

УДК 602.6:581.4:633.91

С.К.Турашева*, К.К.Богуспаев, Д.Г.Фалеев, Амангул, А.Ускенбаева
 Казахский национальный университет им.аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан
 *e-mail: Svetlana.turasheva@kaznu.kz

Скрининг морфогенетической способности дикорастущих видов тау-сагыза (*Scorzonera tau-saghyz Lipschits et Bosse*)

Обсуждаются результаты скрининга морфогенетической и регенерационной способности дикорастущих видов тау-сагыза. Выявлена оптимальная питательная среда для индукции процессов каллусогенеза и регенерации. Подобраны условия стратификации и предобработки семенного материала для повышения всхожести семян дикорастущих форм тау-сагыза.

Ключевые слова: тау-сагыз *Scorzonera tau-saghyz*, морфогенез, регенерация

S.K.Turasheva, K.K.Boguspaev, D.G.Faleev, Amangul, A.Uskenbaeva

Screening of morphogenetic ability of wild species Tau-saghyz (*Scorzonera tau-saghyz Lipschits et Bosse*)

The results of screening of morphogenetical and regeneration ability of wild species Tau-saghyz have been discussed. It was presented optimal medium for induction regeneration and callus formation. The conditions of stratification and pretreatment seed materials for increasing growth of wild type's seeds of tau-saghyz were studied.

Keywords: Tau-saghyz *Scorzonera tau-saghyz*, morphogenesis, regeneration

С.К.Турашева, К.К.Богуспаев, Д.Г.Фалеев, Амангул, А.Ускенбаева

Тау-сагыз (*Scorzonera tau-saghyz Lipschits et Bosse*) жабайы өсімдігінің морфогенетикалық және регенерациялық қабілеттері бойынша скрининг

Мақалада тау-сагыз жабайы өсімдігінің морфогенетикалық және регенерациялық қабілеттері бойынша скрининг нәтижелері талқылануда. Морфогенез бен регенерацияны ынталандыру үшін оптималды коректік орта анықталған. Тау-сагыз дәндерінің өну қабілетін арттыру үшін дәндерді өңдеу және стратификация жағдайлары тандалынған.

Түйін сөздер: тау-сагыз *Scorzonera tau-saghyz*, морфогенез, регенерация

Высшие растения являются незаменимым источником получения широкого спектра вторичных метаболитов, имеющих применение в фармакологии, пищевой промышленности, легкой и тяжелой промышленности, в технике. Одним из практически значимых метаболитов являются изопреноиды. В частности, в результате каскада реакций с участием изопреноидов в клетках некоторых растений синтезируется каучук, широко применяемый при производстве латекса и резины в технике, медицине, автоиндустрии. Количество видов растений-продуцентов каучука (каучуконосов) с каждым годом уменьшается вследствие техногенного воздействия человека на окружающую среду в целом и на растительные ресурсы в частности. Однако решить эту проблему возможно, если использовать в качестве альтернативы не целые интактные растения, а культуру клеток растений. Содержание практически важных вторичных метаболитов в высших растениях определяется активностью их синтеза, эффективностью транспорта и депонирования в органах запаса растения. Все эти признаки определяются генетически, находятся под контролем развития организма и максимально реализуются в оптимальных внешних условиях. Известно, что клетки растений, культивируемые в искусственных условиях сохраняют способность к синтезу искомым, целевым метаболитов. Благодаря правильно разработанной стратегии получения высокопроизводительных штаммов к настоящему времени получены культуры тканей, в которых содержание вторичных продуктов достаточно велико, чтобы служить исходным сырьем.

В клеточных культурах при длительном культивировании снижается или совсем теряется способность клеток накапливать соединения вторичного метаболизма из-за возникновения малоактивных, но более жизнеспособных вариантов. Снижение биосинтетического потенциала в культуре *in vitro* происходит из-за подавления дифференциации клеток и их специализации, т.е. в результате потери способности к реализации генетической информации, относящейся ко вторичному обмену [1, 2].

Однако, подбор физических и химических условий культивирования является наиболее простым и часто применяемым подходом для повышения продуктивности. В основе физиологического

регулирования процессов вторичного синтеза лежит изучение влияния факторов культивирования на рост и метаболизм клеток.

В культивировании растений каучуконосов, количество вырабатываемого продукта (каучука) зависит в первую очередь от физиологического состояния растений. Растения должны иметь высокую потенциальную возможность выработки основного продукта и должны быть гомогенны настолько это возможно [1-4]. Первая плантация каучуконосов (*Hevea brasiliensis*) была организована в Юго-Восточной Азии с 1890 до 1930 гг., где были использованы семена различного происхождения [3]. Разнородность исходного материала и трудности получения больших количеств семян известного происхождения вдохновили исследователей на поиск путей вегетативного размножения каучуковых растений. Для получения гомогенных линий элитных деревьев гевеи в 1983 году был впервые применен метод культивирования *in vitro* [4]. Использование этого метода решило проблемы, связанные с гомогенным материалом, и отбором растений с высоким содержанием каучука. В результате проведенных экспериментов было показано, что полученные в культуре *in vitro* растения по содержанию каучука не отличались от природных каучуконосных деревьев [3-5].

В климатических условиях Южного Казахстана в предгорных районах Каратау на щебнисто-каменистых гребнях и плато произрастает полукустарниковое каучуконосное растение тау-сагыз (*Scorzonera tau-saghyz*, семейство Compositae, род *Scorzonera*). Этот полукустарник содержит в своих корнях до 40% (в среднем 18-20%) высококачественного каучука [6]. Тау-сагыз в естественных условиях гор Каратау размножается преимущественно вегетативным способом (корнеотпрыскового порядка) и реже семенами. Каучукопродуцирующая способность этого эндемика немного уступает всемирноизвестному каучуконосному древесному растению гевеи, однако при разработке технологии клонирования и масштабного культивирования тау-сагыза выход каучука будет сопоставим с выходом целевого продукта, получаемого из гевеи.

Для масштабного культивирования тау-сагыза необходимо ввести в культуру *in vitro* немногочисленные дикие виды эндемика и подобрать оптимальные условия культивирования, при которых коэффициент размножения и каучукопродуцирующая способность достигнут максимального уровня. В связи с этим, целью первого этапа исследований являлось определение морфогенетической способности дикорастущих форм каучуконосного эндемика тау-сагыза.

Материалы и методы

Исходным растительным материалом являлись семена и образцы дикорастущих растений, собранные в начале весенней вегетации в районе Каратауского государственного природного заповедника (ГПЗ), расположенного на территории Южно-Казахстанской области. Экспланты были выделены из коротких толстых подземных стеблей (каудексов), которые оканчивались одной или несколькими розетками линейных листьев. В условиях *in vitro* корневые и листовые экспланты двух разновидностей трехлетнего дикорастущего тау-сагыза были изолированы на модифицированные питательные среды Мурасиге-Скуга и Гамборга В5.

Для получения асептических проростков были использованы семена трехлетних дикорастущих растений тау-сагыза *Scorzonera tau-saghyz*. Семена дикорастущих форм тау-сагыза имеют очень низкую всхожесть, многие из них невыполненные и поражены грибковыми заболеваниями. Вследствие этого, для получения стерильных проростков тау-сагыза и улучшения всхожести семян их необходимо стратифицировать. Для проведения стратификации семена выдерживали 1,5–2 месяца при температуре $4\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Семена после стратификации, предобработки 0.1% раствором тиомочевины и стерилизации в 25% растворе гипохлорида натрия были высажены в мадженты на безгормональную питательную среду Мурасиге-Скуга. Экспозицию семян в растворе тиомочевины проводили в течение 10 мин. и 15 мин. Для каждого из вариантов предобработки отбирались по 25 семян, эксперимент проводился в трех повторностях.

Экспланты культивировали на свету при 16-часовом фотопериоде, при интенсивности освещения 5 тыс.лк., при температуре $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. Полученные морфогенные каллусы субкультивировали на среде для регенерации (питательная среда Мурасиге-Скуга с 1.5 мг/л ИУК и 2 мг/л БАП).

Результаты и их обсуждение

Проведение успешных исследований по разработке технологии микроклонального размножения растения тау-сагыз невозможно без всестороннего изучения качества семенного материала, который

необходим, как для получения стерильных проростков и эксплантов в лабораторных условиях, так и для постановок вегетационных опытов в природных условиях на опытных участках.

Известно, что семена тау-сагыза имеют невысокую всхожесть. Исследование качества семенного материала, в частности таких показателей как масса, размер и т.д. позволили выявить наряду с качественными семенами большое количество семян непригодных для проращивания, т.к. большое количество семян были повреждены насекомыми вредителями либо фитопатогенами или оказались незрелыми. Так, порядка 10,0 % семян *Scorzonera tau-saghyz* были повреждены различными вредителями, 10,2 % - оказались незрелыми, непригодными для посева. 50,5 % собранных семян тау-сагыза имели низкие морфометрические показатели и были непригодны для посева. С целью повышения всхожести семян дикорастущих форм было предложено провести предварительную обработку 0,1% раствором тиомочевины. Экспозицию семян в растворе тиомочевины проводили в течение 10 мин. и 15 мин (таблица 1).

Таблица 1 – Процент всхожести семян дикорастущих форм тау-сагыза в результате предобработки 0,1% тиомочевинной

Процент всхожести семян, %		
Контроль (без обработки 0,1% тиомочевинной)	Предобработка 0,1% раствором тиомочевины	
	10 мин.	15 мин.
0	23±5,47	31±11,94

Как видно из данных таблицы семена дикорастущих форм тау-сагыза не прорастали без предварительной предобработки тиомочевинной (контрольный вариант), однако простерилизованные семена набухали на питательной среде, но вскоре вследствие прорастания спор эндогенной микрофлоры заражались и погибали. При предобработке простерилизованных семян в течение 10 мин. 0,1% раствором тиомочевины 23% семян прорастали, а при увеличении экспозиции до 15 мин. количество проросших семян увеличивалось в 1,3 раза. Таким образом, 0,1% раствор тиомочевины обладает помимо стимулирующего действия также и стерилизующим действием, проявляющимся при использовании с гипохлоридом натрия (предполагается, что уровень проницаемости такого низкомолекулярного органического соединения как тиомочевина выше, соответственно проникая в глубоко лежащие ткани семени усиливается эффект стерилизующего агента). В течение 3-4 недель семена тау-сагыза прорастали на безгормональной среде Мурасиге-Скуга с образованием стерильных проростков.



Рисунок 1 – Получение асептических проростков на безгормональной питательной среде Мурасиге-Скуга и выращивание проростков в почвосмеси

Часть стерильных проростков была использована для изолирования листовых и корневых сегментов, микрочленкования, а часть была пересажена в почвосмесь (рисунок 1). Следующим этапом исследований была оптимизация метода микроклонального размножения тау-сагыза. Микроклональное размножение *in vitro* основано на способности цитокининов снимать апикальное доминирование и вызывать адвентивное побегообразование. Использование данного подхода позволяет значительно увеличить коэффициент размножения и при этом сохранять все основные хозяйственно-ценные признаки исходного генотипа. Важно подобрать оптимальную питательную

среду, содержащую регуляторы роста, стимулирующие закладку дополнительных почек. По истечении 3 недель культивирования листовых эксплантов на средах, содержащих 2 мг/л НУК и 0,5 мг/л БАП наблюдалось образование светло-коричневого каллуса, питательная среда также имела коричневатый оттенок, вследствие выделения экзогенных секретов (экссудатов). В дальнейшем рост таких каллусов постепенно снижался. Минеральный состав среды Гамборга В5 не обеспечивал в полной мере процессы роста и развития культивируемых тканей тау-сагыза. Пассирование их на свежие среды также не приводило к увеличению каллусной биомассы. По-видимому, ланцетовидные с восковым налетом узкоспециализированные листья ксероморфного типа менее отзывчивы к процессам дедифференциации в условиях *in vitro*.

Культивирование эксплантов на средах с тем же количеством фитогормонов, но с заменой НУК на 2,4-Д также не влияло на рост каллусных клеток. Наиболее оптимальным оказался вариант среды МС, с низким содержанием ауксинов (0,1 мг/л НУК) и высокой концентрацией БАП (1 мг/л). На этом варианте при слабом освещении было отмечено появление морфогенного каллуса (таблица 2).

Таблица 2 – Частота каллусогенеза в культуре листовых эксплантов тау-сагыза, %

Эксплант	Концентрация БАП (мг/л)	Концентрация НУК, 2,4-Д* (мг/л)	Частота каллусогенеза, %
Листовые экспланты (проксимальная часть листа)	1,0	0,1	31,6±5,07
	0,5	0,1	24,0±4,66
	1,0	0,1*	9,0±1,56
	0,5	0,1*	2,96±2,47
Черешок	1,0	0,1	30±4,96
	0,5	0,1	14,6±2,37

Таким образом, преобладание фитогормона цитокининового типа действия (БАП) способствует каллусообразованию в культуре клеток проксимальной части листа. Слабое освещение (рассеянный свет) также стимулирует пролиферацию каллусных клеток. Однако рассеянный свет также стимулирует и синтез эндогенных секретов, выделяемых в питательную среду, что требует частого пассирования на свежую питательную среду, а также времени и средств.

С целью увеличения выхода каллусов экспланты также культивировались на модифицированных средах Мурасиге-Скуга и Гамборга В5, содержащих 1мг/л 6-БАП, 0,1мг/л ИУК, 0,5мг/л ГК (таблица 3, рисунок 2).

Частота каллусогенеза в культуре листовых эксплантов тау-сагыза на среде Гамборга В5 и Мурасиге-Скуга была на относительно одинаковом уровне (в пределах 33-28%, соответственно), однако образование растений-регенерантов из морфогенных каллусов происходило только на модифицированной среде Мурасиге-Скуга.

В культуре корневых эксплантов модифицированный минеральный и гормональный состав среды Гамборга В5 стимулировал процессы дедифференциации более интенсивнее, чем состав среды МС. Следует заметить, что регенерации в культуре корневых эксплантов не наблюдалось ни на одном из исследованных вариантов питательной среды.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что на эффективность культивирования *in vitro* оказывают влияние физиологическое состояние эксплантов и состав питательной среды. Ткани корней однолетних растений тау сагыза более отзывчивы к морфогенезу, чем корни двухлетнего тау сагыза. Ксероморфные листья двухлетнего тау сагыза являясь высокодифференцированными (высокоспециализированными) слабо отзывчивы к процессам дедифференциации в условиях *in vitro*.

Таблица 3 – Частота каллусогенеза и регенерации на модифицированных питательных средах Гамборга В5 и МС

Эксплант	Модифицированная питательная среда Гамборга В5		Модифицированная питательная среда Мурасиге-Скуга (МС)	
	Частота каллусогенеза (%)	Частота регенерации (%)	Частота каллусогенеза (%)	Частота регенерации (%)
Листья	33± 3,7	0	28,3± 2,2	0,34
Корни	30± 6,5	0	22,2± 2,6	0

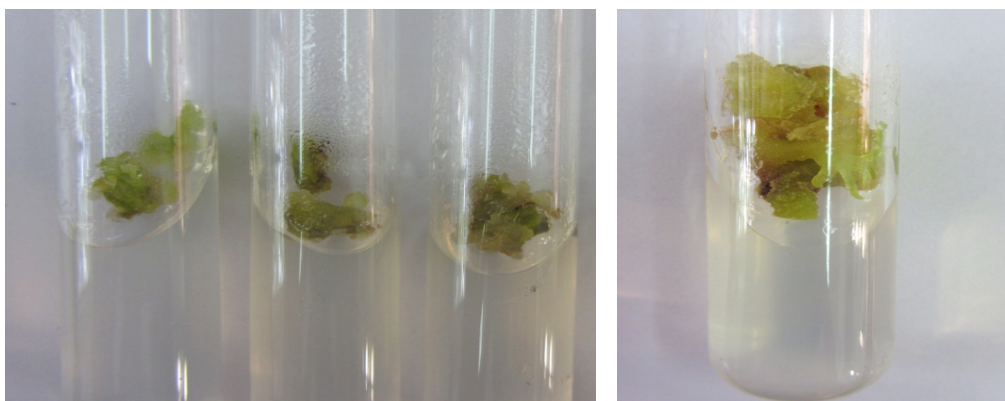


Рисунок 2 – Каллусогенез на модифицированной питательной среде МС

В целом, оптимальной питательной средой для индукции морфогенеза в культуре листовых и корневых эксплантов являлась среда Мурасиге-Скуга, содержащая 1 мг/л БАП, 0,1 мг/л НУК, 0,1 мг/л 2,4-Д. Для увеличения всхожести семян при получении стерильных проростков *in vitro* необходимо предварительно проводить стратификацию и обработку семян 0,1% тиомочевинной в течение 15 минут. Простерилизованные и обработанные тиомочевинной семена, культивируемые на безгормональной питательной среде МС дают хорошо развитые стерильные проростки.

Литература

- 1 Кузовкина И.Н., Чернышова Т.П., Альтерман И.Е. Характеристика штамма каллусной ткани руты душистой (*Ruta graveolens*), продуцирующей рутакридон // Физиол. растений, 1979. Т. 26. № 3. С. 429-500.
- 2 Кунах В.А. Изменчивость растительного генома в процессе дедифференцировки и каллусообразования *in vitro* // Физиол. растений, 1999. Т. 46. № 6. С. 919-929.
- 3 Carron, M.P. L'embryogenese somatique de l' *Hevea brasiliensis* (KUNTH) MULL-ARG : une technique de multiplication vegetative au service de l'amelioration genetique. //These de Universite des Sciences et Techniques du Languedoc, 1982. P. 167.
- 4 Dibi, K., Boko, C., Obouayeba, S., Gnagne, M., Dea G.B., Carron, M.P. and Anno, A.P. Field growth and rubber yield of *in vitro* micropropagated plants of clones PR 107, IRCA 18 and RRIM 600 of *Hevea brasiliensis* (Muell.-Arg.) //Agriculture and biology journal of north america 2010. P.1291-1298
- 5 Omo-Ikerodah E. E. , Omokhafa K. O., Akpobome F. A. and Mokwunye M. U. Review. An overview of the potentials of natural rubber (*Hevea brasiliensis*) engineering for the production of valuable proteins // African Journal of Biotechnology. - 2009. - Vol. 8 (25).- P. 7303-7307.
- 6 Липшиц С.Ю., Боссе Г.Г. Новый каучуконос Казахстана - *Scorzonera tau-saghyz Lipschits et Bosse*. // Физиология растений. №4. – С. 18-22.

УДК 602.68:57.083.3.616.097:579.842.14

А.М. Turgimbayeva*^{1,2}, G.K. Kaukabayeva¹, G.A. Bakirova¹, G.Zh. Segizbayeva²

¹National Center for Biotechnology, Astana, Kazakhstan

²L.N. Gumilyov Eurasian National University, Astana, Kazakhstan

*e-mail: scorpio116@mail.ru

Extraction of lipopolysaccharide antigens from strains of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis*

There are results of lipopolysaccharide antigens water-phenol extraction of *S. typhimurium* and *S. enteritidis* in this article, antigenic and serological properties of these antigens were studied by the indirect enzyme linked immunosorbent assay.

Keywords: salmonella, lipopolysaccharide antigen, water-phenol extraction.