

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.

**КОЛЛЕКЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ *IN VITRO* ДЛЯ
ФОРМИРОВАНИЯ БАЗЫ РЕСУРСОВ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ВИДОВ**

Т.И. Фоменко, Е.В. Спиридович, И.Ф. Вайновская, Т.В. Мазур
ГНУ «Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси»,
Минск,
e-mail: fomenko_ti@mail.ru

Ключевые слова: губоцветные (Lamiaceae), культура in vitro, цитокинин, побегообразование

Введение. Растительные ресурсы представляют значимость для сельского хозяйства, медицины, декоративного садоводства, но потенциал полезных свойств многих растений пока недостаточно изучен и представляет интерес в будущем. В основе методических подходов изучения коллекций лежит принцип максимального охвата генетического разнообразия, включая дикорастущие виды, интродуцированные

растения, а также коллекционный фонд растений, культивируемых *in vitro* [1,2]. Задача сохранения биоразнообразия может быть выполнена только при использовании всех доступных средств для спасения каждой отдельной популяции, вида, растительного сообщества и мест их обитания, а использование междисциплинарного подхода в этом плане получило название «комплексное сохранение» [3]. В последние десятилетия при решении проблемы сохранения генофонда растений успешно используются методы биотехнологии растений, включающие микроклональное размножение и другие методы *in vitro*, в основе которых лежит уникальная тотипотентность растительной клетки, т.е. способность растения к вегетативной регенерации из соматических клеток [4,5].

Семейство губоцветные (*Lamiaceae* или *Labiatae*) насчитывает 200 родов и 3200 видов во всех зонах земного шара, особенно многочисленны в Средиземноморье, очень немногие - в холодных областях. Для представителей семейства характерен ароматический запах, который определяется присутствием на всех или на некоторых частях растения желёзок, выделяющих эфирные масла сложного состава (в них входят ароматические спирты, фенолы, терпены, альдегиды и другие органические соединения). Именно присутствием этих масел в значительной степени определяется практическое использование губоцветных в качестве технических, лекарственных и ароматических растений [6].

Материалы и методы. Представители семейства *Lamiaceae*: многоколосник морщинистый – *Agactache rugosa* (Fisch. et Mey.) Kuntze, кадило сарматское — *Melitis sarmatica* Klok, шлемник байкальский — *Scutellaria baicalensis* Georgi, шалфей лекарственный — *Salvia officinalis* L.

Многоколосник морщинистый является сильным иммуностимулятором, соперничающим с женьшенем. Все части растения содержат более 0,5% эфирного масла, незначительные количества алкалоидов, холин; флавоноиды, дубильные вещества, аментофлавоны; кислоты - аскорбиновую, кофейную, лимонную, яблочную и следы хлорогеновой. Наличие биофлавоноидов предполагает использование его в качестве антиоксидантного средства. Кадило сарматское - многолетнее травянистое лекарственное растение семейства *Lamiaceae* L., занесенное в Красную книгу Республики Беларусь, представляет большой практический интерес как пряно-ароматическое, эфиромасличное и лекарственное растение. Шлемник байкальский относится к ценным лекарственным растениям с уникальными лечебными свойствами, является эндемиком Даурской экосистемы. Главными действующими веществами шлемника служат флавоноиды, в составе которых производные апигенина, лютеолина, скутелляреина, изоскутелляреина, картемидина и изокартемидина. В корнях обнаружено до 2,5% пирокатехинов. В листьях и стеблях содержится 8,4-10,3% скутелларина. Шалфей лекарственный - противомикробные свойства связаны с эфирным маслом, противовоспалительные - с дубильными веществами, флавоноидными соединениями и витамином Р.

Результаты и обсуждение. Использование методов культуры ткани является оптимальным решением задачи как для размножения видов с затрудненным размножением *in situ* и *ex situ*, так и при массовом производстве ценных генотипов растений из коллекций ботанических садов. Интенсивный рост и развитие культуры *in vitro* зависит от выбора питательной среды, так как генетически и эпигенетически экспланты и каллусные ткани даже в пределах вида часто требуют разных химических и физических условий выращивания *in vitro*.

При введении в культуру *in vitro* немаловажную роль в процессе стерилизации принадлежит подбору стерилизующих соединений, эффективности их концентраций и продолжительности времени обработки с целью освобождения от инфекции и получения высокого выхода жизнеспособных эксплантов. Для стерилизации материала используют различные стерилизующие соединения с различной концентрацией и временем экспозиции. Для каждого вида растения оптимальный режим стерилизации,

способствующий высокому выходу жизнеспособных эксплантов, устанавливается экспериментальным путем. Так наилучшее прорастание семян отмечено при обработке диацидом в течение 5 и 10 мин, хотя процент стерильных семян был ниже, чем при 15 минутной обработке. Стопроцентную стерильность семян также наблюдали при стерилизации 0,1% раствором нитрата серебра. 10% раствор хлорамина и 10% раствор гипохлорита кальция давали меньший процент стерильного материала. Стерильные семена помещали на чашки Петри со средой Мурасиге–Скуга (МС) и проращивали в темноте при 24°C. Культивирование проводили при температуре 20-22°C, освещенности 3000лк и 16-часовом фотопериоде.

Для культивирования наиболее используемыми являются питательные среды Мурасиге-Скуга (МС), Гамборга (В5), на этапе введения обычно используются среды без содержания гормонов, а также для ряда генотипов возможно использования половинного состава солей. В таблице 1 приведены результаты, полученные для стерильной культуры *A. rugosa*. Максимальный процент укорененных растений получен на среде, содержащей ½ минеральной основы МС. Листовая пластинка хорошо развита как на МС среде, так и на ½ МС. На средах В5 и ½ В5 растения были выше, чем на средах МС, однако наблюдалась частичная витрификация, также на этих средах был меньше процент укоренения. Явления витрификации соотносятся исследователями с повышенным уровне содержания азота в среде Гамборга, что подтверждается их отсутствие при использовании половинного состава среды.

Таблица 1 - Состав питательных сред, используемых для культивирования *Agastache rugosa* в условиях *in vitro*

Индекс среды	Высота раст., см	Кол-во укорен. раст., %	Кол-во корней, шт	Ср. длина корней, см
МС	2,74±0,6	71,43	1,88±0,9	3,10±1,6
½ МС	3,54± 0,6	85,71	1,66±1,4	4,74±1,2
В5	3,78±1,5	57,14	1,56±0,9	4,96±1,5
½ В5	3,69±0,9	52,38	1,28±1,1	4,57±1,4

Для получения и поддержания активно растущей культуры *in vitro* весьма важным является правильный выбор цитокинина. Черенки *Agastache rugosa*, *Melittis sarmatica* и *Salvia officinalis* длиной 1,5-2 см культивировали на питательных средах с минеральной основой Мурасиге-Скуга с добавлением цитокининов (6-БАП и кинетина) в различных концентрациях (0,5, 1,5 и 2,0 мг/л) (таблица 2). Продолжительность каждого субкультивирования составляла 40 дней, в процессе исследований измеряли и рассчитывали следующие показатели: 1) коэффициент пролиферации, побег/эксплант; 2) длину побега; 3) образование корней.

Для индукции множественного побегообразования за счет активации пазушных меристем проростки культивировали на средах, содержащих 0,5-2 мг/л БАП. Культивирование проводили в люминостате при 23-24°C, освещенности 3000 лк и 16-часовом фотопериоде. Через 1,5 месяца полученные побеги переносили на идентичную среду для последующего микроклонального размножения или на среду для укоренения (1/2 МС, содержащую 0,5-2 мг/л ИУК).

Таблица 2 – Влияние типа и концентрации цитокинина на рост и развитие представителей семейства *Lamiaceae* (*Agastache rugosa*, *Melittis Sarmatica*, *Salvia officinalis*, *Scutellaria baicalensis* Georgi.)

Вид	Цитокинин, мг/л	Коэффициент размножения, побег/эксплант	Длина побега, см	Образование корней, %
<i>Agastache rugosa</i>	Контроль	1,0±0	5,62±0,31	56,3
	6-БАП			
	0,5	3,2±0,6	2,72±0,95	12,8
	1,5	3,7±0,9	1,85±0,32	4,8
	2,0	8,1±1,4	0,93±0,41	-
	Кинетин			
	0,5	1,1±0,1	4,91±0,93	66,0
	1,5	1,6±0,8	4,45±0,52	33,3
	2,0	2,6±1,2	4,31±1,43	16,6
<i>Melittis sarmatica</i>	Контроль	1,0±0	6,42±1,50	45,4
	6-БАП			
	0,5	1,8±0,3	4,76±1,07	32,1
	1,5	2,4±0,3	3,56±1,14	12,4
	2,0	3,5±0,7	3,84±1,20	-
	Кинетин			
	0,5	1,0±0,2	4,12±0,53	34,1
	1,5	1,2±0,3	3,14±0,81	40,3
	2,0	1,3±0,1	3,87±0,35	37,2
<i>Salvia officinalis</i>	Контроль	1±0	2,94±0,41	58,3
	6 БАП			
	0,5	1,8±0,4	1,42±0,40	12,8
	1,5	4,3±0,9	2,17±0,62	-
	2,0	3,4±0,8	1,56±0,73	-
<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi.	Контроль	1,0±0		
	6-БАП			
	0,5	1,9±0,2	4,15±0,53	14,5
	1,5	5,2±0,3	3,26±0,81	-
	2,0	6,3±0,7	2,85±0,32	-

Исследования показали преимущество 6-БАП по отношению к кинетину. Под воздействием 6-БАП коэффициент размножения существенно превышал значение этого показателя на средах с кинетином. Так, коэффициент размножения для *A. rugosa* варьировал от 3,2 до 8,1, для *M. sarmatica* от 1,86 до 3,5, а для *S. officinalis* от 1,8 до 4,3. Однако длина развивающихся побегов была больше на средах с добавлением кинетина. Увеличение в среде культивирования концентрации цитокинина стимулировало более интенсивное побегообразование. Наличие корневой системы отмечено и в варианте среды с отсутствием гормонов у всех исследуемых растений. У растений *A. rugosa* и *S. officinalis* на средах, содержащих БАП в концентрации 1,5 и 2,0 мг/л БАП, образовывались корни, в то время как у растений *S. officinalis* не было отмечено образования корневой системы. Максимальный коэффициент размножения наблюдали у эксплантов *A. rugosa* и *M. sarmatica* при культивировании их на среде с добавлением 2 мг/л 6-БАП, а у эксплантов *Sc. officinalis* на среде с добавлением 1,5 мг/л БАП. Для *Sc. baicalensis* на средах, содержащих 1,5 и 2,0 мг/л БАП близкие показатели по развитию побегов. Повышение концентрации цитокинина привело к появлению множества пазушных побегов путем активации пазушных меристем, что является

предпочтительным для размножения редких видов, таких как *M. sarmatica*, *Sc. baicalensis*, поскольку позволяет поддерживать генетическую стабильность размножаемых растений.

С целью стимуляции ризогенеза в среду культивирования добавляли ауксины: индолилуксусную (ИУК) и индолилмасляную (ИМК) кислоты. Черенки высаживали на среду ½ МС добавление ауксинов в концентрации 0,5; 1 и 2 мг/л. Показано преимущество ИУК по сравнению с ИМК для растений многоколосника морщинистого и шалфея лекарственного. Наиболее оптимальной оказалась концентрация 1 мг/л ИУК для черенков шалфея лекарственного и 2 мг/л для черенков многоколосника морщинистого. Применение более высоких концентрация ИУК в среде культивирования привело к стимулированию процессов каллусогенеза и уменьшению процента укорененных растений *Salvia*. При этом наиболее оптимальной оказалась среда с содержанием 1 мг/л ИУК, где показатель длины корней средний, однако количество корней на побег близко к максимальному значению. В то же время, на среде, содержащей ИМК, активный ризогенез характерен для растений на средах концентрацией данного гормона 1 и 2 мг/л. Изучение особенностей укоренения выявило преимущество ИУК по сравнению с ИМК для растений многоколосника морщинистого и шалфея лекарственного. Применение более высоких концентрация ИУК в среде культивирования привело к стимулированию процессов каллусогенеза и уменьшению процента укорененных растений *S. officinalis* и *Sc. baicalensis*. Присутствие в среде культивирования ИМК стимулировало процессы каллусогенеза у основания побега, что снижало процент укорененных растений.

Использование клеточных биотехнологий дает возможность массового клонирования элитных сортов и форм растений и получения за достаточно короткий период растений с новыми, в том числе, заданными свойствами. Созданная коллекция лекарственных растений *in vitro* является основой для формирования базы ресурсов перспективных ценных видов и сохранения генофонда лекарственных и пряно-ароматических растений в составе коллекций *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. Глобальная стратегия сохранения растений: материалы Шестой конф. сторон по Конвенции о биологическом разнообразии, Гаага, 19 апреля, 2002 г. – М.: Отдел. Межд. совета бот. садов по охране растений, 2004. – 16 с.
3. Новикова, Т.И. Сохранение редких и полезных растений в коллекции *in vitro* Центрального Сибирского ботанического сада /Т.И.Новикова, А.Ю. Набиева, Т.В.Полубоярова // Вестник ВОГиС.- 2008.- Том 12.- № 4.- С.564-572.
4. Бутенко, Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе / Р.Г. Бутенко. – М.: ФБК-ПРЕСС.- 1999. – 160 с.
5. Биотехнология. Культуры растительных клеток [Электронный ресурс].– 2011.– Режим доступа : <http://www.biotechnolog.ru>.
6. Биологически активные вещества растительного происхождения в 3-х томах. // М., - 2001. - С. 740-760