

УДК 573.6.086.83:633.31/37

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

Индукция адвентивного органогенеза в культуре листовых эксплантов *Scorzonera tau-saghyz* Lipschits et Bosse

Показано, что регенерации адвентивных проростков дикорастущих форм тау-сагыза в культуре листовых эксплантов происходит путем индукции органогенеза. Показано положительное воздействие гибберелловой кислоты (GA_3) на процессы органогенеза и регенерации в культуре листовых эксплантов *Scorzonera tau-saghyz* Lipschits et Bosse. Подобраны условия для получения первичной суспензионной культуры клеток тау-сагыза.

Ключевые слова: тау-сагыз *Scorzonera tau-saghyz*, органогенез, адвентивные побеги, регенерация.

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

Induction of adventitious organogenesis in leaf explants of *Scorzonera tau-saghyz* Lipschits et Bosse

Regeneration of adventitious shoots from wild species Tau-saghyz was achieved by induction of organogenesis in leaf explants. The highest values for organogenesis and regeneration in leaf explants of *Scorzonera tau-saghyz* Lipschits et Bosse were obtained due to positive influence of Gibberellic acid (GA_3). The condition for creation suspension cell culture 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

Scorzonera tau-saghyz Lipschits et Bosse жапырақ эксплант культурасында адвентивті органогенездің индукциясы

Тау-сагыз жабайы өсімдігінің жапырақ эксплант культурасында адвентивті өскіндерінің регенерациясы органогенез жолымен ынталандыратынды көрсетілген. *Scorzonera tau-saghyz* Lipschits et Bosse жапырақ эксплант культурасында органогенез бен регенерация процестеріне гибберелл қышқылының (GA_3) оң әсері көрсетілген. Тау-сагыз өсімдігінің суспензиялық клетка культураны алу үшін өсіру жағдайлары тандалынған.

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

Одним из обязательных требований технологии клонирования редких дикорастущих видов растений, каковым является эндемик тау-сагыз, является получение культуры клеток, характеризующейся высокой способностью к регенерации адвентивных проростков. 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 [1, 2]. Каучукопродуцирующая способность казахстанского эндемика *Scorzonera tau-saghyz* 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.

Ранее проводились исследования по регенерации адвентивных проростков из корневых эксплантов семян близкородственных тау-сагызу видов *Taraxacum platycarpum*, *T. officinale* Weber [3, 4]. Работ по индукции регенерации адвентивных проростков *in vitro* из эксплантов *Scorzonera tau-saghyz* Lipschits et Bosse практически отсутствуют. Вследствие этого, целью данных исследований являлось выявление факторов, индуцирующих процессы адвентивного

органогенеза в культуре листовых эксплантов дикорастущих форм тау-сагыза *Scorzonera tau-saghyz*.

Материалы и методы

Исходным растительным материалом являлись 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. Листья промывали в дистиллированной воде и стерилизовали в 0,1 % растворе сулемы в течение 5 минут, затем многократно ополаскивали стерильной дистиллированной водой. Проксимальную часть листовых пластинок изолировали на модифицированную питательную среду Мурасиге-Скуга. Модификацию осуществляли по фитогормонам 6-БАП, НУК (нафтилукусная кислота), ИУК (индолилуксусная кислота), гибберелловая кислота GA₃: 0,1 мг/л НУК, 1 мг/л БАП, 0,1 мг/л ИУК, 1 мг/л 6-БАП, а также 0,1 мг/л ИУК, 1 мг/л БАП и 0,5 мг/л гибберелловой кислоты.

Листовые экспланты культивировали в при температуре 25±2 °С в темноте и на рассеянном свете. Полученные морфогенные каллусы пассировали на питательные среды Мурасиге-Скуга с 1,5 мг/л ИУК и 2 мг/л БАП и культивировали при температуре 25±2 °С, 16-часовом фотопериоде, при интенсивности освещения 2-3 тыс.люкс (белые флюоресцентные лампы).

По истечении 3-4 недель культивирования оценивали морфогенетическую регенерационную способность эксплантов (отношение эксплантов, образующих морфогенные структуры/регенеранты, к общему числу эксплантов, выраженное в процентах).

Суспензионную культуру получали из каллусной ткани, образовавшейся в культуре листовых эксплантов. В асептических условиях каллусы переносили в жидкую питательную среду Мурасиге-Скуга, содержащую половину неорганических/минеральных компонентов стандартного состава среды МС. Для индуцирования процессов эмбриогенеза в

состав питательной среды была внесена гибберелловая кислота (ГК) в концентрации 0,5 мг/л и 1 мг/л БАП. Контролем служил вариант среды МС без ГК. После получения первичной суспензии клеток через каждые 7-10 дней осуществляли субкультивирование суспензионной культуры. Используя камеру Горяева периодически производили подсчет плотности суспензии для определения динамики роста клеточной культуры диких форм тау-сагыза.

Результаты и их обсуждение

Ранее проведенные исследования показали, что для индукции морфообразовательных процессов оптимальным является базовый состав питательной среды Мурасиге-Скуга. Минеральный состав среды Гамборга В5 оказался не эффективным для этих целей [5]. Вследствие этого, культивирование эксплантов осуществлялось на среде Мурасиге-Скуга, содержащей 0,1 мг/л НУК, 1 мг/л БАП и 0,1 мг/л ИУК, 1 мг/л 6-БАП. Несмотря на то, что НУК широко применяется для стимулирования процессов органогенеза в культуре клеток растений семейства сложноцветных, к которому относится эндемик *Scorzonera tau-saghyz*, в наших экспериментах его влияние оказалось не столь ощутимым. Результаты анализа морфогенетических процессов в культуре листовых эксплантов тау-сагыза показывает, что наличие в питательной среде индолилуксусной кислоты оказывает положительное влияние на процессы регенерации, в то время как аналогичные концентрации другого ауксина - нафтилукусной кислоты НУК - индуцирует в основном процессы каллусогенеза (таблица 1). По-видимому, индолилуксусная кислота с ауксиновым типом действия регулирует морфообразовательные и регенерационные процессы в клеточной культуре для такого эндемика как тау-сагыз более эффективнее, чем его аналог НУК, физиологическое действие которого оказалось несколько меньше. В этом, по всей видимости, и проявляется генотипическая специфичность диких форм *Scorzonera tau-saghyz*. Преобладание фитогормона цитокининового типа действия (БАП) также способствует каллусообразованию в культуре клеток проксимальной части листа. Слабое освещение (рассеянный свет) куммулирует стимулирующее действие

цитокинина и благоприятствует пролиферации и развитию каллусных клеток. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что на эффективность культивирования *in vitro* оказывают влияние не только физиологическое состояние эксплантов, состав питательной среды, в частности баланс экзогенных гормонов, но и физические факторы (в частности, свет) культивирования.

Заметим, что микроклональное размножение *in vitro* основано на способности цитокининов снимать апикальное доминирование и вызывать адвентивное побегообразование. В наших исследованиях преобладание в составе питательной среды цитокинина БАП приводило к стимулированию закладки адвентивных

(дополнительных) почек. Культивирование на рассеянном свете, а также при 16 часовом фотопериоде, также благоприятствовало развитию адвентивных побегов. Таким образом, сочетание химических факторов (6-бензиламинопурина) с физическими факторами (свет и температура) способствует закладке и развитию адвентивного побегообразования. Добавление в питательную среду Мурасиге-Скуга 0,5 мг/л гибберелловой кислоты усиливает индуцирующий эффект цитокинина 6-БАП и, соответственно, приводит к увеличению частоты адвентивного органогенеза в среднем в 1.3-1.5 раза (таблица 1).

Таблица 1 – Частота морфогенеза и регенерации в культуре листовых эксплантов тау-сагыза на модифицированной питательной среде Мурасиге-Скуга, %

Эксплант - Листовые сегменты	Модификации питательной среды МС		
	0,1 мг/л ИУК, 1 мг/л 6-БАП	0,1мг/л ИУК, 1 мг/л 6-БАП	1мг/л 6-БАП, 0,1 мг/л ИУК, 0,5 мг/л ГК
Частота каллусогенеза, (%)	31,6±5,07	28,3± 2,2	42,6±11,2
Частота регенерации, (%)	-	0,34±0,001	2,7±0,64



Рисунок 1 – Образование адвентивных побегов у растений-регенерантов тау-сагыза

Полученные регенеранты переносили в мадженты на среду для укоренения - питательную среду МС, содержащую только индилилуксусную кислоту (ИУК) в концентрации 1 мг/л. Ризогенез наблюдали на 2-3 неделе после пересадки. Фенотипически полученные *in vitro* растения-регенеранты не отличались от проростков тау-сагыза, образующихся в нативных природных условиях, т.е. фенотипически значимых отклонений не наблюдалось.

При добавлении в состав среды для укоренения 0,2 мг/л гибберелловой кислоты

отмечалось появление адвентивных побегов и придаточных корней из узлов корней растений-регенерантов (рисунок 1).

Дальнейшее микрочеренкование адвентивных побегов приведет к клонированию исходных растений, тем самым достигается основная цель технологии микроклонального размножения - масштабирование редких и исчезающих видов дикорастущих растений, получение генетических копий донорных растений. Таким образом, наличие гибберелловой кислоты в составе питательной среды стимулирует образование адвентивных

побегов у растений-регенерантов, что, несомненно увеличивает коэффициент размножения микроклонов. Индуцирующее влияние на морфогенетические процессы гибберелловой кислоты в культуре клеток тау-сагыза также было замечено и при получении суспензионной культуры клеток *in vitro*. В наших исследованиях часть морфогенных каллусов была перенесена в жидкую

питательную среду Мурасиге-Скуга, содержащую те же комбинации фитогормонов, что и в твердой агаризованной среде. По истечении 8-12 дней морфогенные каллусы диссоциировались на небольшие клеточные агрегаты и одиночные клетки, образуя суспензионную клеточную культуру (рисунок 2).

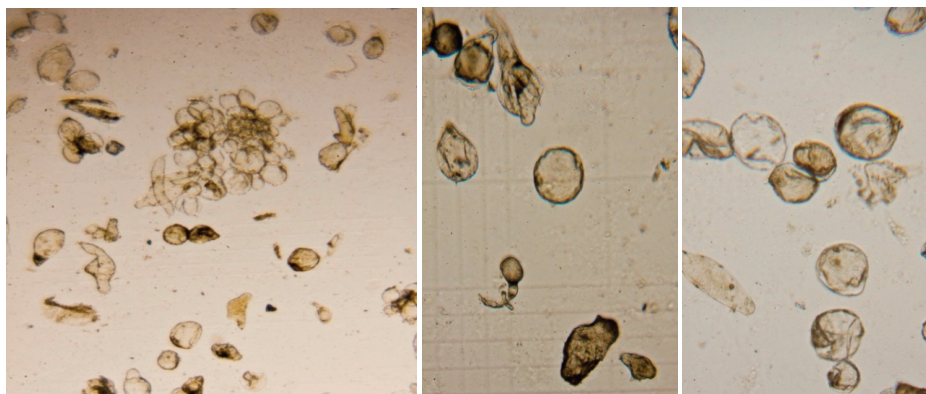


Рисунок 2 – Суспензионная клеточная культура тау-сагыза

При сравнительном морфометрическом анализе суспензий, полученных на 3 различных по гормональному составу питательных средах было замечено, что по консистенции и однородности клеточной популяции наиболее гомогенной являлась суспензионная культура, образовавшаяся на варианте среды, содержащей 1 мг/л 6-БАП, 0,1 мг/л ИУК, 0,5 мг/л ГК. Клетки имели округлую форму и активно пролиферировались именно на среде с гибберелловой кислотой.

Таким образом, на проявление морфогенетического потенциала в культуре клеток листовых эксплантов существенное влияние оказывает концентрация и тип регуляторов роста. Оптимальным сочетанием регуляторов роста в питательной среде Мурасиге-Скуга является 1 мг/л 6-БАП, 0,1 мг/л ИУК, 0,5 мг/л ГК. Наличие гибберелловой кислоты оказывает стимулирующее действие на процессы адвентивного органогенеза в культуре клеток тау-сагыза *Scorzonera tau-saghyz*.

Литература

- 1 Кунах В.А. Изменчивость растительного генома в процессе дедифференцировки и каллусообразования *in vitro* // Физиол. Растений. – 1999. – Т. 46. – № 6. – С. 919-929.
- 2 Omo-Ikerodah E.E., Omokhafa K.O., Akpobome F.A., Mokuwonye 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.
- 3 Lee M.H., Yoon E.S., Jung S.J., Bae K.H., Seo J.W., Choi Y.E. Plant regeneration and effect of auxin and cytokinin on adventitious shoot formation from seedling explant of *Taraxacum platycarpum* // Korean J. Plant Biotech. – 2000. – Vol.29. – P.111-115.
- 4 Князев А.В., Черемис А.В., Вахитов В.А. Каллусообразование и морфогенез у *Taraxacum officinale* Weber в культуре *in vitro* // Вестник биотехнологии. – 2007. – №3. – С.5-9.
- 5 Турашева С.К., Богуспаев К.К., Фалеев Д.Г., Амангул, Ускенбаева А. Скрининг морфогенетической способности дикорастущих видов тау-сагыза *Scorzonera tau-saghyz* L.B. // Вестник КазНУ. Серия биологическая. – 2013. – № 3/1 (59). – С. 193-198.