии, соответствующий факторным взаимодействиям  $X_1X_2X_3$ , имеет положительное значение. Совместное же присутствие в среде НУК и БАП, БАП и кинетина не способствует усилению накопления биомассы –  $b_i$  для  $X_2X_3$ ,  $X_3X_4$ ,  $X_1X_2X_4$  незначимы. Стимулирующее действие ИУК, НУК и БАП снимается добавлением кинетина –  $b_i$  для  $X_1X_2X_3X_4$  отрицательный, а наличие в среде полного набора фитогормонов в максимальной концентрации резко тормозит рост каллусной ткани – коэффициент регрессии, соответствующий этому варианту, имеет отрицательное значение.

Обобщая вышесказанное, можно сделать вывод, что превышение общей концентрации ауксинов над цитокининами приводит к повышению выхода биомассы – коэффициенты регрессии, соответствующие вариантам 8, 19, 20, 22, положительные.

Таблица 3

Номер варианта	Вес сырой ткани ( $\bar{y}$ ), $z$	Коэффициент регрессии ( $b_i$ )	Сухие вещества, %	Комбинация фитогормонов в макс. концентрациях
1	11,00	8,09	4,5	контроль
2	7,06	-0,6	2,7	X <sub>1</sub>
3	5,41	-0,61	2,2	X <sub>2</sub>
4	4,01	0,15	2,05	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>
5	11,09	0,05	4,7	X <sub>3</sub>
6	11,07	0,21	4,6	X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>
7	6,10	-0,23	2,8	X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>
8	6,01	0,24	2,3	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>
9	9,07	0,06	3,6	X <sub>4</sub>
10	9,20	-0,12	3,9	X <sub>1</sub> X <sub>4</sub>
11	14,13	0,55	5,2	X <sub>2</sub> X <sub>4</sub>
12	6,03	-0,32	2,01	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>4</sub>
13	9,31	-0,46	3,5	X <sub>3</sub> X <sub>4</sub>
14	6,55	0,33	3,2	X <sub>1</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub>
15	6,11	0,10	2,1	X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub>
16	8,13	-0,09	3,2	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub>
17	7,51	-0,03	3,1	X <sub>5</sub>
18	7,46	0,15	3,0	X <sub>1</sub> X <sub>5</sub>
19	3,48	-0,04	1,9	X <sub>2</sub> X <sub>5</sub>
20	4,12	0,51	2,1	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>5</sub>
21	10,11	0,13	4,1	X <sub>3</sub> X <sub>5</sub>
22	4,55	-0,12	2,2	X <sub>1</sub> X <sub>3</sub> X <sub>5</sub>
23	4,20	-0,10	2,1	X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>5</sub>
24	7,12	-0,25	3,2	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>5</sub>
25	6,54	-0,11	2,9	X <sub>4</sub> X <sub>5</sub>
26	2,36	-0,13	1,8	X <sub>1</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub>
27	7,09	-0,18	3,1	X <sub>2</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub>
28	6,58	-0,13	2,9	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub>
29	6,34	0,25	2,8	X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub>
30	9,16	0,17	3,7	X <sub>1</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub>
31	6,17	-0,28	2,7	X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub>
32	2,24	-0,75	1,7	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub>

Примечание:  $b_i > t_{0,95} \cdot S\{b_i\} = 0,28$ .

При рассмотрении данных по накоплению сухих веществ по всем вариантам опыта не выявлено никакой зависимости между весом сырой биомассы и содержанием в ней сухих веществ. Наибольшее накопление сухих веществ наблюдается в вариантах 2, 3, 16, 17, 19, 26, 32. Можно отметить только, что превышение общего содержания ауксинов над цитокининами в большинстве случаев проявляет стимулирующее действие на содержание сухих веществ.

Каждый вид растения нуждается в индивидуальном подходе при его введении в изолированную культуру. Поэтому простое перенесение условий

культивирования, разработанных для одного вида, на другие виды или даже подвиды растений неэффективно. Мы сочли целесообразным изучить влияние гормональных факторов на рост каллусных тканей обоих изучаемых нами видов живучки. В табл. 3 приведены результаты опытов по изучению такого влияния на накопление биомассы *A. chia* и значения коэффициентов регрессии.

Данные табл. 3 показывают, что максимальная концентрация каждого отдельного фактора на фоне минимальных концентраций остальных оказывает либо ингибирующее влияние (коэффициенты регрессии, соответствующие факторам  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_5$ , отрицательные), либо не способствует усилению роста ткани *A. chia* – рост остается на уровне контроля,  $b_i$  для  $X_3$ ,  $X_4$  незначимы.

При анализе взаимодействия гормональных факторов выявилось положительное влияние на рост ткани совместного присутствия в среде НУК и кинетина –  $b_i$  для  $X_2X_4$  положительный. Антагонистические отношения наблюдаются между БАП и кинетином –  $b_i$  для  $X_3X_4$  отрицательный. Благоприятное влияние взаимного действия НУК и кинетина снимается добавлением в среду ИУК –  $b_i$  для  $X_1X_2X_4$  отрицательный. Стимулирующее влияние оказывает взаимодействие фитогормонов ИУК, НУК и 2,4-Д –  $b_i$  для  $X_1X_2X_5$  положительный.

Взаимное действие ИУК и НУК, ИУК и 2,4-Д, БАП и 2,4-Д не имеет особого стимулирующего воздействия на ростовую активность каллусной ткани *A. chia* –  $b_i$  для  $X_1X_2$ ,  $X_1X_5$ ,  $X_3X_5$  незначимы. Наличие в среде полного набора гормональных факторов в максимальной концентрации тормозит рост каллусной ткани *A. chia* –  $b_i$  для  $X_1X_2X_3X_4X_5$  отрицательный, как и в случае предыдущей культуры.

Суммируя вышесказанное, можно отметить, что ростовая активность изучаемой каллусной ткани *A. chia* зависит не только от общего количества ауксинов или цитокининов, но большое значение имеет и определенный вид того или иного гормонального фактора. Как в эксперименте с культурой *A. genevensis*, так и с *A. chia* не выявлено никакой закономерности между накоплением сырой биомассы и содержанием в ней сухих веществ по всем вариантам опытов. Наибольшее содержание сухих веществ для *A. chia* наблюдалось в вариантах 5, 6, 11, 21. Заметим только, что превышение общего количества ауксинов над цитокининами не оказывает особого стимулирующего действия на накопление сухих веществ, как это наблюдалось у каллусной культуры *A. genevensis*, а полный набор фитогормонов в среде и вовсе ингибирует накопление сухих веществ – наименьшее их содержание отмечалось в варианте 32.

Таким образом, рост изолированных тканей *A. genevensis* и *A. chia* зависит не только от наличия того или иного гормонального соединения, но и от количественного соотношения ауксинов и цитокининов в питательной среде.

Кафедра микробиологии, биотехнологии  
микроорганизмов и растений

Поступила 30.10.2009

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Филиппова В. Особенности вторичного метаболизма в культурах растительных клеток. 2001. <http://www.komisc.ru>
2. Кунах В.А. Биополимеры и клетка, 1997, т. 13, с. 362–371.

3. **D'Amato F.** Cytogenetics of differentiation in tissue and cell cultures. Plant Cell, Tissue and Organ. Culture. Ed. J. Reinert & Y.P.S. Bajaj, Berlin, Heidelberg and New York: Springer-Verlag, 1977, p. 343–357.
4. **Кунах В.А.** Тканевые и клеточные культуры в селекции растений (под ред. Турбина Н.А. и др.). М.: Колос, 1979, с. 38–51.
5. **Глеба Ю.Ю., Сытник К.М.** Клеточная инженерия растений. Киев: Наукова думка, 1984, 159 с.
6. **Арзумян А.Н.** Получение изолированных культур некоторых видов рода *Hypericum* и их биосинтетическая активность: Автореф. дисс. на соискание уч. ст. канд. биол. наук. Ер., 2003, 22 с.
7. **Щербакова Е.Н.** Рост культивируемых *in vitro* тканей герани и ириса и биосинтез в них эфирных масел: Автореф. дисс. на соискание уч. ст. канд. биол. наук. Ин-т ботаники АН. Арм. ССР. Ер., 1985, 24 с.
8. **Мкртумян М.К.** Образование антрахинонов в каллусной культуре и генетически трансформированных корнях марены красильной (*Rubia tinctorum* L.): Автореф. дисс. на соискание уч. ст. канд. биол. наук. Ер., 1999, 17 с.
9. **Губарь С.И., Гулько Т.П., Кунах В.А.** Физиология растений. М.: Наука, 1977, т. 44, № 1, с. 97–103.
10. **Соколов П.Ф.** Растительные ресурсы СССР. Цветковые растения, их химический состав, использование. Л.: Наука, 1974, 402 с.
11. **Золотницкая С.Я.** Лекарственные ресурсы флоры Армении. Т.2. Ер.: Изд-во Акад. наук Арм. ССР, 1965, с. 222–223.
12. **Максимов В.Н., Федоров В.Д.** Применение методов математического планирования эксперимента при отыскании оптимальных условий культивирования. М.: Изд-во МГУ, 1969, 128 с.
13. **Максимов В.Н.** Многофакторный эксперимент в биологии. М.: Изд-во МГУ, 1980, 280 с.

Ն. Ժ. ՍԱՀԱԿՅԱՆ, Մ. Թ. ՊԵՏՐՈՍՅԱՆ, Ջ. Ա. ԱԳԱՋԱՆՅԱՆ

*A. GENEVENSIS* L. ԵՎ *A. CHIA* SCHREB. ԿՈՒՆՏՈՒՐԱՆԵՐԻ ԱՃԵՑՄԱՆ  
ՀԱՍՏԱՐ ՕԳՏԱԳՈՐԾՎՈՂ ՄՆՆԴԱՄԻՋԱՎԱՅՐԵՐԻ ԿԱԶՄԻ  
ՕՊՏԻՄԱԼԱՑՈՒՄԸ

Ամփոփում

Ուսումնասիրվել է տարբեր հորմոնային նյութերի ազդեցությունը *A. genevensis* L. և *A. chia* Schreb. կալուսային կուլտուրաների աճման ակտիվության վրա: Հաշվի է առնվել ռեգրեսիայի գործակիցները ինչպես յուրաքանչյուր առանձին վերցրած հորմոնալ գործոնի, այնպես էլ տարբեր գործոնների փոխազդեցության համար:

N. Zh. SAHAKYAN, M. T. PETROSYAN, J. A. AGHAJANYAN

OPTIMIZATION OF NUTRIENT MEDIA FOR GROWING  
*A. GENEVENSIS* L. AND *A. CHIA* SCHREB. CULTURES

Summary

The influence of hormonal substances on growing activity of callus cultures of *A. genevensis* L. and *A. chia* Schreb. was studied with the registration of regression coefficient for each separate hormonal factor, as well as for the cooperation of different factors.