

10 Бишимбаева Н.К. Цитофизиологические основы биотехнологии длительной регенерации растений в культуре тканей зерновых злаков /Автореф. дисс. на соиск. уч. ст. док. биол. наук., Алматы, 2007. – 38 с.

11 Murashige T., Scoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.*, 1962. – V.15, №13. – P. 473-497.

12 Головацкая И.Ф., Карначук Р.А. Практикум по физиологии растений. Ростовые вещества. Учеб. пособие. – Томск, 1995. – 113 с.

13 Arjon J. van Hengel, Zewdie Tadesse, Peter Immerzeel, Henk Schols, Ab van Kammen, and Sacco C. de Vries. N-Acetylglucosamine and Clucosamine-Containing Arabinogalactan Proteins Control Somatic Embryogenesis // *Plant Physiol.*, 2001. – V. 125. – P. 1880-1890.

14 Cammue B.E., De Bolle M.F., Schoots H.M., Terras F.R., Osborn R.W. Gene-encoded antimicrobial peptides from plants // *Cuba Found Symp.* 186. – 1994. – P 91-101.

15 Matsubayashi Y., Sakagami, Y. Phytosulfokine, sulfated peptides that induce the proliferation of single mesophyll cells of *Asparagus officinalis* L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996. – V. 93. – P. 7623-7627.

16 Stirn S., Mordhorst A. P., Fuchs S., Lorz H. Molecular and biochemical markers for embryogenic potential and regenerative capacity of barley (*Hordeum vulgare* L.) cell cultures // *Plant Science*, 1995. – V. 106. - P. 195-206.

#### Резюме

Выявлена антиауксиновая активность экстрацеллюлярных гидрофильных (ГФЛ) и гидрофобных (ГФБ) белковых фракций, выделенных из суспензии клеток пшеницы, особенно наибольшую антиауксиновую активность показала ГФБ фракция. Цитокининподобный эффект выявлен у ГФЛ фракции белков. Выявлена способность внеклеточных ГФБ белков повышать всхожесть семян горчицы в условиях стресса (0,5% NaCl). Ауксиноподобная активность экстрацеллюлярных ГФЛ и ГФБ фракций не обнаружено.

#### Summary

Antiauxin activity extracellular hydrophilic (HPL) and hydrophobic (HPB) protein fractions isolated from wheat cell suspension have been revealed. Especially HPB fraction has more antiauxin activity. revealed Cytokinin like effect of HPL protein fraction have been showed. Ability of extracellular HPB fraction to stimulate the germination of mustard seeds in stress conditions (0,5 % NaCl) have been revealed. Auxin like activity of extracellular HPL and HPB fractions haven't revealed.

УДК582.473:57.086.833

Андреева А.П.

### ВЛИЯНИЕ ГИДРОЛИЗАТА КАЗЕИНА НА ПРОДУКТИВНОСТЬ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ АНАБАЗИНА В УСЛОВИЯХ *in vitro*

(Карагандинский государственный медицинский университет, г. Караганда, Казахстан)

Для получения штамма-продуцента анабазина в культуре клеток *Anabasis aphylla* L. (*A. aphylla* L.) важную роль играют факторы химической природы, такие как органические добавки- гидролизат казеина (источник лизина) и витамины группы В. Для оптимизации условий культивирования предложена математическая модель для многофакторного эксперимента "Нетрадиционный метод построения многомерных моделей на ПЭВМ по программе ANETR 21".

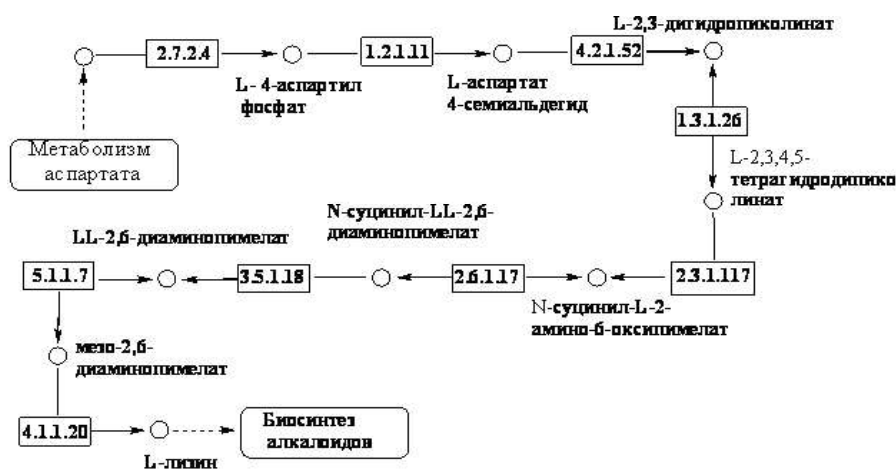
Цель проведенного исследования, оценить степень влияния органических добавок на биосинтез анабазина в культуре клеток *A. aphylla* L. в условиях *in vitro*.

Анабазис безлистный (*Anabasis aphylla* L.), является единственным источником нового антирихофитозного препарата "Антилишай", разработанного на основе пиперидинового алкалоида - анабазин. Анабазин обладает ярко выраженной избирательной противрихофитийной активностью. Препарат прошел клинические испытания и показал эффективность в лечении грибковых заболеваний молодняка крупного рогатого скота. Разработка технологического регламента биотехнологического производства анабазина в условиях *in vitro* позволит заложить основу для создания сырьевой базы препарата «Антилишай».

Культура клеток анабазиса, является источником алкалоида анабазин [1]. Биосинтез и накопление продукта зависит от степени вторичной дифференцировки каллусной ткани и наличия в составе питательной среды ряда промежуточных продуктов метаболизма анабазина: лизина и витаминов группы В. Известно, что процесс биосинтеза алкалоидов начинается с появления в культуре морфогенных структур ответственных за вторичный метаболизм. Первые этапы метаболизма анабазина начинаются с аспартата, затем образуется промежуточный продукт L-лизин. Реакция превращения L-4-аспартилфосфата в L-аспаратат 4-семиальдегид идет с участием аспаратсемиальдегиддегидрогеназы, коферментом является рибофлавин [2,3]. Образование конечного продукта метаболизма алкалоида анабазин зависит от количества лизина – исходного продукта реакции (Рисунок 1).

Важное биологическое значение лизина было открыто Drechsel (1889) он сформировал гипотезу, что концентрация лизина оказывает существенное изменение в биохимических процессах живых организмов [4]. Недостаток лизина в растительных клетках сопровождается низкой продуктивностью биохимических превращений. Гипотеза Drechsel получила убедительное подтверждение в работах В.Л.Кретовича и сотр. (1958-

1997)[5,6]. Развивая исследования в этом направлении, сотрудники лаборатории убедительно показали, что биосинтез лизина высшими растениями осуществляется через диаминопимелиновую кислоту, которая включена в цикл метаболизма аспартата. Таким образом, лизин, является незаменимой аминокислотой в процессе биосинтеза вторичных метаболитов в культуре клеток анабазиса.



- 2.7.2.4- Аспарат киназа
- 1.2.1.11- Аспаратсемивальдегид дегидрогеназа
- 4.2.1.52- Дигидропиколилат синтеза
- 1.3.1.26- Дигидропиколилат редуктаза
- 2.3.1.117- Тетрагидропиколилат сукцинилаза
- 2.6.1.17- Сукцинилдиаминопимелат аминотрансфераза
- 3.5.1.18- Сукцинил-диаминопимелат десукцинилаза
- 5.1.1.7- Диаминопимелинат эпимераза
- 4.1.1.20- Диаминопимелинат декарбоксилаза

Рисунок 1 - Биосинтез лизина

Обращает на себя внимание тот факт, что все вышеперечисленные вещества (диаминопимелиновая кислота, аспарат, лизин) являются физиологическими метаболитами растительной клетки, но в процессе дедифференцировки могут быть утрачены, для этого важно правильно сформировать алгоритм и условия культивирования.

Было высказано предположение, что для получения штамма-продуцента анабазина в культуре клеток анабазиса важную роль играют факторы химической природы, такие как органические добавки- гидролизат казеина (источник лизина) и витамины группы В. Для оптимизации условий культивирования предложена математическая модель для многофакторного эксперимента “Нетрадиционный метод построения многомерных моделей на ПЭВМ по программе ANETR 21” [7,8].

Цель проведенного исследования, оценить степень влияния органических добавок на биосинтез анабазина в культуре клеток *Anabasis aphylla* L. в условиях *in vitro*.

#### Материалы и методы

Для получения первичной культуры клеток анабазиса был использован семенной материал, полученный на опытном поле Юго-Западного НИИ сельского хозяйства г. Шимкент (Казахстан). Проращивание семенного материала проводили на питательной среде Мурасиге и Скуга (далее М-С).

Оптимальные концентрации макросолевого состава в питательной среде М-С:  $KNO_3$  - 3800 мг/л,  $NH_4NO_3$  - 1600 мг/л и  $KH_2PO_4$  - 340 мг/л. Фитогормональный баланс 2,4Д- 2,15 мг/л, кинетин 1,75 м/л.

Результаты по изучению и подбору оптимальных условий культивирования *A. aphylla* показали, что для культивирования в условиях *in vitro* наиболее пригоден гипокотиль стерильных проростков. В экспериментах по оптимизации концентрации органических добавок питательной среды использован математический метод “Нетрадиционный метод построения многомерных моделей на ПЭВМ по программе ANETR 21” разработанный проф. М.А. Ермаковым. Для выращивания растительных клеток *A. aphylla* использован двухэтапный режим культивирования. На первом этапе происходит накопление каллусной массы, а второй этап культивирования продолжается на продуцирующей среде, что позволяет сдвинуть вектор культивирования в сторону биосинтеза анабазина.

#### Результаты и их обсуждение

Большинство тканей, культивируемых *in vitro*, способны к синтезу всех нужных для жизнедеятельности витаминов, но их количества недостаточно для выполнения метаболических функций. Поэтому дополнительное внесение витаминов в питательную среду стимулирует рост тканей и биосинтез вторичных метаболитов.

Витамины необходимы для физиологических процессов растительных клеток в условиях *in vitro*. Культивируемая ткань на среде с витаминами становится более плотной, компактной, напоминая характером рост нормальную ткань интактного растения.

Мезо-инозит, устойчив к действию света и обладает термостойкостью. Активирует рост клеток и индуцирует появление почек камбием у древесных пород. Мезо-инозит содержится в так называемой нейтральной фракции кокосового молока, которая сама по себе не стимулирует роста растительной ткани, но значительно усиливает действие активной фракции.

Глицин - имеет белковую природу, и является основным компонентом для построения всех структурных элементов клетки. То обстоятельство, что ферменты также являются веществами белковой природы, позволяет рассматривать глицин как функциональный элемент клетки.

Планирование и анализ экспериментов по влиянию органических добавок также проводились по рекомендуемой матрице рационального планирования для 25 опытов в диапазоне концентраций.

Результаты по оптимизации условий культивирования показали, что витамины мало влияют на рост культуры каллусной ткани (витамина В<sub>1</sub> - 1 мг/л (РИ=105,3%), гидролизат казеина 2,0 мг/л (РИ=108,9%)) но являются важным компонентом питательной среды для биосинтеза анабазина. Наряду с оптимальными концентрациями макро-и микроэлементов в питательной среде витамины группы В является ко-фактором аспараткиназы ключевого фермента синтеза лизина деривата анабазина.

Отсутствие витамина В<sub>6</sub> значительно снижает влияние витамина В<sub>1</sub> на рост каллусной ткани *A.aphylla*. Влияние гидролизат казеина на увеличение синтеза анабазина показывает, что данное вещество, является важным фактором активизирующим биосинтез анабазина (гидролизат казеина- 1 мг/л количество анабазина составляло 0,8 на 100 мг.сух.веса). Максимальный ростовой индекс был получен при содержании *мезо-инозита* - 500 мг/л (РИ=109,7%).

Данные, полученные при анализе результатов этого эксперимента, показывают, что по силе влияния, оказываемого на рост биомассы, аргументы расположились в следующем порядке: мезо-инозит средне квадратичное отклонение (СКО) от среднего-92,5 %; тиамин-НСI СКО-82,7%; гидролизат казеина СКО-72,3; пиридоксин-НСI СКО-64,8 и глицин СКО - 62%. Существенное влияние на накопление анабазина, в исследованном диапазоне концентраций, оказал только глицин. Остальные компоненты не оказывали существенного влияния на содержание искомого продукта.

Полученные нами результаты имеют важное практическое значение для использования культуры клеток анабазиса безлистного как источника алкалоида анабазин в производстве высокоэффективного антигрибкового препарата.

Принимая во внимание две функции (ростовой индекс, биосинтез анабазина), которые выступают в роли главных критериев оценки влияния органических добавок, хотелось бы заметить, что по степени активности и необходимости, рассматриваемые добавки имеют разное значение. Концентрация гидролизата казеина варьирует в широких пределах, наибольший ростовой индекс 108.9% в 18-ом ряду математической матрицы при концентрации 2,5 мг/л. Уровень анабазина достигает значение 0,8 на 100 мг.сух.веса каллусов при концентрации гидролизата казеина 1,0 и 2,5 мг/л. Таким образом, культивирование растительных клеток *Anabasis aphylla* L. на агаризованной питательной среде М-С с добавлением гидролизата казеина, достоверно не увеличивает синтез и накопление алкалоида анабазин.

#### Литературы

- 1 Газалиев А.М., Журинов М.Ж., Фазылов С.Д. Новые биоактивные производные алкалоидов// Алма-Ата, 1992. -125с.
- 2 Садыков А.С. Химия алкалоидов *Anabasis aphylla*//Ташкент, 1950.-160с.
- 3 Насыров С.Х., Хазбиевич И.С. Фармакология алкалоидов *Anabasis aphylla*// Ташкент, 1982.-160 с.
- 4 Лиетиньш Г.К., Дунце М.Э., Сырье и питательные субстраты для промышленной биотехнологии. - Рига: -Знание, -1986.- 156 с.
- 5 Кретович В.Л. Биохимия растений. -М, -изд-во "Высшая школа", -1980. 445 с.
- 6 Кретович В.Л. Усвоение и метаболизм азота у растений. -М., -изд-во "Наука", -1987. 542 с.
- 7 Ермеков М.А., Махов А.А. Статистико-детерминированный метод построения многомерных моделей с использованием ЭВМ.//Караганда, 1988. 57 с.
- 8 Ермеков М.А., Махов А.А. Нетрадиционный метод построения многомерных моделей на ПЭВМ по программе ANETR98.//Караганда.:КарПТИ, 1998. 20 с.

#### Summary

For shtamma-producer reception anabasin in culture of cages *Anabasis aphylla* the important role is played by factors of the chemical nature, such as organic additives - гидролизат ка-зеина (a source lizin) and vitamins of group of В. For of optimisation of conditions kultivirova-nija the mathematical model for multi-fact experiment "is offered Netradi-tсионnyj a method of construction of multidimensional models on ПЭВМ under program ANETR 21".

The purpose of the carried out research to estimate degree of influence of organic additives on bio-synthesis anabasin in culture of cages *Anabasis aphylla* L. In conditions in vitro.

Асанова Д.К.

## ИНДУКЦИЯ КАЛЛУСОГЕНЕЗА В КУЛЬТУРЕ ЗРЕЛЫХ ЗАРОДЫШЕЙ ЛУГОПАСТБИЩНЫХ РАСТЕНИЙ

(Казахский национальный университет имени аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан)

*В данной работе представлены результаты исследования индукции процесса каллусогенеза в культуре зрелых зародышей некоторых видов лугопастбищных трав. По степени отзывчивости к процессу образования каллуса отобраны 4 генотипа и разработаны оптимальные методики их культивирования.*

В последние десятилетия наблюдается устойчивая тенденция к деградации пастбищных угодий в результате загрязнения почв, сокращения площадей обводненных пастбищ, изъятия земель под промышленные объекты, полигоны и населенные пункты. Во многих странах для восстановления загрязненных почв успешно используются фитотехнологии, при этом одним из наиболее важных аспектов является подбор растений, способных расти на загрязненных почвах и при этом накапливать стойкие ксенобиотики в значительном количестве [1, 2, 3].

Для очистки загрязненных почв можно использовать лугопастбищные растения. Ранее было выявлено, что ряд лугопастбищных трав, таких как ломкоколосник, житняк, тимофеевка, терескен и другие близкородственные виды, обладают устойчивостью к различным абиотическим и биотическим факторам, что сочетается с высокой кумулятивной активностью [4]. Использование подобных растений для создания улучшенных форм с помощью методов биотехнологии является одним из эффективных направлений восстановления загрязненных земель и обуславливает актуальность данного исследования.

В связи с вышеизложенным, несомненный интерес представляют исследования по созданию эффективного способа получения улучшенных форм растений, с помощью которых можно обеспечить процесс восстановления загрязненных земель. Цель настоящего исследования - индукция каллусогенеза в культуре *in vitro* лугопастбищных растений и отбор отзывчивых генотипов.

### Материалы и методы

Объектом исследования служили 5 видов кормовых трав:

Житняк пустынный, Ломкоколосник ситниковый, Тимофеевка луговая, Костер безостый, Донник белый. Отбор видов растений проведен по показателям устойчивости, урожайности, возможностей к сорбции, основанных на морфологических особенностях корневой системы, и перспектив использования в качестве компонентов травосмесей для улучшения кормовых характеристик пастбищ [5].

Для культивирования *in vitro* использовалась питательная среда Мурасиге и Скуга с добавлением фитогормонов: 2,4-Дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д) – 2 мг/л и кинетин – 0,1 мг/л.

Стерилизация растительного материала проводилась по модифицированному нами методу.

Для определения оптимальных режимов и сроков холодной предобработки, повышения дедифференцирующей способности соматических клеток и повышения выхода морфогенных структур семена подвергали воздействию холодом 5, 10, 15 дней при температурах 4, 7, 10°C.

Для подбора оптимальных условий для индукции и роста каллусов проведен эксперимент с использованием трех фитогормонов: 2,4-Д, кинетин, БАП, на трех уровнях (2-4Д - 2мг/л, 4 мг/л, 6 мг/л; кинетин – 0,1 мг/л, 0,5 мг/л, 1,0 мг/л; БАП – 0,1 мг/л; 0,2 мг/л, 0,5 мг/л). Для проведения статистической обработки результатов использовали стандартные методики.

Поскольку способность к каллусогенезу в пределах целого вида очень сильно варьирует, в дальнейшем изложении нами будет употребляться термин «генотип», так как в экспериментах использован конкретный растительный материал, и данные, полученные в наших опытах, являются достоверными только в пределах изучаемого биологического материала, но не целого вида

### Результаты и их обсуждение

Эффективность культивирования в условиях *in vitro* в значительной степени зависит от генотипа исходного материала. Однако она может быть достигнута также и правильным выбором питательной среды и условий культивирования. В нашей работе ставилась задача изучить влияние состава различных питательных сред на индукцию каллусообразования в культуре зрелых зародышей лугопастбищных трав.

Исследования по культуре ткани свидетельствуют о положительном влиянии непродолжительной предобработки донорных растений низкими положительными температурами на процесс каллусогенеза. Оптимальное значение температуры и ее продолжительность значительно варьируют в зависимости от