

СОССЮРЕЯ ОБЕРНУТАЯ SAUSSUREA INVOLUCRATA KAR. ET KIR. И СОССЮРЕЯ СОЛОНЧАКОВАЯ SAUSSUREA SALSA (PALL.) SPRENG. В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК *IN VITRO*

Асанова Г.К., Шаушеков З.К., Адекенов С.М.

АО «Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия», Караганда, e-mail: phyto_pio@mail.ru

Исследованы особенности индукции каллусогенеза в культуре сосюреи обернутой и сосюреи солончаковой. Проведено изучение стерилизующих агентов (гипохлорит кальция, сулема в различных концентрациях и этиловый спирт) и определен оптимальный режим получения асептических проростков из стерильных семян. Исследовано влияние фитогормонального баланса питательной среды, времени введения эксплантов в культуру *in vitro* и типа экспланта (гипокотиль, семядольный лист, настоящий лист, корень) на индукцию каллусогенеза в культуре изолированных органов у сосюреи обернутой (*Saussurea involucrata* Kar. et Kir.) и сосюреи солончаковой (*Saussurea salsa* (Pall.) Spreng.). Показано, что максимальная частота каллусогенеза *Saussurea involucrata* Kar. et Kir. (до 65%) - наблюдалась при использовании модифицированной питательной среды Мурасиге и Скуга с добавлением фитогормонов: 2 мг/л – ИУК (β-индолилуксусная кислота), 0,5 мг/л – БАП (6-бензиламинопурин). Для каллусогенеза *Saussurea salsa* (Pall.) Spreng. наиболее подходящими являются (до 68%): концентрация фитогормонов 2 мг/л – ИУК, 0,5 мг/л – БАП.

Ключевые слова: культура клеток, *in vitro*, эксплант, *Saussurea involucrata* Kar. et Kir., *Saussurea salsa* (Pall.) Spreng.

SAUSSUREA INVOLUCRATA KAR. ET KIR. AND SAUSSUREA SALSA (PALL.) SPRENG. IN THE *IN VITRO* CELL CULTURE

Asanova G.K., Shaushekov Z.K., Adekenov S.M.

JSC "International Research and Production Holding "Phytochemistry", Karaganda, e-mail: phyto_pio@mail.ru

Peculiarities of callusogenesis induction were investigated in cultures of *Saussurea involucrata* Kar. et Kir. and *Saussurea salsa* (Pall.) Spreng.. Sterilizing agents (calcium hypochlorite, corrosive sublimate in various concentrations, and ethyl alcohol) were studied and the optimum mode of obtaining aseptical sprouts from the sterile seeds was defined. The influence of phytohormonal balance of the nutrient medium, time of explants introduction into the *in vitro* culture and the explant type (hypocotyl, cotyledonary leaf, original leaf, root) was researched on the callusogenesis induction in the culture of isolated organs of *Saussurea involucrata* Kar. et Kir. and *Saussurea salsa* (Pall.) Spreng.. It was shown that the maximum frequency of callusogenesis of *Saussurea involucrata* Kar. et Kir. (up to 65%) had been observed during usage of the modified Murashige and Skoog medium with addition of phytohormones: 2 mg/l – IAA (β-indoleacetic acid), 0,5 mg/l – BAP (6-benzylaminopurine). For *Saussurea salsa* (Pall.) Spreng. callusogenesis the most suitable (up to 68%) concentrations of phytohormones were 2 mg/l – IAA, 0,5 mg/l – BAP.

Keywords: cell culture, *in vitro*, explant, *Saussurea involucrata* Kar. et Kir., *Saussurea salsa* (Pall.) Spreng.

Сохранение биоразнообразия как необходимого условия устойчивости биосферы является фундаментальной проблемой современной науки. Поэтому во всем мире востребовано выявление и изучение видов и популяций, находящихся под угрозой исчезновения. Автономные свойства видов ограничивают их конкурентоспособность, объем фундаментальной экологической ниши и обилие в фитоценозах, влияя тем самым на характер их распространения. Редкость всегда является результатом взаимодействия вида с внешней средой и связана с климатическими условиями и особенностями ландшафта, а также с биотическими и антропогенными экологическими факторами [8].

Род *Saussurea* DC. (Горькуша, Соссюрея) семейства *Asteraceae* насчитывает около 400 видов, распространенных в Евразии и Северной Америке. К этому роду относятся многолетние или реже двулетние травы и полукустарнички. Ряд особенностей делают род *Saussurea* DC. интересным для изучения [3].

Во Флоре Казахстана произрастает 41 вид рода *Saussurea* DC., в пределах Джунгарского Алатау произрастает 21 вид, из них 6 редких [4].

Соссюрея обернутая *Saussurea involucrata* Kar. et Kir. очень редкий вид. Численность повсеместно невысока, встречается одиночными особями или небольшими группами. Растет в альпийском поясе гор на каменистых осыпях, россыпях, среди камней. Встречается на каменистых склонах альпийского пояса и гор юго-восточного Казахстана [4].

Китайскими учеными получена культура клеток *Saussurea involucrata* Kar. et Kir. – источника ряда вторичных метаболитов, обладающих широким спектром биологической активности [5-7; 9-11].

В Международном научно-производственном холдинге «Фитохимия» (г. Караганда, Казахстан) проведены фитохимические и фармакологические исследования экстракта соссюреи солончаковой (*Saussurea salsa* (Pall.) Spreng.), как одного из близких видов, широко распространенных в Казахстане. Разработан опытно-промышленный регламент на получение из этого растения фитопрепарата «Саусалин», обладающего противоописторхозной, антирихмонадной, противопаразитарной активностью [1]. Поэтому работа, направленная на комплексное исследование в условиях *in vitro* потенциально перспективных видов растений рода *Saussurea* DC., является актуальной.

Целью данной работы является изучение двух видов рода *Saussurea* DC.: соссюрея обернутая (*Saussurea involucrata* Kar. et Kir.) и соссюрея солончаковая (*Saussurea salsa* (Pall.) Spreng.) в условиях *in vitro*.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили семена двух видов рода *Saussurea* DC. (Горькуша, Соссюрея); соссюрея обернутая (*Saussurea involucrata* Kar. et Kir.) и соссюрея солончаковая (*Saussurea salsa* (Pall.) Spreng.). В качестве эксплантов были использованы 15-20-дневные проростки, выращенные в асептических условиях. Семена, отобранные для посадки, предварительно стерилизовали и высевали в чашки Петри с агаризованным субстратом. В качестве стерилизующих агентов использовали гипохлорит кальция, сулему и этиловый спирт. Перед стерилизацией семена очищали и замачивали в 10%-ном растворе SDS (содиумдодецилсульфат натрия), после три раза промывали дистиллированной водой. Следующие этапы стерилизаций семян проводятся в ламинарном боксе: погружение семян в раствор гипохлорита кальция на 5 минут или в 0,1%-ный раствор сулемы на 3 и 5 минут, 3-

кратное промывание стерильной дистиллированной водой, погружение семян в 80%-ный этиловый спирт на 5 секунд, удаление спирта, сушка семян, пассирование семян. Полученные асептические проростки из семян разделяли на сегменты и посадили на питательную среду. Полученные из асептических проростков первичные каллусы субкультивировали на модифицированных питательных средах Мурасиге и Скуга, дополненных ИУК (β -индолилуксусная кислота), 6-БАП (6-бензиламинопурин). Цикл выращивания составлял 30 суток. В качестве культуральных сосудов использовали чашки Петри 2x10 см, содержащие 20 мл питательной среды. Экспланты культивировали при комнатной температуре 23-25 °С на свету. Частоту каллусообразования оценивали в процентах по количеству эксплантов, давших каллус, от общего числа эксплантированных [2].

Результаты и обсуждение

Исследования по индукции каллусогенеза в культуре асептических проростков, полученных из семян сосюреи обернутой, показали, что этот процесс в значительной степени зависит от условий стерилизаций, состава питательной среды, типа используемого экспланта.

В таблицах 1 и 2 представлены данные по влиянию стерилизующих агентов на всхожесть семян сосюреи обернутой и сосюреи солончаковой. Определяли степень зараженности семян на 6-е сутки культивирования инородной инфекцией и всхожесть семян через 28 суток.

Таблица 1

Влияние стерилизующих агентов на всхожесть семян сосюреи обернутой

Стерилизующий агент	Концентрация, %	Экспозиция, мин	Степень контаминации, %	Всхожесть семян, %
Гипохлорит кальция	10	5	28±1,5	12±2,3
	20	5	21±3,2	10±1,2
	30	5	08±1,7	18±0,3
	40	5	0	22±4,3
Сулема	0,1	3	0	72±2,4
	0,1	5	0	0
	0,01	3	52±1,8	12±5,2
	0,01	5	06±1,5	12±2,3

Таблица 2

Влияние стерилизующих агентов на всхожесть семян сосюреи солончаковой

Стерилизующий агент	Концентрация, %	Экспозиция, мин	Степень контаминации, %	Всхожесть семян, %
Гипохлорит кальция	10	5	31±3,5	09±2,8
	20	5	19±1,5	12±2,4
	30	5	08±4,3	16±3,3
	40	5	0	24±2,6
Сулема	0,1	3	0	68±1,7
	0,1	5	0	0
	0,01	3	32±2,3	30±2,4
	0,01	5	0	08±2,3

После использования стерилизующих агентов и 3-кратного промывания дистиллированной стерильной водой семена сосюреи обернутой и сосюреи солончаковой 5 секунд держали в 80%-ном этиловом спирте, после сушили и пассировали на агаризованный субстрат (агар+H₂O).

Результаты наших исследований показали, что наиболее оптимальными стерилизующими агентами для семян сосюреи обернутой и сосюреи солончаковой являются 0,1%-ная сулема с экспозицией 3 мин, где всхожесть семян сосюреи обернутой составила 72%, и обработка 40%-ным гипохлоритом кальция с экспозицией 5 мин - 22%.

Оптимальными стерилизующими агентами для семян сосюреи солончаковой являются обработка 40%-ным гипохлоритом кальция с экспозицией 5 мин, где всхожесть семян составила 24%, и 0,1%-ная сулема с экспозицией 3 мин - 68%. Остальные дозы концентрации стерилизующих агентов были менее эффективными или приводили к гибели семян либо к их заражению.

Асептические проростки, достигшие нужного состояния, в стерильных условиях разделяли на сегменты (гипокотиль, семядольный лист, настоящий лист и корень) и культивировали на модифицированной питательной среде Мурасиге - Скуга с добавлением разных концентраций фитогормонов для определения индукции каллусогенеза, данные представлены в таблицах 3, 4.

Таблица 3

Зависимость степени каллусогенеза сосюреи обернутой от выбранного экспланта и концентрации фитогормонов

Экспланты	Концентрация фитогормонов, мг/л			
	ИУК -2 БАП – 0,5	ИУК -2 БАП – 2	НУК -2 БАП – 0,5	2,4 Д -2 БАП – 0,5
Семядольные листья	65 ± 2,4 %	43 ± 0,8%	33 ± 1,5%	12 ± 2,4%
Настоящие листья	45 ± 1,3 %	37 ± 0,7%	16 ± 2,4%	0%
Гипокотиль	31 ± 1,5%	25 ± 1,3%	29 ± 0,6%	10 ± 1,8%
Корень	08 ± 1,2%	0%	0%	0%

Из полученных данных видно, что сравнительно активными эксплантами оказались семядольные листья стерильных проростков сосюреи обернутой на модифицированной питательной среде Мурасиге и Скуга с содержанием 6-БАП 0,5 мг/л, ИУК 2 мг/л. На этой среде наблюдался процесс каллусогенеза на 7-е сутки культивирования. Каллус, индуцированный из семядольных листьев сосюреи обернутой, имел светло-зеленую окраску, характеризовался рыхлой консистенцией. При визуальном анализе отличался относительной гомогенностью структуры. После 30 суток культивирования каллус сосюреи обернутой пересаживали на свежую питательную среду. Для пассирования каллуса использовали питательную среду того же состава, что и для индукции первичного каллуса.

Процесс привлечения молодых хлорофиллсодержащих клеток к делению и последующей дифференцировке осуществлялся по классической схеме. Активное деление клеток с формированием первичного каллуса отмечалось по периферии листа, с последующим движением процесса к центру. Пассированный каллус морфологически не отличался от первичного (рис. 1).



Рис. 1. Каллусные ткани сосюреи обернутой

При культивировании сегментов гипокотыля, семядольного и настоящего листа и корня было установлено, что через 10-15 суток на некоторых питательных средах началась индукция каллусной ткани сосюреи солончаковой. При анализе влияния фитогормонального состава питательной среды на процесс индукции каллусогенеза было испытано 4 варианта среды Мурасиге и Скуга (дополненной различными концентрациями фитогормонов). Установлено, что самым активным эксплантом для каллусогенеза оказался семядольный лист стерильных проростков сосюреи солончаковой на среде Мурасиге и Скуга, с добавлением фитогормонов ИУК 2 мг/л, 6-БАП 0,5мг/л. На других вариантах сред индукция каллусогенеза проходил значительно ниже. Следует отметить, что на среде Мурасиге и Скуга образовался каллус корня в сочетаниях фитогормонов ИУК -2 мл/л, БАП – 2 мл/г. Полученные данные по зависимости степени каллусогенеза от типа экспланта и концентрации фитогормонов представлены в таблице 4.

Таблица 4

Зависимость степени каллусогенеза сосюреи солончаковой от выбранного экспланта и концентрации фитогормонов

Экспланты	Концентрация фитогормонов, мг/л			
	ИУК -2 БАП – 0,5	ИУК -2 БАП – 2	ИУК -2 БАП – 0,5	2,4 Д -2 БАП – 0,5
Семядольные листья	68 ± 3,6%	38 ± 2,6%	18 ± 0,6%	07 ± 2,4%
Настоящие листья	39 ± 2,3%	28 ± 2,5%	42 ± 3,5%	0%
Гипокотиль	51 ± 3,8%	42 ± 1,8%	19 ± 0,4%	10 ± 1,8%
Корень	0%	09%± 2,5%	0%	0%

Каллус, полученный из разных типов эксплантов, почти не отличался по морфологическим характеристикам. На испытанных вариантах питательных сред с различной модификацией фитогормонов формировался рыхлый, средне-глобулярный каллус светло-зеленого цвета (рис. 2).



Рис. 2. Каллусные ткани сосюреи солончаковой

В результате экспериментов были получены первичные каллусы из различных органов двух видов: сосюреи обернутой и сосюреи солончаковой, которые планируются использовать для исследования их способности к регенерации растений, что является дальнейшим этапом разработки клеточной технологий создания нового исходного материала для микроклонального размножения.

Выводы

Определен оптимальный режим получения асептических культур из семян сегментов гипокотилия, семядольного и настоящего листа и корня сосюреи обернутой и сосюреи солончаковой – последовательной обработкой 1%-ной сулемой с экспозицией (3 мин), где всхожесть семян сосюреи обернутой составила 72%, и обработкой 40%-ным гипохлоритом кальция с экспозицией (5 мин) - 22%.

Оптимальным стерилизующим агентом для семян сосюреи солончаковой являются обработка 40%-ным гипохлоритом кальция с экспозицией (5 мин), где всхожесть семян составила 24%, и 0,1%-ная сулема с экспозицией (3 мин) - 68%.

Установлено, что на индукцию каллусогенеза сосюреи обернутой *in vitro* оказывали влияние гормональный состав питательной среды и тип экспланта (гипокотиль, семядольный и настоящий лист и корень). Максимальная частота образования каллуса (до 72%) с хорошим приростом наблюдалась при использовании среды Мурасиге и Скуга, с добавлением ИУК 2 мг/л, 6-БАП 0,5 мг/л.

Выявлено, что самым активным эксплантом для каллусогенеза оказался семядольный лист стерильных проростков сосюреи солончаковой на среде Мурасиге и Скуга, с добавлением фитогормонов ИУК 2 мг/л, 6-БАП 0,5 мг/л. На других вариантах сред индукция

каллусогенеза проходила значительно ниже. Следует отметить, что на среде МС образовался каллус корня в сочетаниях фитогормонов ИУК -2 мл/л, БАП – 2 мл/г.

Таким образом, разработанная методика культивирования сосюреи обернутой и сосюреи солончаковой позволила получить длительно растущую каллусную культуру.

Список литературы

1. Адекенов С.М. Евразийский патент № 023377 от 31.05.2016 г. // Способ получения противоямблиозного и противоописторхозного средства из сосюреи солончаковой *Saussurea salsa* (Pall.) Spreng.
2. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. - М. : ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
3. Липшиц С.Ю. Род *Saussurea* DC. (Asteraceae). – Л. : Наука, 1979. – 283 с.
4. Филатова Н.С. Сосюрея (Горькуша) *Saussurea* DC. Иллюстрированный определитель растений Казахстана. – Алма-Ата : Наука, 1972. – Т. 2. – С. 397-404.
5. Chao-Lin Kuo, Dinesh-Chandra Agrawal, Hung-Chi Chang, Ya-Ting Chiu, Chu-Peng Huang, Yi-Lin Chen, Shih-Hung Huang and Hsin-Sheng Tsay. *In vitro* culture and production of syringin and rutin in *Saussurea involucrata* Kar. et Kir. – an endangered medicinal plant // Botanical Studies. – Vol. 56. – 2015. – P. 12-20.
6. Guo B., Gao., Liu C.Z. In vitro production of an endangered medicinal plant *Saussurea involucrata* Kar. et Kir. // Plant Cell Rep. – 2007. – Vol. 26. – P. 261-265.
7. Ma H.P., Fan P.C., Jing L.L. et al. Anti-hypoxic activity at simulated high altitude was isolated in petroleum ether extract of *Saussurea involucrata* // Journal of Ethno pharmacology. – 2011. – Vol. 137 (3). – P. 1510-15.
8. Parry M.L., Canziani O.F., Palutikof J.P. Climate Change: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment. Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). – Cambridge : Cambridge University Press, 2007. – 976 p.
9. Wai-I Chik, Lin Zhu, Lan-Lan Fan et al. *Saussurea involucrata*: A review of the botany, phytochemistry and ethnopharmacology of a rare traditional herbal medicine // Journal of Ethno pharmacology. – 2015. – Vol. 172. – P. 44-60.
10. Way T.D., Lee J.C., Kuo D.H. et al. Inhibition of epidermal growth factor receptor signaling by *Saussurea involucrata*, a rare traditional Chinese medicinal herb, in human hormone-resistant prostate cancer PC-3 cells // J. Agric. Food Chem. – 2010. – Vol. 58 (6). – P. 3356-3365.

11. Yang J., Wang R., Liu L., Shi Y. Phytochemicals and biological activities of *Saussurea* species // J. Asian Nat. Prod. Res. – 2010. – Vol. 12. – P. 162-175.