

ГЕНЕТИКА, ЦИТОЛОГИЯ И РЕПРОДУКТИВНАЯ БИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 635.92:581.143.6

ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* ШЛЕМНИКА БАЙКАЛЬСКОГО

А. А. Зарипова

Ботанический сад-институт Уфимского научного центра РАН
Россия, 450080, Уфа, ул. Менделеева, д. 195, корп. 3
E-mail: zaripova.al@mail.ru

Поступила в редакцию: 15.12.15 г.

Введение в культуру *in vitro* шлемника байкальского. – Зарипова А. А. – В статье представлены начальные этапы размножения лекарственного вида растения шлемника байкальского *in vitro*. Предложена схема дезинфекции семян, позволяющая получать 67,2% жизнеспособных эксплантов. Подобрана питательная среда для побегообразования с коэффициентом мультипликации равным 10,2.

Ключевые слова: шлемник байкальский, культура *in vitro*, стерилизация эксплантов, побегообразование.

Introduction to *in vitro* culture of *Scutellaria baicalensis*. – Zaripova A. A. – The article presents the initial stages of propagation *in vitro* of medicinal plant species of *Scutellaria baicalensis*. The scheme of disinfection of seeds, allowing to obtain 67,2% of viable explants, is proposed. The nutrient medium that allows for shoot formation with the ratio of multiplication at 10,2, was selected.

Key words: *Scutellaria baicalensis*, culture *in vitro*, sterilization of explants, the shoot formation.

Шлемник байкальский (*Scutellaria baicalensis* Georgi) – травянистое многолетнее лекарственное растение, принадлежащее к семейству Губоцветные (*Lamiaceae* Lindl.). Лечебными свойствами обладают и в медицине используют корни взрослых, имеющих 5–6 стеблей, особей. Естественный ареал вида – Дальний Восток, Монголия, очагами встречается в Иркутской области и Забайкалье (Атлас..., 1976). В связи с

ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* ШЛЕМНИКА БАЙКАЛЬСКОГО

исключительной ценностью корней, ограниченным ареалом, относительно малыми природными запасами, медленными темпами возобновления роста растений в естественных зарослях (5–10 лет) (Красная книга..., 2008) и сложностью получения экологически чистого сырья появилась необходимость получения культуры *S. baicalensis* в условиях *in vitro*.

Целью данной работы являлась разработка приемов введения *S. baicalensis* в условия *in vitro* для получения устойчивой пролиферирующей культуры и определения потенциальных возможностей для массового размножения.

Материал и методы

Материалом для асептической культуры служили полноценные семена *S. baicalensis* (Каталог..., 2012). В качестве вторичных эксплантов использовали части проростков. С помощью скальпеля из полученных стерильных проростков асептически отделяли гипокотиль и эпикотиль.

Растительный материал отмывали в мыльном растворе в течение 20 мин и споласкивали в проточной воде. Асептическую обработку семян проводили растворами 3%-ной перекиси водорода, 0,1%-ного диоксида, 1%-ного перманганата калия, 1%-ного фундазола и 70%-ного этанола. Объекты стерилизовали путем погружения на время от 1 до 25 мин в перечисленные выше растворы с последующим трехкратным промыванием в стерильной дистиллированной воде в течение 45 мин.

Приготовление и стерилизацию питательных сред для культивирования тканей и органов *S. baicalensis* проводили согласно рекомендациям (Калинин с соавт., 1980). В работе использовали питательную среду Мурасиге и Скуга (MS). Содержание агара в питательной среде – 0,6%.

Для инициации морфогенетических процессов в качестве регуляторов роста использовали: 6-бензиламинопурин (БАП) в концентрации 0,2–2,0 мг/л; индолил-3-уксусную кислоту (ИУК) в концентрации 0,02–2,0 мг/л; α -нафтилуксусную кислоту (НУК) в концентрации 0,02 мг/л, кинетин в концентрации 0,2–0,5 мг/л. Регуляторы роста добавляли перед доведением pH среды до 5,8 и автоклавированием при 121°C в течение 20 мин.

Растения культивировали в пробирках и колбах объемом 50–100 мл, в люминесцентном освещении 4000 люкс, при 16-часовом фотопериоде, температуре 26°C и относительной влажности воздуха 70%.

Результаты и обсуждение

Начиная работу с растительным объектом в культуре *in vitro*, необходимо предварительно найти удовлетворительные условия для его стерилизации (Бутенко, 1964). На этапе изолирования эксплантов необходимо добиться получения хорошо растущей стерильной культуры. Это осуществляется путем стерилизации растительных тканей стерилизующими растворами (Зарипова, 2014а). Следовало подобрать такие концентрации стерилизующих агентов и экспозиции, которые не повреждали бы сами семена *S. baicalensis*, не угнетали их всхожесть и обеспечивали максимальную стерильность.

Для оценки успешности стерилизации семян нами использованы следующие показатели: число инфицированных и жизнеспособных эксплантов после стерилизации. Результаты анализов показали, что максимальная стерильность эксплантов (67,2%) была достигнута при стерилизации 70%-ным раствором этанола в течение 1 мин и 0,1%-ным раствором диацита в течение 25 мин (табл. 1).

Таблица 1

Влияние стерилизующих растворов на показатели инфицированности и жизнеспособности эксплантов *Scutellaria baicalensis* Georgi

Стерилизующий раствор		Доля эксплантов, %	
Концентрация, мг/л	экспозиция, мин	жизнеспособных	инфицированных
70 % -ный р-р этанола	1	67,2	32,8
0,1 % -ный р-р диацита	25		
3% -ный р-р перекиси водорода	10	35,3	64,7
0,1 % -ный р-р диацита	15		
1 % -ный р-р фундазола	30	55,7	44,3
70% -ный р-р этанола	1		
1 % -ный р-р перманганата калия	15	37,1	62,9
70% -ный р-р этанола	1		

Как показал анализ результатов экспериментальных исследований (Зарипова, 2014б; Зарипова с соавт., 2015), эпикотиль и гипокотиль

ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* ШЛЕМНИКА БАЙКАЛЬСКОГО

обладают самым высоким морфогенетическим потенциалом. Поэтому через 3 недели после формирования проростков в эксперименте использовали их фрагменты: эпикотиль и гипокотиль. Для изучения способности эксплантов к побегообразованию испытаны 8 вариантов питательной среды MS, содержащие различные комбинации и концентрации гормональных факторов, таких как БАП, кинетин, ИУК, НУК (табл. 2).

Таблица 2
Влияние регуляторов роста на побегообразование *Scutellaria baicalensis* Georgi

Регуляторы роста, мг/л	Среднее число побегов на эксплант, шт.	Средняя длина побега, мм	Число листьев, шт. на 1 побег
ИУК 0,5 БАП 2,0	10,2 ± 0,2	25,5 ± 0,21	9,3 ± 0,26
ИУК 0,1 БАП 0,2	5,4 ± 0,13	15, 1 ± 0,13	4,5 ± 0,15
ИУК 0,5 БАП 0,2	6,2 ± 0,25	16,2 ± 0,2	5,5 ± 0,25
ИУК 0,02 БАП 1,0	5,3 ± 0,2	14,2 ± 0,29	6,0 ± 0,16
НУК 0,02 БАП 1,0	3,3 ± 0,16	11,2 ± 0,27	6,2 ± 0,31
ИУК 2,0 Кинетин 0,2	2,8 ± 0,31	17,5 ± 0,2	5,4 ± 0,21
ИУК 0,2 Кинетин 0,5 БАП 0,5	6,5 ± 0,21	20,3 ± 0,31	5,6 ± 0,4
ИУК 0,5 Кинетин 0,5 БАП 0,5	5,8 ± 0,4	16,5 ± 0,2	5,1 ± 0,2

Данные табл. 2 свидетельствуют, что более активное образование пазушных побегов *S. baicalensis* вызвано сочетанием гормонов БАП и ИУК или БАП, кинетин, ИУК. Коэффициент образования дополнительных побегов зависел от концентрации и комбинации используемых регуляторов роста. При культивировании эксплантов на среде MS с добавлением регуляторов роста БАП 2,0 мг/л и ИУК 0,5 мг/л на 40-й день культивирования наблюдалось множественное побегообразование.

Коэффициент мультипликации равен 10,2. Одновременно на вышеуказанной среде происходила элонгация микропобегов, которые отличались наибольшими длиной (25,5 мм) и числом листьев на одном побеге – 9,3 шт. При культивировании эксплантов кинетин стимулировал образование пазушных побегов по всей длине первичного побега, тогда как, БАП вызывал увеличение числа побегов в основании экспланта.

Выводы

1. Разработаны первые этапы размножения *S. baicalensis in vitro*.
2. Предложена схема дезинфекции семян, позволяющая получить 67,2% жизнеспособных эксплантов.
3. Подобрана питательная среда для побегообразования с коэффициентом мультипликации равным 10,2.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Атлас ареалов и ресурсов лекарственных растений / под ред. Н.С. Чикова. М.: ГУГК, 1976. 340 с.
- Бутенко Р. Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М., 1964. 272 с.
- Зарипова А. А. Биотехнология размножения пиона уклоняющегося *Paeonia anomala* L. Уфа: Информреклама, 2014а. 176 с.
- Зарипова А. А. Размножение редкого вида *Thermopsis schischkinii* Czefr. с использованием биотехнологических методов. // Аграрная Россия. 2014б. № 8. С. 13–17.
- Зарипова А. А., Ахметова А. Ш., Мухаметвафина А. А. Изучение морфогенеза *Digitalis grandiflora* Mill. в культуре *in vitro* // Аграрная Россия. 2015. № 1. С. 20–25.
- Калинин В. Ф., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев: Наук. думка, 1980. 488 с.
- Каталог растений Ботанического сада-института Уфимского научного центра РАН / отв. ред. В.П. Путенихин. Уфа: АН РБ, Гилем, 2012. 224 с.
- Красная книга Приморского края: Растения. Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды растений и грибов. Владивосток: АВК «Апельсин», 2008. 688 с.