

ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 58.085

DOI 10.21685/2307-9150-2020-1-1

Е. В. Кучарова, Ж. М. Охлопкова, Е. Е. Антонова

ПОЛУЧЕНИЕ КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР ПОЛЫНИ ОБЫКНОВЕННОЙ (*ARTEMISIA VULGARIS* L.)¹

Аннотация.

Актуальность и цели. Одним из альтернативных источников получения биологически активных веществ является культура растительных клеток *in vitro*. Целью данной работы является введение в каллусную культуру *Artemisia vulgaris* L. центрально-якутской популяции как вида с высоким содержанием различных биологически активных веществ, применяемого в народной медицине и широко распространенного на территории исследования.

Материалы и методы. Фитомасса *Artemisia vulgaris* L. была собрана во время экспедиций на территории Амгинского района Республики Саха (Якутия) в июне-июле 2016–2018 гг. Для введения *Artemisia vulgaris* в каллусную культуру в качестве инициальных эксплантов использованы настоящие листья стерильных растений, полученных в контролируемых условиях из семян дикорастущего растения. Культивирование проводили на питательной среде Мурасиге-Скуга с использованием двух разных вариантов регуляторов роста: 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты и кинетина, 6-бензиламинопурина и α -нафтилуksусной кислоты. Морфологический анализ клеток полученных каллусов проводили на световом микроскопе. Полученные первичные каллусы были отобраны для дальнейшей пересадки на питательной среде Мурасиге-Скуга (МС) с разными концентрациями регуляторов роста. Динамику роста сырой массы каллусов изучали в течение одного цикла (21 сут).

Результаты. Биомасса первичного каллуса *Artemisia vulgaris* на питательной среде Мурасиге-Скуга с добавлением 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты и кинетина была светло-желтой окраски и плотной консистенции, а при добавлении 6-бензиламинопурина и α -нафтилуksусной кислоты также была бледно-желтой окраски, но отличалась легко отделяемой рыхлой структурой. Морфологический анализ клеток полученных первичных каллусов показал преобладание клеток округло-яйцевидной формы с ярко выраженным ядром. На питательной среде с добавлением 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты,

¹ Работа выполнена в рамках научно-исследовательского проекта «Вторичные метаболиты полыней Якутии *in vivo* и *in vitro*: поиск, оптимизация и практическое приложение» учебно-научной лаборатории «Молекулярно-генетические и клеточные технологии» СВФУ (Соглашение № 6-НИП от 01.09.2017, 2-й этап работ).

© Кучарова Е. В., Охлопкова Ж. М., Антонова Е. Е., 2020. Данная статья доступна по условиям всемирной лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), которая дает разрешение на неограниченное использование, копирование на любые носители при условии указания авторства, источника и ссылки на лицензию Creative Commons, а также изменений, если таковые имеют место.

кинетина и α -нафтилукусной кислоты максимальное увеличение сырой массы каллуса наблюдалось на 11-е сут после пересадки. На питательной среде с добавлением 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты, α -нафтилукусной кислоты и 6-бензиламинопурина максимальное увеличение сырой массы каллуса наблюдалось на 14-е сут.

Выводы. Получены первичные каллусы *Artemisia vulgaris* L. из листовых эксплантов, взятых из стерильных растений. Оптимизирована питательная среда с регуляторами роста для получения и дальнейшего введения каллусной культуры *Artemisia vulgaris* L. На питательной среде с добавлением 2,4-Д, НУК и БАП сырая биомасса каллуса *Artemisia vulgaris* L. в три раза превышает биомассу каллуса, получаемого на питательной среде с 2,4-Д, кинетином и НУК. Полученные каллусные культуры обладали мягкой легко отделяемой рыхлой структурой бледно-желтого цвета.

Ключевые слова: *Artemisia vulgaris* L., каллусная культура, питательная среда МС, каллусогенез, биомасса, кривая роста.

E. V. Kucharova, Zh. M. Okhlopkova, E. E. Antonova

OBTAINING CALLUS CULTURES OF COMMON MUGWORT (*ARTEMISIA VULGARIS* L.)

Abstract.

Background. One of the alternative sources of obtaining biologically active substances is a culture of plant cells in vitro. The objective of this work is to introduce *Artemisia vulgaris* in the callus culture. The plant grows in Central Yakutia, known as a species with a high content of various biologically active substances used in traditional medicine and widely spread on a territory researched.

Materials and methods. The phytomass of *Artemisia vulgaris* L. was collected during the expeditions on the territory of Amga's region of the Republic of Sakha (Yakutia) in June-July 2016–2018. For introduction of *Artemisia vulgaris* L. into a callus culture, the actual leaves of sterile plants were used as explants. The plants were obtained via cultivating the seeds of a wild plant in controlled conditions. The cultivation was performed on a Murashige-Skoog nutrient medium with the use of two different growth regulators: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and kinetin, 6-benzylaminopurine and α -naphthylacetic acid. Morphological analysis of cells of the obtained calli was performed using a light microscope. The obtained primary calli were selected for further transplantation on a Murashige-Skoog nutrient medium with different concentrations of growth regulators. The growth dynamics of the callus wet mass was studied during one cycle (21 days).

Results. The biomass of primary callus *Artemisia vulgaris* L. in the Murashige-Skoog nutrient medium with supplementation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and kinetin was light yellow in color and had a dense consistency, and with the addition of 6-benzylaminopurine and α -naphthylacetic acid, it was also pale yellow in color, but with easily separable loose structure. Morphological analysis of cells of primary callus obtained showed the predominance of round-ovoid cells with a distinct nucleus. In a nutrient medium supplemented with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, kinetin, and α -naphthylacetic acid, the peak increase in callus wet mass was observed on day 11 after transplantation. On a nutrient medium supplemented with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, α -naphthylacetic acid, and 6-benzylaminopurine the peak increase in the callus wet mass was observed on the 14th day.

Conclusions. The primary callus of *Artemisia vulgaris* L. were obtained from leaf explants taken from sterile plants. A nutrient medium with growth regulators

was optimized to obtain callus and for a further introduction of *Artemisia vulgaris* in the callus culture. On a nutrient medium supplemented with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, α -naphthylacetic acid, and 6-benzylaminopurine callus biomass of *Artemisia vulgaris* L. is three times heavier than the biomass of callus obtained on a nutrient medium with 2,4-D, kinetin, and NAA. The obtained callus cultures had a soft, easily separable, loose structure, pale yellow in color.

Keywords: *Artemisia vulgaris* L., callus culture, MS nutrient medium, callogenesis, biomass, growth curve.

Введение

Artemisia – крупный род травянистых и полукустарниковых растений семейства Сложноцветные (*Asteraceae*) [1]. Во флоре Центральной Якутии насчитывается 22 вида рода *Artemisia* [2]. В основном это растения степных сообществ, широко распространенные в долине Средней Лены и представляющие собой своеобразие растительного покрова Центральной Якутии [3]. Некоторые виды полыней имеют лекарственную и пищевую ценность.

Одним из широко распространенных в природе видов и применяемых в народной медицине является *Artemisia vulgaris* L. Полынь обыкновенная, чернобыльник, по-якутски «уөрэ ото». Строение корневища крепкое, немного ветвистое. Стебли прямостоячие, красно-бурые, наверху разветвленные, до 1–1,5 м высотой. Листья сверху голые или слегка пушистые, темно-зеленые, снизу сероватые, паутинисто-войлочные, перисто-рассеченные на удлиненные зубчатые доли. Цветки очень мелкие, собраны в яйцевидные корзинки 2–4 мм шириной, составляющие широкое, несколько поникающее, метельчатое соцветие; обертка каждой корзинки покрыта густым войлочком; цветки красноватые, реже – желтые. Цветет в июле-августе. Местом произрастания являются пустыри, огороды, сорные места, окрестности жилья, реже – луга и берега рек. На территории Якутии полынь обыкновенная распространена повсеместно, в основном на Алдане, Центральной Якутии, Верхне-Ленске, Яно-Индигирске, на Колыме [4].

По результатам фитохимического анализа было установлено наличие в надземной части полыни обыкновенной: аскорбиновой кислоты, полисахаридов, белков, дубильных веществ, флавоноидов, кумаринов, тритерпеновых сапонинов и фенольных соединений [5, 6]. Полынь обыкновенная в якутских популяциях, согласно результатам исследования, содержала в траве флавоноиды ($5,64 \pm 0,02$ %), дубильные вещества ($13,7 \pm 0,5$ %), аскорбиновую кислоту ($2,6 \pm 0,02$ мг/г) и водорастворимые полисахариды ($4,59 \pm 0,3$ %), что также подтверждает многовековой опыт использования данного растения якутскими травниками как ценного пищевого и лекарственного растения [7].

В связи с высоким содержанием различных биологически активных веществ в траве полыни обыкновенной перед нами стояла задача получить каллусную культуру клеток данного вида растения на основе растительных материалов, собранных на территории Центральной Якутии, для дальнейшего изучения особенностей накопления биологически активных веществ в каллусной биомассе *Artemisia vulgaris* L. Растение с соцветиями и семенами было собрано нами в течение экспедиционных работ на территории Амгинского района Республики Саха (Якутия) в июне-июле 2016–2018 гг.

Целью данной работы является введение в каллусную культуру *Artemisia vulgaris* L. центрально-якутской популяции.

Для достижения данной цели мы выполняли следующие задачи:

- 1) получение стерильных растений из семян дикорастущего растения;
- 2) оптимизация питательной среды для получения каллусной культуры *Artemisia vulgaris* L.;
- 3) получение первичного каллуса и морфологический анализ клеток;
- 4) анализ динамики роста биомассы каллуса *Artemisia vulgaris* L.

Материалы и методика

Объектом исследования является растение *Artemisia vulgaris* L., фито-масса которого была собрана в течение экспедиционных работ на территории Амгинского района Республики Саха (Якутия) в июне-июле 2016–2018 гг. Растительный материал подвергался естественной сушке, и из него были вы-лучены семена с сохранением семенного материала в коллекции лаборато-рии «Молекулярно-генетические и клеточные технологии» СВФУ.

Семена растения стерилизовали раствором перекиси водорода в тече-ние 5 мин, 70 % этиловым спиртом в течение 1 мин с последующей много-кратной промывкой автоклавированной дистиллированной водой. Семена помещали на поверхность безгормональной питательной среды и культиви-ровали в контролируемых условиях климатической камеры. Прорастание се-мян наблюдалось на второй день после посадки.

В качестве эксплантов для введения *Artemisia vulgaris* в культуру *in vit-ro* взяты первые настоящие листья стерильных растений. Экспланты также подвергали стерилизации, в условиях ламинарного бокса проводили последо-вательную обработку 3 % раствором перекиси водорода, 70 % этиловым спиртом, после чего растительный материал 3–4 раза промывали стерильной дистиллированной водой. Экспланты помещали на питательную среду Мура-сиге-Скуга (МС), дополненную регуляторами роста (2,4-Д, НУК, кинетин и БАП) в различных комбинациях и концентрациях (табл. 1). Стерилизацию сред, материалов и работу в асептических условиях проводили по стандарт-ным требованиям, общепринятым в работах по культуре клеток растений [8].

Таблица 1

Состав регуляторов роста в питательной среде МС
для введения листовых эксплантов в культуру клеток

Номер эксплантов	Содержание регуляторов роста, в мг/л				Частота каллусообразования, в %
	2,4-Д	Кинетин	НУК	БАП	
1	1	1	–	–	>80 %
2	–	–	1	1	>80 %

Экспланты культивировали в условиях термостатируемого помещения (25–27 °С) при относительной влажности воздуха 50–60 %. Частоту каллусо-образования определяли по количеству эксплантов, давших каллус, от обще-го числа эксплантов. В конце пассажа проводили визуальную оценку интен-