

УДК 631.147+631.526.3+631.527

Редакционная коллегия:

академик НАН Беларуси В.Н. Решетников (отв. редактор), д.б.н. В.В. Титок (отв. редактор), к.б.н. Е.В. Спиридович, к.б.н. Т.И. Фоменко, к.б.н. А.А. Кузовкова

Биотехнологические приемы в сохранении биоразнообразия и селекции растений: материалы международной научной конференции 18–20 августа 2014 г., Минск. — Минск: ГНУ «Центральный ботанический сад Академии наук Беларуси», 2014.—277 с.

В сборник вошли материалы Международной научной конференции, посвященной актуальным проблемам сохранения биоразнообразия, селекции растений с использованием биотехнологических приемов, представленные учеными Беларуси, России, Украины, Казахстана, Сербии, Литвы, Молдовы, Таджикистана и Узбекистана.

УДК 631.147+631.526.3+631.527

ГНУ «Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси», 2014 г.

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *DIGITALIS L.*

Бердичевец Л.Г., Фоменко Т.И.

ГНУ «Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси»,

Минск,

e-mail: fomenko_ti@mail.ru

Ключевые слова: культура клеток, микрклональное размножение, морфогенез, наперстянка

Введение. Культура клеток как экспериментально созданная биологическая система, являясь моделью исследований клетки *in vitro*, нашла широкое использование в самых разнообразных фундаментальных и прикладных исследованиях [1,2]. В современной фармакотерапии сердечно-сосудистых заболеваний широко применяются препараты, сырьевой основой которых является наперстянка (*Digitalis sp.*), принадлежащая к семейству норичниковых (*Scrophulariaceae*). Объектом исследования явились 3 вида растений наперстянки: пурпурная (*D. purpurea L.*), шерстистая (*D. lanata Ehrh*) и крупноцветковая (*D. grandiflora Mill.*). Надземная часть растения содержит стероидные гликозиды (дигитоксин, β -ацетилдигитоксин, дигитонин, гитоксин, гитонин), а также ряд генуинных гликозидов (пурпуреагликозиды А и В), которые в процессе сушки и хранения наперстянки пурпурной превращаются в основные (вторичные) гликозиды. Кроме того, растение содержит ряд органических кислот, сапонины, флавоноиды, холин и другие соединения.

Для получения асептической культуры исследуемых видов наперстянки экспериментально подобран оптимальный способ стерилизации, при котором растительные ткани получают наименьшие повреждения от стерилизующих агентов при достаточно высоком проценте неинфицированных семян [3]. В качестве стерилизующих агентов были использованы 70% этиловый спирт, 0,01% раствор перманганата калия, 0,1% раствор диацета и 10% гипохлорит кальция. Время стерилизации было подобрано экспериментально и для варианта с использованием 0,1% раствора диацета составило 10 минут, а для варианта с использованием 10% раствора гипохлорита кальция – 20 минут. Наилучшие результаты были получены при последовательной обработке семян 0,01% раствором перманганата калия (5 мин.), 70% этиловым спиртом (1 мин.) и 0,1% раствором диацета (10 мин.) с последующей пятикратной промывкой стерильной дистиллированной водой. Такая обработка семян обеспечивает 100% стерильность с сохранением при этом сравнительно высокой всхожести: *D. lanata* – 70%, *D. purpurea* – 92%, *D. grandiflora* – 85%. Стерильные семена помещали на чашки Петри со средой МС и проращивали в темноте при 24,5°C. После прорастания семян их переносили на свет в люминостат и культивировали при 20-22°C, освещенности 3000 лк и 16-часовом фотопериоде. Через месяц введенные в культуру *in vitro* растения пересаживали на свежую питательную среду.

Для микроклонального размножения наперстянки использовали среды, отличающиеся по минеральному составу, — В5, МС и 1/2МС (с половинной концентрацией солей среды МС). Отмечено, что растения, культивируемые на этих средах, по фенотипу не отличались друг от друга. Добавление в среду культивирования α -НУК (0,05 и 0,1 мг/л) стимулировало образование более развитой корневой системы. В дальнейшем при микроклональном размножении наперстянки был использован метод активации пазушных меристем, широко применяемый на других культурах [4,5]. При культивировании исследуемых видов наперстянки на средах, содержащих БАП в концентрациях 1, 2, 4 и 6 мг/л, наблюдалась активная пролиферация пазушных меристем. С увеличением в среде культивирования БАП наблюдалось увеличение числа образовавшихся побегов. Так, например, если при культивировании *D. purpurea* L. на безгормональной среде число образовавшихся побегов не превышало трех, то при добавлении в среду 1 мг/л БАП среднее число побегов достигало $9,8 \pm 1,7$. Наибольшее количество побегов образовывалось на среде, содержащей 4 мг/л БАП ($24,7 \pm 7,5$). Хотя побеги, образовавшиеся на средах, содержащих 4 и 6 мг/л БАП, отличались меньшими размерами, это не повлияло на процесс их укоренения при последующем культивировании на среде В5, содержащей 0,1 мг/л α -НУК. Процент укоренившихся растений был высоким (100 и 91%, соответственно). В дальнейшем для микроклонального размножения исследуемых видов наперстянки использовали среду, содержащую 4 мг/л БАП (рисунок 1).



Рисунок 1 — Множественное побегообразование у *D. purpurea* L. при культивировании на среде, содержащей 4 мг/л БАП

Индукция морфогенеза. На способность изолированных растительных клеток и тканей к морфогенезу оказывают влияние много факторов: видовая принадлежность исходного растения, тип и функциональное состояние экспланта, температурный и световой режимы культивирования и др. Однако известно, что наиболее мощным индуктором морфогенеза является гормональный состав питательной среды. При разработке способов регенерации наперстянки исследователями успешно были использованы в качестве эксплантов листья и гипокотили. В наших экспериментах были взяты листовые сегменты из разной части листовой пластинки наперстянки. Индукция морфогенеза на эксплантах стимулировалась эндогенными фитогормонами (БАП, кинетин, ИУК и α -НУК).

Сравнение морфогенетического потенциала листовых эксплантов растений наперстянки проводили на средах, базовой основой которых являлась среда В5, содержащая в качестве фитогормонов 0,1 мг/л α -НУК и БАП в концентрациях 1, 2, 4 и 6 мг/л. На первых этапах культивирования на всех типах эксплантов наблюдали образование краевого каллуса, из которого в дальнейшем инициировался морфогенез. Однако для *D. lanata* и *D. purpurea* показано, что на эксплантах, выделенных из нижней части листовой пластинки, процесс морфогенеза шел активнее. На листовых эксплантах *D. grandiflora* при культивировании на этих средах наблюдали инициацию краевого каллуса, частота образования которого не превышала 18,5% и единичное корне- и побегообразование. Только на среде, содержащей 6 мг/л БАП, на листовых эксплантах *D. lanata* в первом пассаже не наблюдалось регенерации побегов (таблица 1).

При этом уже в первом пассаже было отмечено различие между морфогенной активностью исследуемых растений. Частота регенерации побегов на листовых эксплантах *D. purpurea* была выше, чем на эксплантах *D. lanata* во всех рассмотренных вариантах.

Повышение в среде культивирования концентрации БАП оказало положительное воздействие на частоту регенерации, как на начальном этапе культивирования, так и в следующем пассаже. Частота регенерации побегов у *D. purpurea* на среде, содержащей 6 мг/л БАП, была в первом пассаже в 4 раза, а во втором в 1,7 раз выше, чем на среде, содержащей 1 мг/л БАП. Одновременно с увеличением частоты регенерации увеличивалось число образовавшихся побегов на одном экспланте. Среднее число побегов, образовавшихся на листовом экспланте *D. purpurea* на среде, содержащей 6 мг/л БАП, равнялось $2,75 \pm 1,41$ побега, а на среде, содержащей 1 мг/л БАП - $1,96 \pm 0,41$.

Таблица 1 — Морфогенная реакция листовых эксплантов наперстянки на различные концентрации БАП в среде культивирования, содержащей 0,1 мг/л α -НУК

Растение	К-ция БАП, мг/л	Частота регенерации, %			
		побеги		корни	
		1 пассаж	2 пассаж	1 пассаж	2 пассаж
<i>D. purpurea</i>	1	14,3	37,1	81,0	81,0
	2	19,1	40,0	91,0	100,0
	4	42,9	55,9	80,7	100,0
	6	59,1	63,6	95,5	95,5
<i>D. lanata</i>	1	3,8	5,1	4,8	13,9
	2	2,1	9,5	4,3	21,3
	4	2,4	10,6	8,9	45,2
	6	0	12,9	14,6	39,0

На листовых эксплантах *D. lanata* в первом пассаже наибольшая инициация побегов наблюдалась при содержании в среде культивирования 1 мг/л БАП, а при 6 мг/л БАП вообще отсутствовала. Однако во втором пассаже с увеличением в среде культивирования концентрации БАП процесс морфогенеза шел более интенсивно.

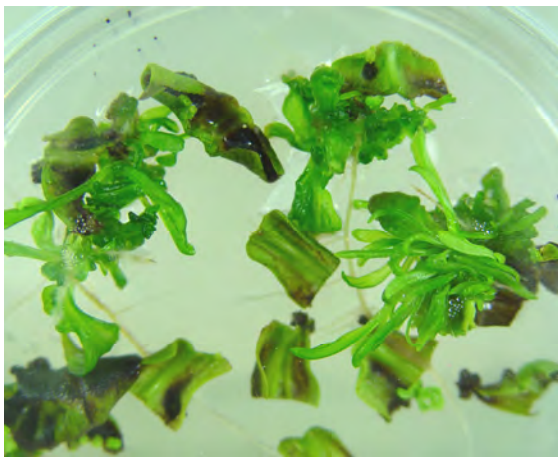
Наряду с побегообразованием на листовых эксплантах *D. lanata* и *D. purpurea* на всех средах наблюдали образование корней. Ризогенная активность во всех рассмотренных вариантах была выше, чем частота образования побегов, и в некоторых случаях достигала 100%. Отмечено, что инициация корнеобразования, как и побегообразования лучше шла у *D. purpurea*. Особенно четко эти различия наблюдались в первом пассаже. Замена в среде культивирования синтетического гормона α -НУК на природный ауксин ИУК в аналогичной концентрации не одинаково повлияла на регенерационную способность листовых эксплантов *D. lanata* и *D. purpurea* (таблица 2).

Таблица 2 — Морфогенная реакция листовых эксплантов наперстянки на различные концентрации БАП в среде культивирования, содержащей 0,1мг/л ИУК

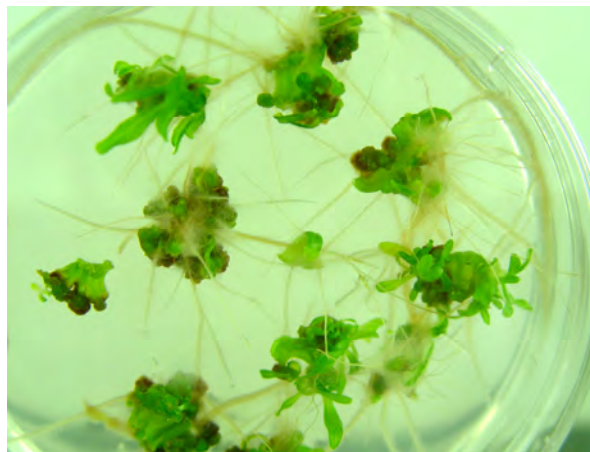
Растение	К-ция БАП, мг/л	Частота регенерации, %			
		побеги		корни	
		1 пассаж	2 пассаж	1 пассаж	2 пассаж
<i>D. purpurea</i>	1	2,1	4,2	2,1	2,1
	2	3,2	3,2	4,0	8,3
	4	3,5	4,7	4,5	8,7
	6	3,1	6,3	5,6	9,4
<i>D. lanata</i>	1	1,3	6,4	0	0
	2	9,4	15,1	1,9	5,6
	4	1,2	2,7	2,6	6,4
	6	0	0	0	0

При культивировании листовых эксплантов *D. lanata* на средах, содержащих в качестве ауксина ИУК, инициация ризогенеза была также, как и у *D. purpurea*, значительно ниже, чем на средах с α -НУК. В вариантах, где в средах содержалось 1 и 6 мг/л БАП, вообще отсутствовало образование корней.

Побегообразование на листовых эксплантах *D. lanata* на среде содержащей 2 мг/л БАП и 0,1 мг/л ИУК, то уже в первом пассаже частота побегообразования на этой среде была в 4,5 раза выше, чем на среде, содержащей α -НУК, и во втором пассаже составила 15,1% (рисунок 2). С увеличением в среде культивирования концентрации БАП частота регенерации побегов на эксплантах *D. lanata* значительно уменьшилась, а при 6 мг/л БАП вообще отсутствовала. В экспериментах замена БАП на кинетин не дала положительного результата.



1



2

Рисунок 2 — Инициация морфогенеза на листовых эксплантах *D. lanata* Ehrh (1) и *D. purpurea* L. (2) на среде, содержащей 2 мг/л БАП и 0,1 мг/л ИУК

На листовых эксплантах *D. lanata*, *D. purpurea* и *D. grandiflora* на средах с различными концентрациями кинетина наблюдалось образование краевого каллуса и лишь единичное образование побегов и корней. Таким образом, оптимальной питательной средой для инициации морфогенеза на листовых эксплантах наперстянки пурпурной (*D. purpurea* L.) является морфогенная среда В5 с 6 мг/л БАП и 0,1 мг/л α -ИУК, а наперстянки шерстистой (*D. lanata* Ehrh) — среда В5 с 2 мг/л БАП и 0,1 мг/л ИУК. Такой подход к культивированию наперстянки способствовал ускоренному размножению этого растения в условиях *in vitro*.

Литература

1. Сохранение растений в генетических банках *in vitro*: преимущества и недостатки / Мамаева Н.А. [и др.] // Бюллетень ГБС.- 2008.- Вып. 194. - С. 141 - 149.
2. Носов, А.М. Культура клеток растений – уникальная система, модель, инструмент. Обзор / А.М. Носов // Физиология растений. – 1999. – Т.46, № 6. – С. 837–844.
3. Калинин, Ф.Л. Методы культуры ткани в физиологии и биохимии растений / Ф.Л. Калинин, В.В. Сарнацкая, В.Е. Полищук // Киев: Наукова думка. – 1980. – 488 с.
4. Катаева, Н.В. Клональное микроразмножение растений. / Н.В. Катаева, Р.Г. Бутенко // М. – 1983. – 96 с.
5. Бердичевец, Л.Г. Микрклональное размножение и морфогенез в культуре *in vitro* представителей рода *Digitalis* L. / Л.Г. Бердичевец, Т.И. Фоменко, И.Н. Бердичевец // Регуляторы роста, развития и продуктивности растений: материалы V междунар. науч. конф. г.Минск, 28-30 ноября, 2007 г. / Минск. – 2007. С. 23.