

УДК 581.17:633.81

## ПОЛУЧЕНИЕ И ЦИТОФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ АНИСА

© 2007 г. Н. А. Егорова, И. В. Ставцева

*Институт эфиромасличных и лекарственных растений*

*Украинской академии аграрных наук*

*(Симферополь, Украина)*

Изучено влияние состава питательной среды и типа экспланта на индукцию каллусной ткани у аниса (*Pimpinella anisum L.*). Подобрана среда, содержащая БАП и 2,4-Д, и эксплант (сегмент стебля), обеспечивающие индукцию каллусогенеза с частотой до 100% и интенсивный прирост каллусной ткани при длительном пассировании (ростовой индекс 43,3). Исследовано изменение некоторых цитофизиологических характеристик в цикле выращивания каллусной культуры (массы и плотности каллусной ткани, жизнеспособности клеточной популяции и соотношения разных типов клеток) и определена продолжительность основных фаз ростового цикла.

**Ключевые слова:** *Pimpinella anisum L.*, каллусная культура, эксплант, цикл выращивания

Анис (*Pimpinella anisum L.*), относящийся к семейству Сельдерейных (*Apiaceae*), известен с давних времен как пряно-ароматическое растение. В плодах аниса содержится до 3-5 % эфирного масла, главной составной частью которого является анетол. Эфирное масло аниса входит в состав ряда медицинских препаратов, применяемых при бронхитах, трахеитах и других заболеваниях. Кроме того, из плодов получают до 16-22% жирного масла, используемого в мыловарении и лако-расочном производстве [11].

Селекционная работа с анисом, проводимая в ИЭЛР, основывается на применении традиционных методов гибридизации и отбора, которые частично исчерпали свои возможности. В последние годы на примере ряда культурных растений, в том числе и эфиромасличных, показана перспективность использования для создания исходного материала культуры изолированных тканей [1,10]. Применение этих методов позволяет существенно сократить сроки создания исходного селекционного материала, получить генетически разнообразный исхо-

дный материал и обогатить селекцию эффективными вспомогательными методами.

Для разработки различных биотехнологических методов получения новых форм растений в культуре тканей на первом этапе необходимо оптимизировать условия для индукции и длительного пассирования каллусной ткани и изучить особенности процесса каллусогенеза. Эти условия обычно строго индивидуальны и в значительной степени предопределены генотипом. Имеющиеся литературные сведения по клеточной культуре аниса в основном ограничены изучением накопления вторичных метаболитов и индукции эмбриогенеза *in vitro* [13,14].

В задачу наших исследований входило изучение влияния гормонального состава питательной среды и типа экспланта на каллусообразование и цитофизиологическая характеристика каллусной ткани аниса в цикле выращивания.

### МЕТОДИКА

Материалом для исследований служил основной возделываемый сорт аниса (*Pimpinella anisum L.*) Парус. В качестве эксплантов использовали сегменты стебля, листьев и черешков листьев. При введении в культуру, приготовлении питательных сред, пассирова-

---

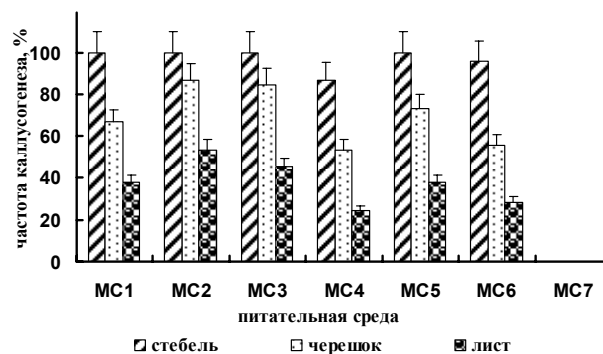
Адрес для корреспонденции: Егорова Наталья Алексеевна, Институт эфиромасличных и лекарственных растений УААН, ул. Киевская, 150, Симферополь, 95493, Автономная республика Крым, Украина;  
e-mail: vacony@yahoo.com

нии и анализе ростовых процессов применяли традиционные для работ по культуре тканей методики [5]. Масса транспланта составляла 60 мг. Каллусные ткани культивировали на различных модификациях питательной среды Мурасиге и Скуга (МС), дополненной фитогормонами (2,4-Д, НУК, ИУК, кинетин, БАП). Культивирование каллусных тканей осуществляли при 26°C, 70 %-ой влажности и 16-часовом фотопериоде с освещенностью 2-3 кЛк в культуральной комнате. Ростовой индекс рассчитывали как отношение массы каллусной ткани в конце цикла выращивания к массе транспланта.

Анализ цитофизиологических параметров проводили на 0, 2, 4, 6, 8, 10, 14, 16, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50-е сутки культивирования каллуса шестого пассажа. Массу сырого каллуса оценивали на основании взвешивания не менее 20 трансплантов. Плотность каллуса (количество клеток на 1 мг сырой биомассы) определялась в 6-ти кратной повторности путем подсчета клеток в камере Фукса-Розенталя после мацерации 100 мг каллуса в 20 % хромовой кислоте при 60°C. Жизнеспособность клеток оценивали после окраски 0,5 % метиленовым синим и анализа не менее 500 клеток в 3-х кратной повторности. При цитологическом анализе соотношения разных типов клеток на препаратах после окраски ацетокармином подсчитывали не менее 200 клеток в 5-ти кратной повторности. Цитологические исследования проводили под микроскопом БИОЛАМ. Данные обрабатывали статистически с вычислением средних арифметических и доверительных интервалов при 95% уровне значимости [9].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате наших предварительных исследований ранее было установлено, что из всех изученных фитогормонов (2,4-Д, НУК, ИУК, кинетин, БАП) наиболее благоприятное воздействие на индукцию каллусной ткани из различных типов эксплантов у аниса оказывали 2,4-Д и БАП. Поэтому, в данной работе мы проанализировали влияние этих двух типов гормонов на индукцию каллусогенеза. Как видно из данных, представленных на рис. 1, гормональный состав питательной среды и тип экспланта оказывали значительное влияние на частоту каллусогенеза у сорта Парус. В качестве эксплантов использовали сегменты стебля, листа и черешка листа. Наибольшая частота индукции каллусогенеза (до 100%) на всех питательных средах отмечалась при культивировании стеб-



**Рис. 1. Влияние типа экспланта и состава питательной среды на индукцию каллусогенеза у аниса сорта Парус.** Гормональные добавки (мг/л) в питательной среде: MC1 – 2,4-Д (0,5) + БАП (0,1); MC2 – 2,4-Д (0,5) + БАП (0,5); MC3 – 2,4-Д (0,5) + БАП (1,0); MC4 – 2,4-Д (1,0) + БАП (0,1); MC5 – 2,4-Д (1,0) + БАП (0,5); MC6 – 2,4-Д (2,0) + БАП (0,1); MC7 – без гормонов.

левых сегментов. При эксплантации сегментов черешка или листа частота каллусогенеза была в 2-4 раза ниже. Наименьшей способностью к каллусогенезу на изученных средах у аниса обладали листовые сегменты, у которых частота каллусогенеза не превышала 53,3% (рис. 1).

Следует отметить, что культивирование разных типов эксплантов приводило к образованию морфологически различной каллусной ткани. Так, при культивировании сегментов стебля отмечена пролиферация плотного компактного каллуса зеленого цвета. При введении черешков листьев и сегментов листа наблюдалось образование рыхлой каллусной ткани бежевого и светло-зеленого цвета.

Цитологический анализ каллусных культур стеблевого происхождения позволил выделить несколько основных морфологических типов клеток, отличающихся по форме, размеру и строению. Компактными группами располагались клетки меристематического типа – мелкие, округлые, с крупным ядром и густой, хорошо окрашиваемой цитоплазмой. Клетки паренхимного типа имели более крупные размеры и небольшое слабо окрашенное ядро, обычно расположенное в центре. Цитоплазма с одной крупной или несколькими мелкими вакуолями окрашивалась очень незначительно. Среди паренхимных выделили два типа клеток - округлые и гигантские (овальной или грушевидной формы, превышающие в несколько раз округлые). Изредка среди групп меристематических клеток встречались трахеидоподобные элементы.

## ПОЛУЧЕНИЕ И ЦИТОФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

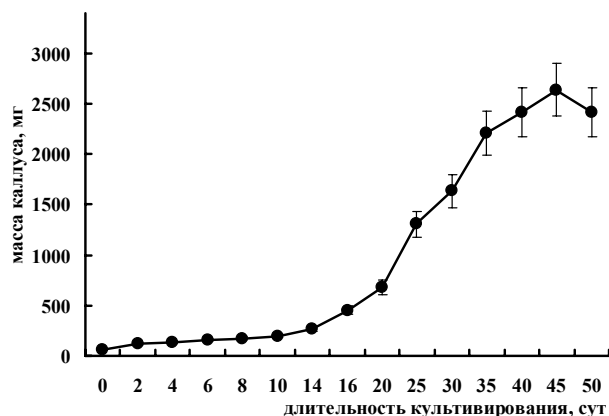


Рис. 2. Динамика изменения массы каллуса в цикле выращивания каллусной ткани аниса сорта Парус

Проанализировано влияние различных концентраций и соотношений 2,4-Д и БАП на индукцию каллусогенеза из разных типов эксплантов аниса (рис. 1). На контрольной безгормональной среде МС7 формирования каллуса не наблюдалось ни на одном из эксплантов. При эксплантации стеблей практически на всех питательных средах (за исключением МС4), содержащих от 0,1 до 2,0 мг/л 2,4-Д и БАП, индукция каллусогенеза происходила с высокой частотой 96 – 100%. При культивировании сегментов черешка и листа максимальная частота каллусогенеза наблюдалась на среде МС2 с равным содержанием 2,4-Д и БАП (по 0,5 мг/л) – соответственно 86,7% и 53,3%. Достаточно высокие значения частоты каллусогенеза у этих типов эксплантов также отмечены на среде МС3, дополненной 0,5 мг/л 2,4-Д и 1,0 мг/л БАП – 84,5 и 45,3%. На остальных питательных средах, в которых концентрация ауксина 2,4-Д была выше, чем цитокинина БАП (МС1, МС4, МС5, МС6) частота индукции каллусогенеза была достоверно ниже, чем на средах МС2 и МС3 (рис. 1).

Для разных видов растений необходимым условием каллусогенеза является присутствие в питательной среде различных типов ауксинов или цитокининов, что во многом обусловлено балансом эндогенных фитогормонов [1, 10]. У многих генотипов для индукции каллуса необходимо введение в состав питательной среды или одного ауксина, или же превышение концентрации ауксина над цитокинином [5, 7]. Как видно из полученных нами результатов, у аниса индукция каллусогенеза при использовании в качестве эксплантов сегментов листьев и черешков лучше происходила при

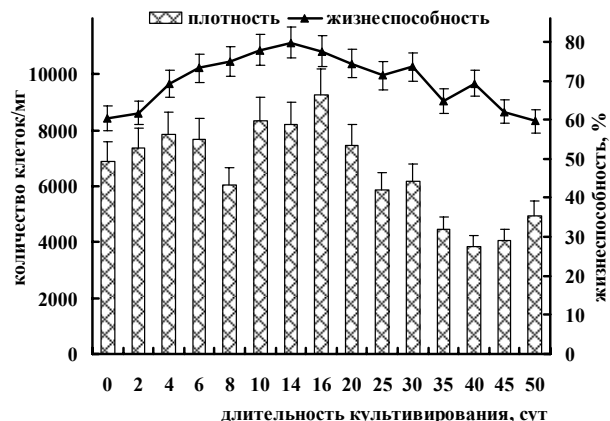


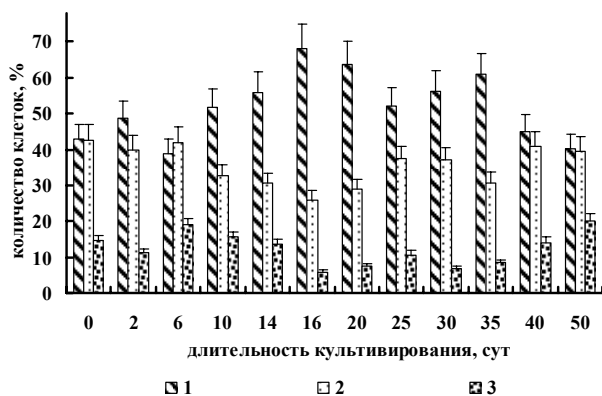
Рис. 3. Изменение плотности каллусной ткани и жизнеспособности клеточной популяции в течение цикла выращивания аниса сорта Парус

равном соотношении БАП и 2,4-Д или же преобладании в среде цитокинина; в то же время при эксплантации стеблевых сегментов различные сочетания этих гормонов были одинаково эффективны.

Учитывая выявленные особенности, в дальнейших экспериментах при исследовании длительно пассируемых каллусных тканей мы в основном использовали каллусные культуры, полученные из стеблей, которые пассировали на среде МС с добавлением 0,5 мг/л БАП и 2,4-Д.

Для характеристики ростовых процессов в течение цикла выращивания каллусной ткани обычно изучается изменение ряда цитофизиологических параметров, таких как сырая и сухая биомасса, количество клеток на единицу массы, митотический индекс, жизнеспособность, соотношение различных типов клеток и некоторые другие [1, 2, 5]. В данной статье приводятся результаты определения массы сырого каллуса (рис. 2), плотности каллусной ткани (числа клеток на мг сырой массы каллуса), жизнеспособности клеточной популяции (рис. 3) и содержания разных типов клеток (рис. 4) в цикле выращивания стеблевого каллуса аниса шестого пассажа.

При анализе изменения массы сырого каллуса было установлено, что за цикл выращивания биомасса каллусной ткани увеличивалась более чем в 40 раз (рис. 2). Ростовой индекс в конце цикла выращивания достигал очень высокого значения – 43,3. У ранее изученных нами видов эфиромасличных растений ростовые индексы были гораздо ниже. Так, у розы и лаванды ростовые индексы достигали 17



**Рис. 4.** Динамика изменения различных типов клеток в цикле выращивания каллусной ткани аниса сорта Парус: 1 – клетки меристематического типа, 2 – паренхимные округлые, 3 – паренхимные гигантские клетки

- 18, у кориандра – 12, герани - 7 [4]. Интенсивность роста разных типов каллусов коикса составляла 5,0 – 9,6 [3]. Имеются данные, что у различных сортов шелковицы ростовые индексы варьировали от 20 до 45 [12].

В цикле выращивания каллуса аниса популяция каллусных клеток проходила все известные фазы роста [5, 10]. Лаг-фаза была очень короткой и приходилась на 1-2-е сутки. На 2-е сутки отмечалось достоверное увеличение массы каллуса (от  $60,9 \pm 2,7$  мг до  $116,5 \pm 7,4$  мг) и популяция вступала в фазу роста. Однако в течение первых двух недель прирост каллуса был очень незначителен, что соответствует фазе логарифмического роста. При переходе популяции клеток в эту фазу роста отмечалось также небольшое повышение жизнеспособности и количества клеток (рис. 3).

Только после 16-ти суток культивирования каллусная культура вступала в фазу линейного роста. В этот период наблюдался очень активный прирост биомассы – скорость роста с 20 по 35-е сутки составила 161,2 мг/сутки. В этот период прогрессирующей пролиферации происходила существенная перестройка популяции каллусных клеток. Это связано с усилением митотической активности и появлением значительного количества мелких меристематических клеток, что подтверждалось цитологическим анализом каллуса – с 14 суток содержание этих клеток достоверно возрастало (рис. 4). На 16-е сутки количество меристематических клеток достигало максимума – 68,2%. Увеличение числа клеток меристематического типа и снижение процента более крупных паренхимных клеток приводило к уплотнению каллусной ткани и повышению количества клеток на

миллиграмм массы. О переходе популяции клеток в линейную фазу интенсивного роста свидетельствует также достоверное увеличение плотности каллуса и жизнеспособности клеток (рис. 3). Максимальная плотность каллуса (9248,4 клетки на мг) и жизнеспособность (79,8%) отмечались на 14 - 16-е сутки культивирования. Затем, примерно с 25-го дня клеточного цикла, интенсивность делений в клеточной популяции снижалась, и начинался рост клеток растяжением. Об этом свидетельствует уменьшение числа меристематических и увеличение количества паренхимных клеток и, как следствие, снижение в 1,5 раза плотности каллуса (рис. 3, 4).

У аниса в течение цикла выращивания каллуса наблюдался один максимум количества клеток на 16-е сутки, а также – менее выраженное повышение плотности на 4-е сутки (рис. 3). Наличие двух максимумов количества клеток в течение цикла пассирования было также отмечено для каллусных культур некоторых видов эфиромасличных растений [4] и сортов яровой пшеницы [7]. Такое увеличение числа клеток, по-видимому, связано с двумя пиками митотической активности в течение пассажа, которые приводили к повышению числа мелких меристематических клеток и уплотнению ткани. У многих видов растений было показано существование двух-трех пиков митотической активности в течение цикла выращивания каллусных тканей [2, 8]. В то же время у раувольфии змеиной в течение пассажа наблюдали 5-6 подъемов митотической активности [10].

Популяция каллусных клеток аниса переходила в стационарную фазу роста примерно на 40-й день культивирования, после которого не наблюдалось достоверного прироста массы каллуса (рис. 2) и стабилизировалась плотность каллусной ткани (рис. 3). С этого периода в популяции каллусных клеток начинались процессы старения и деградациии, что приводило к усилению гибели клеток и снижению жизнеспособности до 59,7%. В конце пассажа в популяции значительно увеличивалось количество паренхимных округлых (39-43%) и гигантских клеток (17-20%).

В результате проведенного цитофизиологического исследования были установлены особенности роста популяции клеток аниса в течение цикла выращивания каллусной ткани и длительность фаз ростового цикла, что очень важно для разработки методических приемов культивирования *in vitro*. Для аниса была установлена короткая лаг-фаза (двое суток) и очень

## ПОЛУЧЕНИЕ И ЦИТОФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

интенсивный прирост биомассы в течение линейной фазы роста (в результате чего ростовой индекс достигал 43,3). Относительно поздний переход популяции клеток в стационарную фазу (на 40-е сутки) свидетельствует о том, что оптимальная продолжительность пассажа у этого вида должна быть не менее 40-45 суток. Судя по имеющимся литературным данным, для разных видов растений характерно значительное разнообразие продолжительности ростовых фаз. Так, у лаванды была также выявлена небольшая продолжительность латентной фазы (2-3 суток), однако вступление популяции клеток в стационарную фазу проходило довольно рано - на 26 сутки [4]. У женьшеня, кориандра, розы и герани стационарная фаза наступала на 40-45-е сутки [2, 4]. Большая продолжительность многих фаз ростового цикла была у серпухи венценосной - лаг-фаза длилась 20 суток, а переход популяции клеток в стационарную фазу роста происходил на 70-е сутки выращивания [6]. Такое же позднее вступление клеток в стационарную фазу было характерно и для культуры тканей раувольфии змеиной [10].

Таким образом, было исследовано влияние состава питательной среды и типа экспланта на индукцию каллусогенеза у аниса. Подобран тип экспланта (сегмент стебля) и гормональный состав среды, обеспечивающие высокую частоту индукции каллусогенеза (до 100%) и интенсивный рост каллуса (ростовой индекс до 43,3). Установлена продолжительность основных фаз цикла выращивания каллусной культуры и показаны особенности изменения биомассы и плотности каллуса, жизнеспособности клеточной популяции и соотношения разных типов клеток в течение пассажа. Данные исследования могут быть основой для дальнейшей разработки клеточных технологий, основанных на каллусной культуре, в частности, получения соматоклональных вариантов, клеточной селекции *in vitro* и ряда других.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
2. Батыгина Е.Н. Культура ткани *Panax quinquefolius L.* как объект для изучения процессов роста и метаболизма *in vitro*.: Автореф. дис... канд. биол. наук. – Л., 1990. - 17 с.
3. Гусева А.И. Физиолого-биохимическая характеристика каллусных культур *Coix sp.*// Апомиксис и цитоэмбриология растений. – Саратов: 1989. – С.101 – 111.
4. Егорова Н. А. Цитофизиологическая характеристика каллусных культур некоторых эфиромасличных растений // Физиология и биохимия культ. растений. – 2001. – Т. 33, № 2. – С. 159-164.
5. Калинин Ф. Л., Сарнацкая В.В., Полищук В. Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – Киев: Наук. думка, 1980. – 488 с.
6. Карначук Р.А., Бенсон Н.А., Трофимова Н.А., Двигуннинова И.Б. Клеточная культура серпухи венценосной как перспективный продуцент фитоэкдистероидов. // Биология культивируемых клеток и биотехнология растений. – М.: Наука, 1991. – С. 39 – 41.
7. Косулина Л.Г., Лапикова В.П. Получение каллусной ткани из зрелых зародышей яровой пшеницы. // Биол. науки. – 1986. - № 4. – С. 77 – 81.
8. Костенюк И.А., Любарец О.Ф., Кунах В.А. Ритмика митотической активности и содержания ядерной ДНК в культуре тканей мака прицветникового (*Papaver bracteatum Lind.*) // Цитология и генетика. – 1993. – Т. 27, № 6. – С. 32 – 39.
9. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высш. школа. – 1980. – 292 с.
10. Мельничук М. Д., Новак Т. В., Кунах В. А. Биотехнология рослин. – К.: Поліграф Консалтинг, 2003. – 520 с.
11. Николаев Е.В., Назаренко Л.Г., Мельников М.М. Крымское полеводство: Справочное пособие. - Симферополь: Таврида, 1998. – 384 с.
12. Эргашев А.К.Э., Ефимков В.А. Шелковица как объект в биотехнологических исследованиях // Биология культивируемых клеток и биотехнология растений. – М.: Наука, 1991. – С. 36 – 39.
13. Ernst D. *Pimpinella anisum L.* (Anise): cell culture, somatic embryogenesis and production of anise oil // Med. and Aromat. Plants. 2. – Berlin, 1989. - P. 381 – 397.
14. Theimer R.R., Kudielka R.A., Rosch I. Induction of somatic embryogenesis in anise in microgravity // Naturwissenschaften. – 1986. – V. 73, № 7. – P. 442 – 443.

Поступила в редакцию  
20.09.2007 г.

**ЕГОРОВА, СТАВЦЕВА**

## **OBTAINING AND CYTOPHYSIOLOGICAL CHARACTERISTIC OF ANISE CALLUS CULTURE**

N. A. Egorova, I. V. Stavtzeva

*Institute of Essential Oil and Medicinal Plants  
Ukrainian Academy of Agrarian Sciences  
(Simferopol, Ukraine)*

The influence of nutrient media composition and explant type on the callus tissue induction of anise (*Pimpinella anisum L.*) have been studied. It was revealed the media (containing BAP and 2,4D) and explant (shoot segment) provided callusogenesis induction with frequency up to 100% and growth index 43,3 of callus tissue under long cultivation. The dynamics of some cytophysiological parameters during callus culture growth cycle (weight and density of callus tissue, viability of cell population and quantity of different morphological cell types) were investigated. As a result of experimental work the duration of the main phases of growth cycle has been determined.

**Key words:** *Pimpinella anisum L.*, callus culture, explant, growth cycle

## **ОТРИМАННЯ І ЦИТОФІЗІОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА КАЛУСНОЇ КУЛЬТУРИ АНІСУ**

Н. О. Єгорова, І. В. Ставцева

*Інститут ефіроолійних та лікарських рослин  
Української академії аграрних наук  
(Сімферополь, Україна)*

Вивчено вплив складу живильного середовища і типу експланта на індукцію калусної тканини у анісу (*Pimpinella anisum L.*). Підібране середовище, що містить БАП і 2,4-Д, і експлант (сегмент стебла), що забезпечують індукцію калусогенезу з частотою до 100% та інтенсивний приріст калусної тканини при тривалому пасуванні (ростовий індекс 43,3). Досліджено зміну деяких цитофізіологічних характеристик у циклі вирощування калусної культури (маси і густини калусної тканини, життєздатності клітинної популяції і співвідношення різних типів клітин) та визначена тривалість основних фаз ростового циклу.

**Ключові слова:** *Pimpinella anisum L.*, калусна культура, експлант, цикл вирощування