

УДК 58.085

**РАЗРАБОТКА НАЧАЛЬНЫХ ЭТАПОВ КЛОНАЛЬНОГО
МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ КРАСНОКНИЖНОГО ВИДА
НАПЕРСТЯНКИ КРУПНОЦВЕТКОВОЙ DIGITALIS
GRANDIFLORA M.**

Шушакова Варвара Андреевна

Государственное бюджетное общеобразовательное учреждение города
Москвы «Курчатовская школа», Москва, soltatmih@mail.ru

Аннотация. В работе представлены результаты разработки начальных этапов микроклонирования краснокнижного вида Наперстянки крупноцветковой. В качестве эксплантов использовались семена растения. Разработаны приемы получения асептической культуры эксплантов наперстянки на основе обработки 70% этанолом и 3% перекисью водорода. Наиболее эффективной средой для формирования регенерантов было использование безгормональной среды Мурасиге-Скуга с 1/2 нормой минеральных солей.

Ключевые слова: микроклональное размножение; культура *in vitro*; эксплант; стерилизация; питательная среда.

Shushakova Varvara

(Russia)

**DEVELOPMENT OF THE INITIAL STAGES OF CLONAL
MICROPROPAGATION OF THE RED - BOOK DIGITALIS
SPECIES DIGITALIS GRANDIFLORA M.**

The paper presents the results of the development of the initial stages of microcloning of the red-book species of Digitalis large-flowered. The seeds of the plant were used as explants. Techniques for obtaining an aseptic culture of digitalis explants based on treatment with 70% ethanol and 3% hydrogen peroxide have been developed. The most effective medium for the formation of regenerants was the use of a hormone-free Murashige-Skuga medium with 1/2 the norm of mineral salts.

Key words: microclonal reproduction; *in vitro* culture; explant; nutrient medium.

ВВЕДЕНИЕ

Сохранение биологического разнообразия – одна из важнейших задач, стоящих перед современной наукой. Биоразнообразие прежде всего имеет практическую ценность, так, например, примерно $\frac{1}{4}$ общепризнанных медикаментов получают из растений. При этом возможности получения данных веществ из растений в достаточном количестве часто ограничены, что вызвано принадлежностью многих лекарственных растений к редким видам [9]. Преодолеть сокращение запасов растительных ресурсов возможно благодаря использованию метода микрклонального размножения.

Актуальность: среди современных лекарственных средств препараты наперстянки занимают особое место. Это единственная группа лекарственных веществ, не имеющая химических заменителей, все препараты наперстянки вырабатываются только из растений [6]. При этом *Digitalis grandiflora* M. (наперстянка крупноцветковая) считается редким видом и включена в Красную книгу 11 субъектов РФ. Так, в Удмуртии выявлена всего одна популяция этого растения из 30 особей [5]. Т.о. возникает потребность в разработке биотехнологических методов, при которой осуществлялось бы круглогодичное, независимое от внешних факторов культивирование растения.

Цель работы: разработка начальных этапов клонального микроразмножения краснокнижного вида *Digitalis grandiflora* M. с целью его дальнейшей реинтродукции.

Объект: способность *Digitalis grandiflora* M. к микрклонированию.

Задачи: 1) проверить жизнеспособность имеющегося семенного материала *Digitalis grandiflora* M.,

2) подобрать стерилизующий агент, оказывающий эффективное обеззараживающее действие на вводимый эксплант,

3) определить оптимальные состав питательной среды для культивирования регенерантов наперстянки.

ГЛАВА 1. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ. МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ РАСТЕНИЙ

1.1. ЭТАПЫ И МЕТОДЫ МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ

Преодолеть постоянное сокращение запасов растительных ресурсов можно с помощью методов биотехнологии, одним из которых является клональное микроразмножение. Микроклонирование – это использование техники *in vitro* (лат. «в стекле») для получения неполовым способом растений, генетически идентичных исходному. Метод имеет много преимуществ: 1) получение генетически однородного посадочного материала, 2) оздоровление растений от патогенов и инфекций, 3) высокий коэффициент размножения 4) сокращение продолжительности селекции, 5) размножение растений, трудно размножаемых традиционно, 6) проведение работ круглогодично и экономия площадей [2].

Процесс микроклонального размножения делится на несколько этапов: 1) выбор растения-донора и экспланта, 2) стерилизация культуры в пробирке, 3) получение здоровой, стерильной культуры растения, 4) адаптация растений к почве, 5) выращивание растений в теплице, а затем их подготовка к жизни в естественной среде обитания.

1.2. ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ

Наиболее важным моментом при введении растений в культуру *in vitro* является выбор экспланта, который зависит от жизненной формы, способов размножения и возраста растений-доноров. В качестве эксплантов можно использовать зародыши, семена, вегетативные почки, микропобеги, листовые диски и соматические зародыши. Также успех введения в культуру *in vitro* определяется эффективностью стерилизации исходного материала. Важно стерилизовать экспланты без потери их способности к дальнейшему развитию [1]. Для успешного воспроизведения культуры растений также важны температура и освещенность. Доказана эффективность 16 часового фотопериода

с интенсивностью освещения 1000-5000 люкс при температуре 23-25°C [3]. Ещё один немало важный этап это создание правильной питательной среды для растения, которая должна содержать все нужные элементы [2].

1.3. СОСТАВ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

Любая ткань растений - это сообщество клеток, и если она изолирована из целого организма, то лишена его регулирующего воздействия и питания. Одним из принципов метода культуры тканей (клеток) является воспроизведение *in vitro* условий, близких или идентичных тем, в которых клетки находятся на материнском растении.

Важными элементами питательных сред являются: 1) макро- и микроэлементы, наиболее значимы из них N, P, K, Fe, Zn и др., 2) углеводы, чаще всего сахара, глюкоза, фруктоза 3) витамины, чаще всего тиамин, рибофлавин, пантотеновую, аскорбиновую кислоты, 4) фитогормоны [7].

В настоящее время существует большое количество различных прописей питательных сред для культивирования изолированных тканей и клеток. Наиболее часто используются среды Мурасиге и Скуга, Хеллера, Кнопа, Уайта.

Питательная среда Мурасиге-Скуга – отличается повышенной концентрацией в ее составе неорганического N и K. Питательная среда Уайта содержит значительно меньше (в 2-4 раза) N, K, P, минеральных солей и сахаров, полностью исключается содержание цитокининов [5].

1.4. БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА *DIGITALIS GRANDIFLORA* M.

Digitalis grandiflora M. - относится к семейству норичниковые и представляет собой. Наибольший выход лекарственного сырья может быть получен у 4 – летних растений [8]. Семена не имеют периода покоя, оптимальная температура прорастания 20-30°C. [4].

Наперстянка считается редким видом, имеет 2 категорию угрожаемого

состояния, включена в Красную книгу 11 субъектов Российской Федерации. В Удмуртии имеется всего одно местонахождение вида в окрестности пос. Яган Малопургинского района (на открытом травянистом склоне и на поляне в дубраве). Общая площадь ценопопуляции составляет около 200 кв.м., которая представлена небольшим числом особей, менее 30 экземпляров[5].

Листья наперстянки содержат 23 сердечных гликозида: дигитоксин, гитоксин, дигоксин и др., а также органические кислоты, сапонины, флавоноиды. При сердечной недостаточности эффект от применения наперстянки снижает частоты сокращений сердца, увеличивает силы сокращения миокарда, удлиняет период расслабления отделов сердца [8, 10].

ВЫВОД ПО ПЕРВОЙ ГЛАВЕ

Среди лекарственных средств препараты наперстянки занимают особое место, так как вырабатываются только из растений. При этом возможности получения данных веществ из растений в достаточном количестве ограничены. Так, в Удмуртии имеется только одна популяция наперстянки крупноцветковой в количестве 30 особей. В связи с этим большой интерес в качестве источника биологически активных веществ представляют культуры растительных клеток.

ГЛАВА 2. ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа проводилась на базе кафедры ботаники, зоологии и биоэкологии УдГУ в июле-ноябре 2020 года. Исследования проводились в асептических условиях в ламинар-боксе по общепринятым методикам. Данная работа посвящена начальным этапам микроклонирования и включает в себя следующие этапы: 1) проверка семян наперстянки на всхожесть; 2) выбор схемы стерилизации эксплантов; 3) подбор оптимальной питательной среды для получения жизнестойких регенерантов наперстянки (рисунок 1 Приложение 1).

2.1. ПРОВЕРКА СЕМЯН НА ВСХОЖЕСТЬ

Материалом данного исследования были зрелые семена наперстянки, собранные из природной популяции в Удмуртии в 2015, 2017 и 2020 гг. Семена использовались в качестве первоначальных эксплантов, т.к. использование надземных и подземных частей растений сильно ограничено ввиду небольшого объема и загрязненности подобного материала. Также растения, регенерированные из нуцеллярного каллуса, обычно свободны от вируса, так как патогены редко передаются через семена. Кроме того, на сегодня одним из эффективных и распространенных методов сохранения растительного генофонда является создание генетического банка семян.

Наиболее важным показателем качества семян является их всхожесть. Всхожесть – это количество (в %) нормально проросших семян за определенный период времени [1, 2].

Проращивание семян проводили в лабораторных условиях при температуре 18–25°C и естественном освещении по 40 шт. Семя считали проросшим при наличии корешка, размер которого равен семени. Полученные результаты представлены в таблице 1 Приложения 2.

Установлено, что семена наперстянки крупноцветковой отличаются низкой всхожестью, которую они сохраняют до трех лет. При дальнейшем хранении семян значение всхожести падает практически до нуля. *Поскольку*

семена 2015 и 2017 гг. имели низкую всхожесть для микроклонирования подойдут только семена, собранные в 2020 году.

2.2. ВЫБОР СХЕМЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ ЭКСПЛАНТОВ

В данной работе материал стерилизовали в условиях ламинар-бокса по схеме: 1 мин. в 70% этаноле, 10 мин. в дистиллированной воде и 20 мин. в 3% перекиси водорода. Дальнейшее выращивание осуществлялось на свету (3500 люкс) с фотопериодом 16 ч день/8 ч ночь. Для установления эффективности стерилизации экспланты осматривались на отсутствие экзофитной инфекции, о наличии которой судили по изменению цвета среды, образованию колоний или грибницы и спороношению. По выбранной схеме был получен высокий процент стерильного материала: выживаемость эксплантов составила до 64%, количество инфицированных проростков не более 5%. Полученные результаты приведены в таблице 2 Приложения 3.

Т.о. доказана эффективность следующей схемы стерилизации эксплантов: двухступенчатая обработка 70% этанолом (1 мин) и 3% раствором перекиси водорода (20 мин).

2.3. ВЫБОР ОПТИМАЛЬНОЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ

Подготовку и стерилизацию питательной среды для введения в культуру *in vitro* проводили в соответствии со стандартным протоколом [1]. Для работы были взяты следующие безгормональные среды: 1) по прописи Мурасиге-Скуга (MS), 2) по прописи Мурасиге-Скуга с 1/2 минерализацией (1/2 MS), 3) среда Уайта (У), 4) агар. Состав сред представлен в таблицах 3,4 Приложения 4.

Побеги культивировали на свету (3500 люкс) с фотопериодом 16 ч день/8 ч ночь по 40 эксплантов. Наблюдение производилось на протяжении 30 суток. Отмечались сроки всходов семян с момента закладки, процент проросших семян, изучалась динамика роста, продолжительность этапов и особенности развития на каждом из них.

В ходе исследования установлено, что рост проростков зависит от

концентрации минеральных солей, недостаток или избыток которых может тормозить развитие растений. Наиболее высокую выживаемость наперстянка показала на средах с невысокой общей концентрацией солей: $\frac{1}{2}$ MS, Уайта и агаре. Это можно объяснить повышенным содержанием в традиционной среде Мурасиге-Скуга аммонийного азота и калия. Есть сведения, что при прорастании семян с небольшим запасом углеводов, избыточное поступление аммония в растения оказывает негативное действие. Аммонийный азот не успевает использоваться для синтеза аминокислот, накапливается в тканях растения и вызывает их отравление [7]. Кроме того, в средах Уайта, $\frac{1}{2}$ MS и агаре большее количество воды, что жизненно необходимо семенам в фазе набухания. При этом по скорости появления проростков среда Уайта «проигрывает» среде $\frac{1}{2}$ MS. Также исследованием выявлено, что на полностью бессолевой среде (агар) положительный результат не был достигнут, а именно выявлены аномалии в развитии проростков. Данный факт можно объяснить недостатком полного набора элементов питания микрорастений. Сравнительный анализ всхожести семян наперстянки в зависимости от состава питательных сред представлен на рисунке 2 в Приложении 5.

ВЫВОДЫ ПО ВТОРОЙ ГЛАВЕ

1. Семена наперстянки отличаются низкой всхожестью, которую они сохраняют до трех лет. При дальнейшем хранении семян значение всхожести падает практически до нуля.
2. Семена наперстянки возможно использовать для получения стерильных интактных растений, которые в свою очередь в дальнейшем можно использовать для дальнейшего культивирования.
3. Для введения в культуру *in vitro* семян наперстянки эффективен способ стерилизации, заключающийся в двухступенчатой обработке 70% раствором этанола (1 мин), затем 3% раствором перекиси водорода (20 мин).
4. Оптимальной питательной средой для формирования интактных растений наперстянки крупноцветковой было использование безгормонального питательного раствора, содержащего $\frac{1}{2}$ минеральных солей MS.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы доказано, что наперстянка является оптимальным объектом для микрклонального размножения, так как принадлежит к редким видам, имеет огромную практическую ценность и испытывает затруднения в размножении традиционным способом. Установлено, что методика *in vitro* применима для краснокнижного растения *Digitalis grandiflora* M.

Установлено, что семена наперстянки возможно применять для получения стерильных интактных растений. Разработаны приемы получения асептической культуры эксплантов наперстянки на основе двухступенчатой обработки 70% раствором этанола и 3% раствором перекиси водорода. Наиболее эффективной средой для формирования интактных растений наперстянки крупноцветковой было использование безгормональной среды Мурасиге-Скуга с $\frac{1}{2}$ минерализации.

Разработка начальных этапов культивирования вида позволит в дальнейшем осуществить полную технологию его клонального микроразмножения для решения проблемы сохранения вида. В результате возможно будет получить растения, трудноразмножаемые традиционным способом, проводить работы в течение круглого года при этом экономить площади и автоматизировать процесс выращивания.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе. – М. : ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
2. Коростелева Н.И. Биотехнология: учебное пособие / Н.И. Коростелева, Т.В. Громова, И.Г. Жукова. - Барнаул: Изд-во АГАУ, 2006. - 127 с.
3. Тимофеева О.А., Невмержицкая Ю.Ю. Клональное микроразмножение растений. Учебно-методическое пособие. – Казань: Казанский университет, 2012. – 56 с.
4. Смольникова Я.В. Культивирование *DIGITALIS PURPUREA L.* В условиях *invitro* и получение сердечных гликозидов на ее основе: Автореф...дис.кан.тех.наук. - К.:2012.-22 с.
5. Баранова О.Г., Дедюхина О.Н., Крамарь О.А., Маркова Е.М., Яговкина О.В. Сравнительный анализ развития особей ряда редких видов растений в культуре и природной флоре Удмуртии // Вестник Удмуртского университета. Серия «Биология. Науки о Земле». 2009. №1.
6. Величко Н. А., Смольникова Я. В. Влияние стрессогенных факторов на каллусную ткань *Digitalis purpurea L* // Вестник КрасГАУ.
7. Иванова Н.Н., Митрофанова И.В., Митрофанова О.В. Методические основы клонального микроразмножения некоторых декоративных культур // Сборник научных трудов ГНБС. 2014. №138.
8. Оконешникова Т.Ф., Михалищев Р.В., Палтусова М.В. Интродукция редких видов флоры Свердловской области, перспективных для практического использования // АБУ. 2018. №1 (168).
9. Болотова Н.Л. Биологическое разнообразие и проблемы его сохранения//https://spbrc.ru/ru/councils/ecology/school_science/bio_diversity (дата обращения 01.09.2020)
10. Лекарственные растения. Интернет-журнал о лекарственном растениеводстве, фармакогнозии и медицине/Электронный ресурс/Режим доступа <https://lekrs.ru/digitalis> (дата обращения 01.09.2020).



Рисунок 1. Биотехнологическая схема клонального микроразмножения *Digitalis grandiflora* M. (Схема эксперимента)

Определение всхожести семян наперстянки крупноцветковой

	Семяна 2015 г.		Семяна 2017 г.		Семяна 2020 г.			
	Кол-во проростков, шт	Всхожесть, %	Кол-во проростков, шт	Всхожесть, %	Кол-во проростков, шт	Кол-во проростков, шт	Всхожесть, %	Всхожесть, %
					1 повтор	2 повтор	1 повтор	2 повтор
14 день	0	0	8	20	30	29	75	72,5

Влияние способа стерилизации на семена наперстянки крупноцветковой

Количество проросших семян, шт				Кол-во инфицированных проростков, шт	Кол-во непроросших семян, шт
7 сутки	10 сутки	15 сутки	21 сутки		
30	48	67	77	6	37

Вариации питательных сред для МКР. Среда по прописи Мурасиге-Скуга

Компонент среды	Концентрация в средах, мг/л	Концентрация в маточных растворах, мг
KNO ₃	1900	19000
NH ₄ NO ₃	1650	16500
MgSO ₄ ×7H ₂ O или MgSO ₄ безводный	370	3700
CaCl ₂ ×2H ₂ O или CaCl ₂ безводный	440	4400
KH ₂ PO ₄	170	1700
H ₃ BO ₃	6,2	62
MnSO ₄ ×4H ₂ O	22,3	223
ZnSO ₄ ×4H ₂ O	8,6	86
Na ₂ MoO ₄ ×2H ₂ O	0,25	2,5
CuSO ₄ ×5H ₂ O	0,025	0,25
CoCl ₂ ×6H ₂ O	0,025	0,25
FeSO ₄ ×7H ₂ O	27,8	278
Na ₂ ЭДТА	37,3	373
KJ	0,83	8,3
Мезоинозит	100	-
Тиамин гидрохлорид	0,5	5
Пиридоксин гидрохлорид	0,5	5
Никотиновая кислота	0,5	5
Сахароза	30 000	-

Таблица 4

Вариации питательных сред для МКР. Среда Уайта

Компоненты	Содержание, мг/л	Компоненты	Содержание, мг/л
Ca(NO ₃) ₂	200	CuSO ₄ ×5H ₂ O	0,02

Продолжение Таблицы 4

$MgSO_4$	360	$ZnSO_4$	1,5
Na_2SO_4	200	$Na_2MoO_4 \times 2H_2O$	0,0025
KNO_3	80	KI	0,75
KCl	65	Пиридоксин-НСI	0,1
NaH_2PO_4	16,5	Тиамин-НСI	0,1
H_3BO_3	1,5	Никотиновая кислота	0,5
$MnSO_4$	4,5	Глицин	3,0
$Fe(SO_4)_3$	2,5	Сахароза	20.000

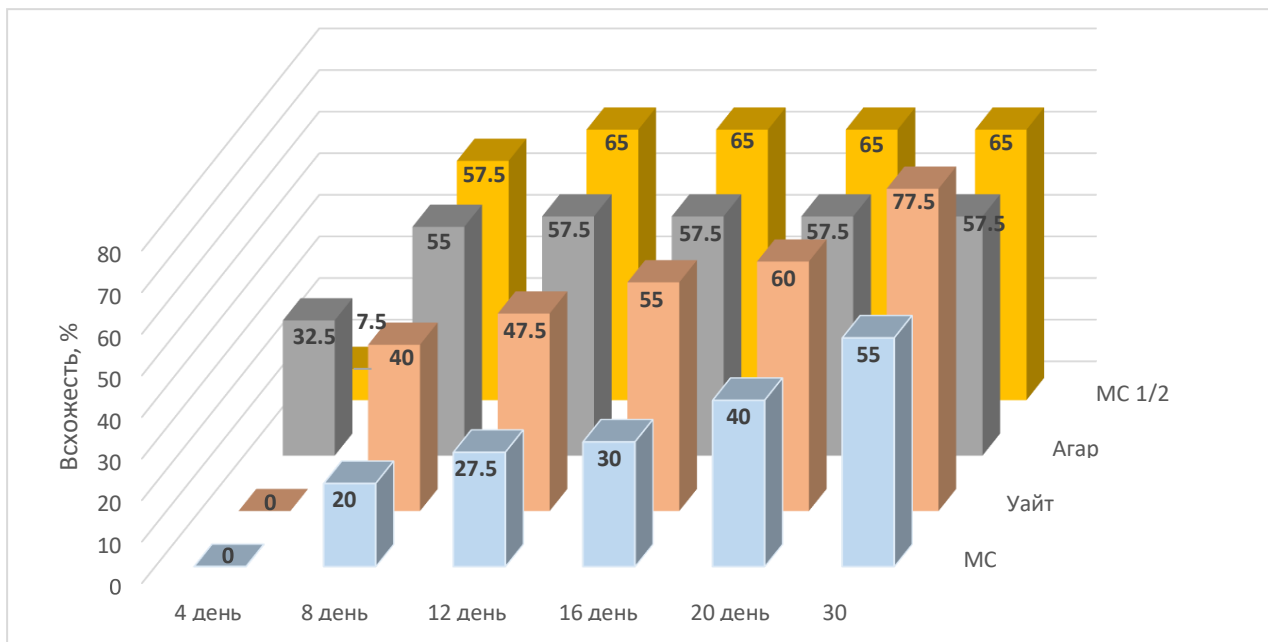


Рисунок 2. Сравнительный анализ всхожести семян наперстянки крупноцветковой в зависимости от состава питательных сред