

Յ. Վ. ՄԱՐՇԱՎԻՆԱ, Օ. Գ. ՇԵՎՐՈՒԿ, Ե. Ն. ՇԵՐԲԱԿՈՎԱ,
Յ. Տ. ՏՈՆԻԿՅԱՆ, Օ. Ն. ՅԱՐԳԱՐՅԱՆ

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ ТКАНЕЙ ГЕРАНИ (PELARGONIUM ROSEUM) И ИРИСА (IRIS SIBIRICA)

Получено 5 клонов каллусных тканей из стебля, листа и корня герани и ириса. Подобран состав оптимальной среды для культивирования каллусной ткани герани и ириса. Определено количество посевного материала и агара, обеспечивающее быстрый рост культуры. Показана возможность культивирования клеточных суспензий герани и ириса в жидких аэрируемых средах.

Метод выращивания культуры изолированных растительных тканей на искусственной питательной среде начал интенсивно развиваться в начале 30-ых годов, открыв широкие возможности для биологических исследований в самых различных направлениях [7].

Выращивание изолированных культур связано с использованием их в качестве моделей для изучения морфологии клеточных структур и биохимических процессов в условиях, наиболее близких к естественным [1, 2]. Прикладное значение применения культуры изолированных тканей состоит в использовании ее в генетико-селекционной работе для получения новых сортов и форм растений, получения гибридных растений при отдаленных скрещиваниях, а также для оздоровления посадочного материала, пораженного вирусной инфекцией.

В последнее время большой интерес вызывает возможность выращивания изолированных тканей и клеток растений, подобно микроорганизмам, в условиях погруженной культуры в ферментерах. Накопленные данные свидетельствуют о том, что изолированные растительные ткани и клетки способны синтезировать специфические метаболиты, такие, как алкалоиды, гормоны, эфирные масла и другие, недоступные химическому и микробному синтезу вещества [3—5, 8—11]. Таким образом, чрезвычайно важным и интересным представляется использование культуры изолированных тканей и клеток растений в качестве нового потенциального источника для получения биомассы и практически ценных веществ.

Особый интерес в этом отношении вызывает возможность получения эфирных масел в условиях, не связанных с вегетацией растений. Эти соображения и послужили основанием для избрания в качестве объектов изучения розовую герань и ирис, эфирные масла которых имеют большое практическое значение. Учитывая то, что в мировом каталоге культур растительных тканей не имелось избранных нами растений, целью настоящей работы, начатой в 1971 г., явилось получение каллусных тканей из различных органов (лист, стебель, корень) герани и ири-

са. Трудность заключалась в том, что семена обоих растений обладают очень низкой всхожестью, а зачастую являются просто нежизнеспособными. В задачу исследования входила также отработка состава оптимальной питательной среды для культивирования каллусных тканей и выяснение возможности получения клеточных суспензий в условиях жидких аэрируемых сред.

Материал и методика. Стерилизованные и обработанные определенным образом для ускорения прорастания семена герани и ириса помещались в широкие пробирки на стерильную агаризованную питательную среду. Небольшие кусочки отдельных частей проросших растений (листья, стебли, корни) были высажены в чашки Петри на твердую питательную среду, а через неделю пересажены в 100 мл конические колбы на ту же среду. Колбы помещались в термостат при температуре 26—28° для культивирования каллуса.

Для получения каллуса из вегетирующего растения герани ткани последнего стерилизовались диоксидом (раствор этанолртутихлорида и цетилпиридиний хлорида в воде) в концентрации 0,1%. Время выдержки варьировалось в зависимости от сорта ткани. Обработанные таким способом кусочки тканей были посажены в чашки Петри на агаризованную питательную среду, затем пересажены в пробирки для дальнейшего культивирования. Температура инкубации поддерживалась в пределах 26—28°.

В состав питательных сред для культур растительных тканей и клеток (в отличие от культуральных сред для микроорганизмов), кроме неорганических солей, углеводов и органического азота, входили микроэлементы, витамины и гормоны роста.

Результаты исследований. В соответствии с поставленными задачами при подборе оптимальной питательной среды для культивирования культуры тканей герани было испытано 10 вариантов сред, различающихся набором и соотношением минеральных солей, количеством витаминов и гормонов роста. Оказалось, что наиболее эффективной средой, индуцирующей рост каллуса герани, является среда В-5, рекомендованная для культуры растительных тканей и клеток Гамборгом [9], несколько модифицированная и названная нами МВ-5 (табл. 1).

Каллус из тканей ириса также удалось индуцировать на указанной среде, однако скорость его роста была значительно ниже, чем у герани. Поэтому подбор оптимальной среды для выращивания каллусной и суспензионной культур ириса продолжается.

По внешнему виду каллусы герани и ириса существенно различались. Каллусная ткань герани была рыхлой консистенции и имела молочно-желтоватый цвет в отличие от каллуса ириса, ткань которого имела ярко желтую окраску и была более компактной по структуре (рис. 1, 2).

Микроскопирование каллусной культуры герани показало, что при оптимальных условиях культивирования размеры клеток ее колеблются по длинной оси от 60 до 300 мкр, а по короткой — от 40 до 200 мкр, что говорит в основном об овальной форме клеток. Размер ядра меняется в пределах 10—30 м, при этом ядерно-плазменное соотношение составляет 0,008—0,01 в зависимости от количества пассажей культуры [6].

Как было установлено опытами, на рост каллусных тканей заметное влияние оказывает количество агара в среде. Испытание различных кон-

Таблица 1

Состав оптимальной среды культуры ткани герани

Компоненты среды	Количество, мг/л	Компоненты среды	Количество, мг/л
Соли по Гамборгу		Микроэлементы по Штоку	
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	150	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250	CuSO_4	0,25
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	134	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	10,0
KNO_3	2500	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3,0
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	150	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,25
		H_3BO_3	3,0
		KJ	0,75
Сахароза	20 г/л	Хелат железа*	5 мл/л
Витамины по Штоку		Ростовые факторы	
Тиамин HCl	10	Кинетин	0,2
Пиридоксин HCl	1	АНУ	0,1
Никотиновая кислота	1	2,4-Д	1,0
Инозитол	100	Гидролизат казеина**	2,0 г/л

* Хелат железа приготовлен по Бутенко: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 557 мг и хелатон 3Na_2 ЭДТА—745 мг на 100 мл бидистиллята.

** Caseinhydrolysat (pankreatisch). Made in Germany. E. Merck. Ac. Darmstadt.

концентраций агара (от 0,4% до 1%) показало, что оптимальное содержание его в среде для культивирования культуры ткани герани составляет 0,7—0,8% от веса среды. Представленные в табл. 2 данные являются средними из 15 определений.

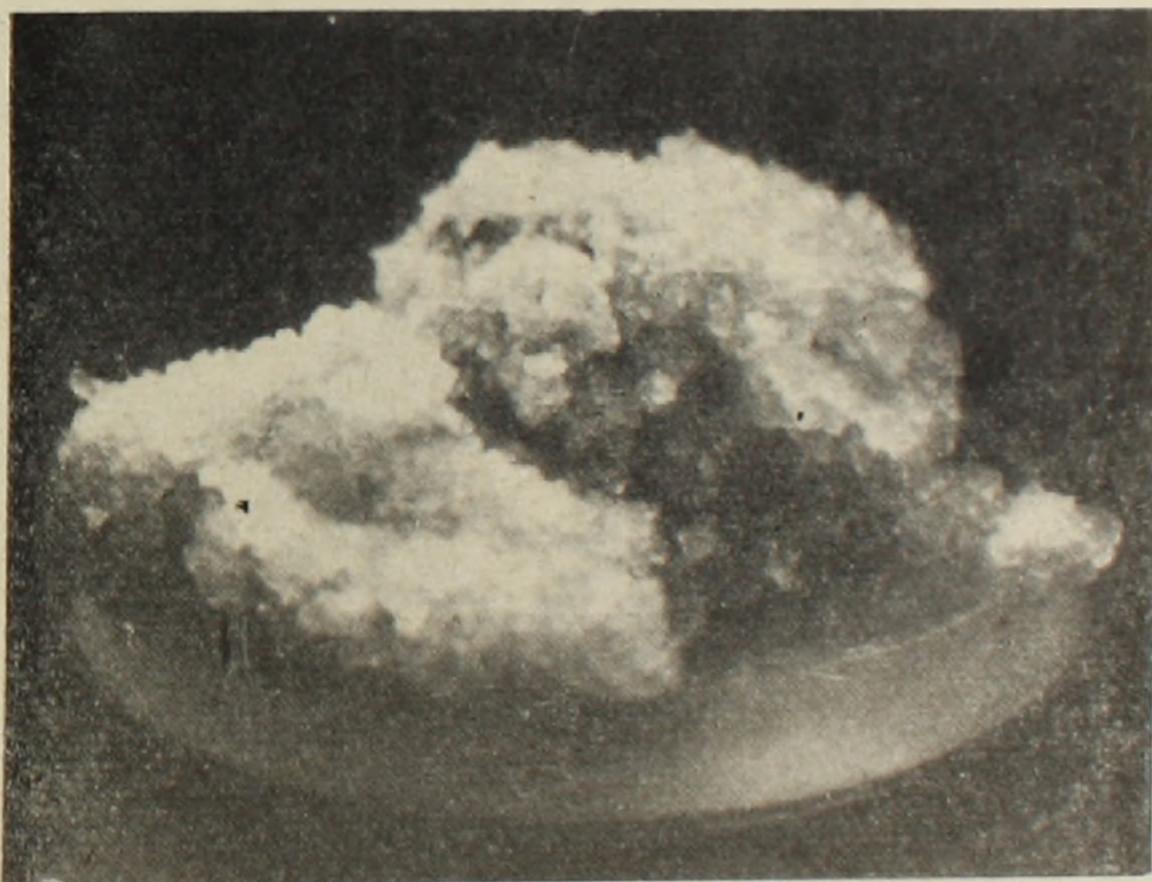


Рис. 1. Каллусная ткань герани на 30-е сутки культивирования.

При индуцировании культуры тканей и клеток на искусственных средах большое значение имеет также количество посевного материала [13].

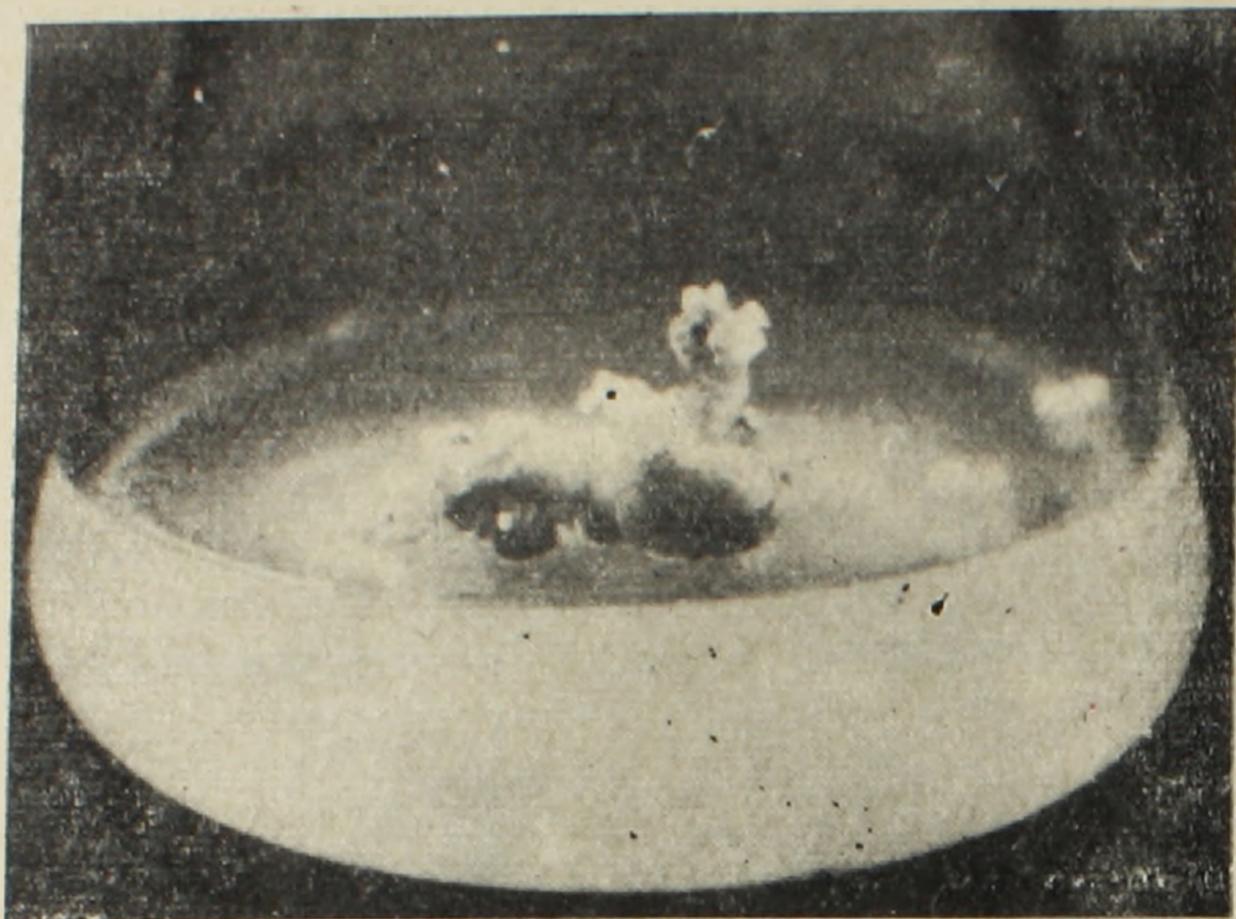


Рис. 2. Каллусная ткань герани на 30-е сутки культивирования.

Таблица 2

Влияние количества агара в питательной среде на рост каллусной ткани герани (на 20-й день культивирования)

Количество агара в питательной среде, ‰	Прирост сырого веса полученного каллуса, г	Индекс роста**	Индекс эффективности роста***
0,4	1,245	5	100
0,5	6,260	10,4	208
0,6	6,705	13,5	270
0,7	9,620	16	320
0,8	9,690	15,3	306
0,9	8,040	15,0	300

* Работа проводилась на агаре «Disco».

** Отношение сырого веса полученного каллуса к первоначальному.

*** Индекс роста, умноженный на число дней культивирования.

Опыты, проведенные нами с внесением различных количеств посевного материала (от 500 до 900 мг на 40 мл агаризованной среды), показали, что оптимальное количество посевного материала для обеспечения нормального и быстрого роста каллусной ткани герани составляет 250—300 мг (табл. 3).

С целью изучения возможностей культивирования каллусной ткани этих культур в жидких средах нами были проведены опыты в колбах с 30 и 50 мл среды того же состава на качалках со скоростью перемешивания 60—80 об/мин, в темноте, при температуре 28°. Кусочки каллусной ткани с агаризованной среды стерильно переносились в конические колбы емкостью 250 мл и культивировались в течение 20—30 дней.

Результаты опыта свидетельствуют о росте растительных клеток в условиях жидких аэрируемых сред (рис. 3).

Таким образом, в лаборатории клеточного биосинтеза с 1971 г. начаты работы по изучению культуры изолированных тканей розовой гера-

Таблица 3
Влияние количества посевного материала на рост каллусной ткани герани (на 20-й день культивирования)

Сырой вес посевного материала, мг	Сырой вес полученного каллуса, мг	Индекс роста	Индекс эффективности роста
50	560	11	226
110	1,225	11	220
145	2,986	20	400
215	2,480	11,5	230
255	6,325	25	500
330	8,355	25	500
350	5,925	17	340
420	6,658	16	320
440	7,645	17,5	350
501	6,407	13	260
561	2,017	3,6	72
600	5,555	9,3	186
700	7,432	10,6	212
875	6,518	7,5	150

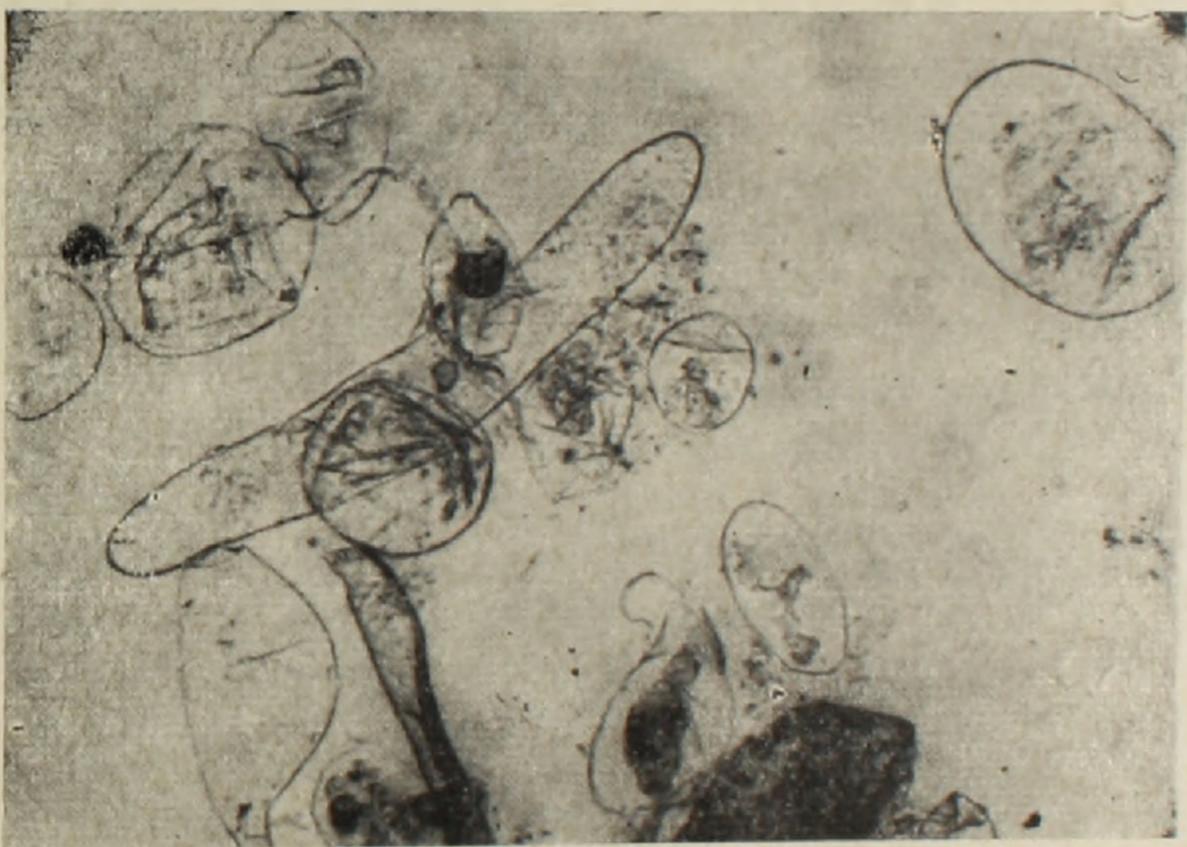
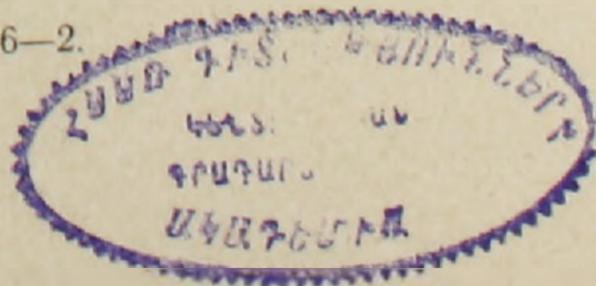


Рис. 3. Клетки суспензионной культуры герани в жидкой аэрируемой среде на 7-й день культивирования.

ни и ириса: получено 5 клонов каллусных тканей этих культур и подобраны оптимальные условия для их культивирования на твердой агаризованной и в жидкой аэрируемой средах.

Институт микробиологии
АН АрмССР

Поступило 10.1 1973 г.



Չ. Վ. ՄԱՐՇԱՎԻՆԱ, Օ. Գ. ՍԵՎՐՅՈՒԿ, Ե. Ն. ՇԵՐԲԱԿՈՎԱ,
Է. Ս. ՏՈՆԻԿՅԱՆ, Հ. Ն. ՉԱՐԿԱՐՅԱՆ

PELARGODIUM ROSEUM ԽՈՐԳԵՆՈՒ ԵՎ IRIS SIBIRICA
ՀԻՐԻԿԻ ՄԵԿՈՒՍԱՑՎԱԾ ՀՅՈՒՍՎԱԾՔՆԵՐԻ ԿՈՒՆԻՍԿԱՑՈՒՄԸ

Ա մ փ ո փ ու մ

Առաջին անգամ Հայկական ՍՍՀ ԳԱ միկրոբիոլոգիայի ինստիտուտի բջջային բիոսինթեզի լաբորատորիայում խորդենու և հիրիկի ցողունից, տերեկից ու արմատից ստացվել են կալյուսային հյուսվածքների 5 կլոններ: Հետքվել է խորդենու կալյուսային հյուսվածքի կուլտիվացման համար օպտիմալ միջավայրի բաղադրությունը: Որոշվել է ցանքսանյութի քանակը: Ցույց է տրվել խորդենու բջջային սուսպենզիաների կուլտիվացման հնարավորությունը աերացման ենթարկվող հեղուկ միջավայրերում:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Бутенко Р. Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. 1964.
2. Бутенко Р. Г. Сб. Ин-та физиологии растений АН СССР, 1968.
3. Воллосович А. Т. Тр. I Всесоюзн. конф. 22—26 января 1968, 1970.
4. Воллосович А. Т., Бутенко Р. Г. Тр. I Всесоюзн. конф. 22—26 января 1968, 1970.
5. Слепян Л. И. Тр. I Всесоюзн. конф. 22—26 января 1968, 1970.
6. Шамина З. Б., Бутенко Р. Г., Тарасов В. А. Генетика, 1, 1966.
7. Уайт Ф. Р. Культура растительных тканей. 1949.
8. Beker H. Archiv der Pharmacie, 303, 12, 1969.
9. Gamborg O. L. Can. J. Biochem. 45, 1967.
10. Gamborg O. L., Miller R. A., Kao K. N., Steck W., Grambow H. J. Abstracts VI Intern. Ferment. Symposium. Kyoto, Japan, 19—25 March, 1972.
11. Suono K., Furuya T. Plant and cell Physiol. 9, 1968.