

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Удмуртский государственный университет»
Автономное образовательное учреждение дополнительного образования
Удмуртской Республики
«Региональный образовательный центр одаренных детей»
Государственное бюджетное общеобразовательное учреждение
«Лицей №14»**

Номинация: «Биотехнология»

**Исследовательская работа
«РАЗРАБОТКА НАЧАЛЬНЫХ ЭТАПОВ КЛОНАЛЬНОГО
МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ *Digitalis grandiflora M.*»**

Выполнила:
Шушакова Варвара,
ученица 9 класса,
обучающаяся АОУ УР «РОЦОД»

Руководители проекта:
Каргапольцева И.А. , педагог
дополнительного образования
Кузнецова Е.Н.,
инженер-технолог
ФГБОУ ВО «УдГУ»

Оглавление

Введение	3
Глава 1. Теоретическая часть. Микрклональное размножение растений	5
1.1 Этапы и методы микрклонального размножения	5
1.2 Факторы, влияющие на процесс микрклонального размножения	5
1.3 Состав питательных сред	7
1.4 Биологическая характеристика <i>Digitalis grandiflora</i> M.	10
Глава 2. Практическая часть. Разработка начальных этапов клонального микроразмножения <i>Digitalis grandiflora</i> M.	13
2.1 Проверка семян на всхожесть	13
2.2 Стерилизация эксплантов	15
2.3 Выбор оптимальной питательной среды	16
Выводы по второй главе	20
Заключение	20
Список литературы	21
Приложения	23

Введение

Среди основных экологических проблем современности сокращение биоразнообразия занимает особое место. В настоящее время происходит интенсивное уничтожение природных экосистем, сопровождающееся исчезновением видов живых организмов. В Красный список МСОП Всемирного союза охраны природы занесено более девяти тысяч видов животных и почти семь тысяч видов растений (Севостьянова Н.А., 2012).

Биологическое разнообразие является всемирным достоянием, основой для поддержания экологических условий существования и экономического развития человеческого общества. Биоразнообразие прежде всего имеет практическую ценность, являясь источником биологических ресурсов, включая продукты питания, сырье для производства строительных материалов, лекарств, одежды и т.д. Глобальная экономическая и экологическая выгода биоразнообразия в мире оценивается на уровне 3 трлн. долл. в год, что эквивалентно почти 11% годового мирового экономического производства. Таким образом, сохранение биоразнообразия, в том числе растительного мира – одна из важнейших задач, стоящих перед современной наукой.

Здоровье человека тесно связано с сохранением биоразнообразия, так как примерно $\frac{1}{4}$ всех общепризнанных медикаментов получают из растительного материала. При этом возможности получения данных веществ из растений в достаточном количестве зачастую ограничены, что вызвано принадлежностью многих лекарственных растений к редким и исчезающим видам (Болотова Н.Л., 2018).

Преодолеть сокращение запасов растительных ресурсов возможно благодаря микрклональному размножению. Одним из преимуществ данного метода является возможность получения продукта независимо от внешних климатических условий, круглогодично и сохраняя при этом естественные ареалы ценных лекарственных растений.

Актуальность и практическая значимость: среди современных лекарственных средств препараты наперстянки занимают особое место, так как используются в лечении многих кардиологических заболеваний, таких как сердечная недостаточность и пр. При этом это единственная группа лекарственных веществ, не имеющая химических заменителей, все препараты наперстянки вырабатываются только из растительного сырья (Иванова Н.Н., 2014).

Наперстянка крупноцветковая считается редким видом, имеет 2 категорию угрожаемого состояния и включена в Красную книгу 11 субъектов РФ. В Удмуртской Республике выявлена всего одна популяция из 30 особей на общей площади 200 кв.м. Таким образом, возникает потребность в разработке биотехнологических методов, благодаря которым осуществлялось бы круглогодичное, независимое от внешних факторов культивирование данного вида (Баранова О.Г., 2009, Оконешникова Т.Ф., 2018).

Цель работы: разработка начальных этапов клонального микроразмножения краснокнижного вида *Digitalis grandiflora M.*

Объект: способность *Digitalis grandiflora* M. к микроклональному размножению.

Методы: наблюдение, лабораторный эксперимент.

Задачи:

- оценить перспективы использования в качестве первичного экспланта зрелых семян *Digitalis grandiflora* M.,

- подобрать стерилизующий агент, оказывающий эффективное обеззараживающее действие на вводимый эксплант,

- определить оптимальные состав питательной среды для культивирования регенерантов наперстянки крупноцветковой.

Результат: разработка начальных этапов клонального микроразмножения *Digitalis grandiflora* M. и получение жизнеспособных регенерантов наперстянки крупноцветковой.

1. Микрклональное размножение

Преодолеть постоянное сокращение запасов растительных ресурсов возможно с помощью методов биотехнологии. Одним из таких способов является **клональное микроразмножение**.

1.1 Этапы и методы микрклонального размножения

Размножение является неотъемлемым свойством живых организмов воспроизводить себе подобных. Благодаря размножению обеспечивается непрерывность и преемственность жизни. Различают две основные формы размножения: бесполое и половое. При половом размножении потомство развивается из зиготы, образованной в результате слияния половых клеток двух разных особей, т.е. несет наследственные задатки обоих родителей. Бесполое размножение - это размножение, в котором принимает участие один организм, то есть не происходит слияния генетического материала в любой форме (Бутенко Р.Г., 1999).

Клональное размножение – это использование техники *in vitro* (лат. «в стекле») для быстрого получения неполовым способом растений, идентичных исходному. Материал, получаемый этим методом, генетически идентичен давшему ему начало растению, так как возникает из соматических клеток растений. Клональное микроразмножения имеет много преимуществ:

- получение генетически однородного посадочного материала,
- оздоровление растений от разного рода патогенов и инфекций,
- высокий коэффициент размножения,
- возможность размножения растений, трудно размножаемых традиционными способами,
- сокращение продолжительности селекционного процесса,
- возможность проведения работ в течение года и экономия площадей, необходимых для выращивания посадочного материала (Коростелева Н.И., 2006).

Основоположником клонального микроразмножения является французский ученый Ж.Морель, который в 1960 г. он разработал этот метод для орхидей. В нашей стране работы по клональному микроразмножению были начаты в 30-х годах XX века в лаборатории культуры тканей и морфогенеза ИФРа под руководством Р.Г.Бутенко. Были изучены условия микроразмножения картофеля, сахарной свеклы, гвоздики, герберы и др. растений и предложены промышленные технологии (Бутенко Р.Г., 1999, Высоцкий В.А., 1986).

1.2. Факторы, влияющие на процесс микрклонального размножения

Процесс микрклонального размножения можно разделить на несколько этапов:

1. отбор подходящих эксплантов и их стерилизация,
2. перенос эксплантов на питательную среду,
3. собственно микроразмножение,
4. укоренение побегов с последующей адаптацией их к почвенным условиям,

5. выращивание растений в теплице, а затем их подготовка к жизни в естественной среде обитания

На начальных этапах микроклонирования необходимо добиться получения хорошо растущей стерильной культуры. Наиболее важным моментом при введении растений в культуру *in vitro* является выбор экспланта, который зависит от многих факторов, главными из которых являются жизненная форма растений, способы размножения и возраст растений-доноров. В качестве первичных эксплантов можно использовать незрелые зародыши, семена, вегетативные почки, микропобеги, листовые диски и соматические зародыши (Митрофанова Н.П., 2014).

Успех введения в культуру *in vitro* часто определяется эффективностью стерилизации исходного материала. Режим стерилизации подбирается под каждый объект конкретно для получения высокого процента эксплантов, свободных от засорения спорами грибов и бактерий. Выбор химического вещества и продолжительность обработки зависят от чувствительности стерилизуемого материала. Для поверхностной стерилизации растительного сырья используется широкий спектр химических реагентов как индивидуально, так и в сочетании друг с другом. Кроме того, основной проблемой выбора стерилизующего агента является стерилизация выбранных эксплантов без потери их способности к дальнейшему развитию. Следует подобрать такие концентрации стерилизующих агентов, которые не повредили бы сами экспланты и обеспечивали бы максимальную стерильность. Чаще всего культуру стерилизуют с помощью этанола и пероксида водорода.

Далее экспланты высаживают на специально подобранные для первого этапа питательные среды. На первом этапе, как правило, используют среду, содержащую минеральные соли по прописи Мурасига и Скуга, а также различные биологически активные вещества и стимуляторы роста (ауксины, цитокинины) в различных сочетаниях в зависимости от объекта. Продолжительность первого этапа может колебаться от 1 до 2 месяцев, в результате которого наблюдается рост меристематических тканей и формирование первичных побегов.

Для успешного воспроизведения культуры растений на данном этапе и в последующем важны такие условия прорастания, как температура и освещенность. Оптимальное освещение – необходимый фактор для морфогенеза и образования хлорофилла. Многочисленные исследования показали, что 16-ти часовой фотопериод имеет благоприятное воздействие на развитие растений в сравнении с культивированием при освещении на протяжении суток. Стандартная интенсивность освещения составляет 1000-5000 люкс. При этом установлено, что для некоторых видов растений на начальных этапах культивирования эксплантов именно отсутствие освещения стимулирует процесс побегообразования (Иванова Н.Н., 2014).

Температура также оказывает большое влияние на рост и регенерацию растений. Для большинства культур оптимальный уровень температур находится в пределах 23-25°C. Однако установлено, что для луковичных

культур охлаждение перед культивированием ткани улучшает регенерационную способность.

Третий этап - собственно микроразмножение. На этом этапе необходимо получить максимальное количество микрорастений. Для увеличения эффективности размножения побеги черенкуют и пересаживают на питательную среду. На данном этапе используют питательные среды другого состава, которые подбирают специально для тиражирования растительного материала. Как и на первом этапе, обычно используют питательную среду по прописи Мурасига и Скуга, содержащую различные биологически активные вещества, а также регуляторы роста. На третьем этапе важно оптимально подобрать концентрации и соотношение внесенных в питательную среду фитогормонов цитокининов (способствуют делению и дифференцировке клеток) и ауксинов (отвечают за удлинение ствола, поддерживают апикальное преобладание).

Четвертый и пятый этапы микроклонирования это укоренение микропобегов, их последующая адаптация к почвенным условиям *in vivo* и высадка в природу. Минерализацию питательных сред, например по прописи Мурасиге и Скуга, уменьшают в два-четыре раза или заменяют ее средой Уайта, уменьшают количество сахара и полностью исключают цитокинины, оставляя один лишь ауксин.

Пересадка растений-регенерантов в почвенный субстрат является завершающим этапом в процессе клонального микроразмножения. Рекомендуемое время для пересадки растений, выращенных в лабораторных условиях –это весна или начало лета. Растения с двумя-тремя листьями и хорошо развитой корневой системой высаживают в предварительно простерилизованный почвенный субстрат. Для большинства растений в качестве субстратов используют торф, песок, дерновую почву, перлит. Горшочки с растениями помещают в теплицы с регулируемым температурным режимом (20-22° С), освещенностью не более 5 тыс. люкс и влажностью 65-90%. Для лучшего роста растений создают условия искусственного тумана или накрывают стеклянными банками, полиэтиленом, которые постепенно открывают до полной адаптации растений. По мере роста растений их рассаживают в емкости большего размера со свежим субстратом. Дальнейшее выращивание акклиматизированных растений ведется соответственно принятой агротехнике для каждого конкретного вида растений (Воинов Н.А., 2013)

1.3 Состав питательных сред

Для культивирования тканей на каждом из этапов микроклонирования требуется применение определенного состава питательной среды. Любая ткань растений - это сообщество клеток, и если она изолирована из целого организма, то лишена его регулирующего воздействия и питания. Следовательно, одним из принципов метода культуры тканей (клеток) является воспроизведение *in vitro* условий, близких или идентичных тем, в которых клетки находятся на материнском растении, для обеспечения их полноценного питания и развития.

Тогда при строгом соблюдении этих условий в культуре тканей размножаются (регенерируют) идентичные исходному генотипу клетки и растения.

В зависимости от консистенции существует деление на жидкие и твердые питательные среды. Большинство растений эффективнее размножаются на агаризированных твердых средах, но есть сведения, что у некоторых растений морфогенетические процессы более активно протекают на жидких питательных средах (Бутенко Р.Г., 1999, Коростелева Н.И., 2006, Тимофеева О.А. (2012).

Агар и агароподобные желирующие вещества получают из багряных водорослей. Данные вещества относятся к группе высокомолекулярных веществ (естественных растительных полимеров), растворимых в горячей воде, дающих водные растворы с высокой вязкостью и образующих при охлаждении студни. Агар вырабатывается в нашей стране из водорослей анфельции (*Ahnfeltia plicata*), а в Японии и других странах - не только из анфельции, но главным образом из водорослей гелидиум (*Gelidium*) или близких к нему водорослей.

Агар представляет собой желтовато-белый порошок или пластинки. Содержит около 1,5–4 % минеральных солей, 10–20 % воды и 70–80 % полисахаридов, в составе которых выявлены D- и L-галактозы, 3,6-ангидрогалактозы, пентозы, D-глюкуроновая и пировиноградная кислоты.

Прочие компоненты среды для выращивания растительных клеток и тканей можно разделить на следующие группы: макроэлементы, микроэлементы, источники железа, витамины, источники углерода, фитогормоны.

1. **Макро- и микроэлементы**, в основе каждой питательной среды лежит смесь минеральных солей. Это соединения азота в виде нитратов, нитритов, солей аммония; фосфора – в виде фосфатов; серы – в виде сульфатов; а также растворимых солей K^+ , Na^+ , Ca^{++} , Mg^{++} . Эти соединения и элементы выполняют в клетках и тканях структурную функцию, а ионы K^+ , Na^+ , Ca^{++} , Cl^- , H^+ необходимы для регуляции pH среды и поддержания физиологических градиентов клеток (тургора, осмотического давления).
2. **Углеводы** необходимы, так как в большинстве случаев изолированные клетки и ткани растений неспособны к автотрофному питанию. Наилучшим источником углеродного питания для большинства тканей является сахароза, также можно использовать глюкозу, фруктозу и галактозу
3. **Витамины** играют существенную роль в культуре тканей. В состав сред чаще всего включают водорастворимые витамины: тиамин, рибофлавин, биотин, пантотеновую кислоту, пиридоксин, аскорбиновую кислоту.
4. **Фитогормоны**, такие как ауксины, цитокинины и гиббереллины, помогают растениям адаптироваться к любым изменениям в окружающей среде и повышают их сопротивляемость болезням и вредителям (Иванова Н.Н., 2014, Широков А.И., 2012).

Ауксин главным образом отвечает за удлинение ствола, предотвращает рост боковых почек и поддерживает апикальное (верхушечное) преобладание. Помимо этих функций, ауксин отвечает за стимулирование развития корней, способствует развитию плодов, отвечает за вторичный рост растений. К группе

ауксинов принадлежат ИУК (индол-3-уксусная кислота), ИМК (β – индолил-3-масляная кислота), НУК (нафтилуксусная кислота).

Цитокинин способствует делению и дифференцировке клеток. Он встречается практически в каждой ткани растения. Но его много в растущих тканях, например в кончиках корней, верхушка побега, почки и т.д. Цитокинины способствуют образованию почек. Кроме того, он способствует образованию ответвлений корней, старению листьев, морфогенезу, образованию клубеньков и т.д. К группе цитокининов относятся кинетин, БАП(6-бензиламинопурин), зеатин и др.

Гиббереллины выполняют в растениях разнообразные функции, связанные с контролем удлинения гипокотыля, прорастания семян, зацветания и т. д. К числу наиболее известных функций гиббереллинов относятся контроль прорастания семян, роста стебля в длину, перехода к цветению и развития органов цветка.

Совместное введение в питательную среду веществ разных групп действует синергически или антагонистически. Кинетин усиливает каллусогенное действие ауксинов, но снижает их корнеобразующее влияние. Гиббереллины действуют в одном направлении с ауксинами и являются антагонистами цитокининов.

Необходимо учитывать, что клетки растений и отдельные компоненты среды (витамины, фитогормоны, агар) чувствительны к определенным концентрациям водородных ионов. Концентрация ионов водорода влияет на устойчивость и усвоения ряда компонентов, таких как фосфаты, соединения железа, соли тяжелых металлов. Оптимальным для большинства изолированных тканей являются среды с рН 5,0 – 5,8. Для поддержания постоянного уровня значения рН необходимо вводить в среду буферные смеси и хеллат железа.

Эффективность клонального микроразмножения в значительной степени определяется правильным выбором питательной среды. Точный состав должен быть подобран в зависимости от потребностей различных групп растений. В настоящее время существует большое количество различных прописей питательных сред для культивирования изолированных тканей и клеток. Их состав зависит от задач культивирования, видов растений и типов эксплантов. При клональном размножении наиболее часто используются среды Мурасиге и Скуга, Хеллера, Пирика, Кнопа, Уайта.

Питательная среда Мурасиге-Скуга (МСО или MS0 (МС-ноль)) — впервые была составлена и предложена в 1962 г. Применение питательной среды Мурасиге и Скуга обусловлено повышенной концентрации в ее составе неорганического азота за счет присутствия аммонийного и нитратного азота. Признана самой универсальной питательной средой, пригодной для образования и роста каллуса, индукции морфогенеза у большинства двудольных растений. Используется на первых трех этапах клонального размножения.

Питательная среда Уайта в сравнении со средой Мурасиге-Скуга содержит значительно меньше (в 2-4 раза) калия, фосфора, минеральных солей и сахаров, полностью исключается содержание цитокининов. Среда Уайта обеспечивает укоренение побегов и нормальный рост стебля после

регенерации. Данная среда чаще всего применяется на пятом этапе клонирования с целью укоренения растений, а также адаптации их к почвенным условиям перед высадкой в грунт (Высоцкий В.А., 1986).

1.4. Биологическая характеристика *Digitalis grandiflora* Mill

Digitalis grandiflora M. — наперстянка крупноцветковая, относится к семейству норичниковые и представляет собой многолетнее травянистое растение высотой от 40 до 125 см (рис.1).

Растения рода наперстянок имеет средиземноморское происхождение. Произрастает в лиственных и смешанных лесах, среди кустарников, реже на лугах. Современный ареал наперстянки охватывает Среднюю и Южную Европу. На территории России встречается в европейской части, на Урале и в прилегающих к нему районах Западной Сибири, на Средне-Волжской возвышенности, Северном Кавказе, в Гималаях, предгорьях Алтая (Сапарбаева Н.А., 2010).

На Урале наперстянка крупноцветковая произрастает в южных районах Свердловской и Пермской областей вдоль Уральского хребта. Считается редким видом, имеет 2 категорию угрожаемого состояния, включена в Красную книгу Алтайского края, Курганской, Курской, Новосибирской, Свердловской, Смоленской, Тверской, Тюменской областей, республики Татарстан, Удмуртской Республики. Лимитирующие факторы, влияющие на распространение наперстянки в природе — рубка леса, рекреационное воздействие, сбор на букеты и лекарственное сырье (Баранова О.Г., 2009, Оконешникова Т.Ф., 2018).

В Удмуртской республике вид находится на северном пределе распространения и выявлено всего одно местонахождение вида в окрестности пос. Яган Малопургинского района (на открытом травянистом склоне и на поляне в дубраве). Общая площадь, занимаемая ценопопуляцией, составляет около 200 кв.м. Ценопопуляция представлена небольшим числом особей, менее 30 экземпляров, плотность составляет 1,3 шт./кв.м. В возрастном спектре преобладают генеративные особи, степень генеративности составляет 88%. Ценопопуляция является нормальной неполночленной. Особи отличаются высокой жизненностью. Растения ежегодно цветут и плодоносят (Величко Н.А., 2011).

Корневище растения короткое, простое. Стебли прямые, слабоветвистые, мягковолнистые, гранитые. Листья очередные, продолговато-эллиптические или яйцевидно-ланцетовидные, мелко пильчато-зубчатые, длиной от 5 до 30 см, шириной от 2,0 до 6,5 см. Нижние листья у основания сужены в короткий черешок, верхние - полустеблеобъемлющие, сидячие, по центральной жилке - железисто-опушенные. Цветки собраны в одностороннюю многоцветковую кисть, поникшие. Плоды - яйцевидные, железистоопушенные коробочки от 8 до 14 мм длины. Цветет растение в июне - июле, плоды созревают в августе.



Рис.1 Наперстянка крупноцветковая

Установлено, что в первый год жизни формируется розетка прикорневых листьев в среднем из 10,8 штук на растение. Масса их составляет 82 % от массы целого растения. Однако в абсолютном количестве выход сухой массы растений первого года жизни небольшой. На втором году жизни подавляющее большинство растений переходит в генеративную фазу. Высота цветоносных побегов достигает на второй год 71 см, на третий год — 126,8 см. В последующие два года высота растений не изменяется. Масса всего растения достигает максимальных значений у экземпляров 4–5 лет, а масса листьев — на четвертый год жизни. Следовательно, наибольший выход лекарственного сырья может быть получен у четырехлетних растений (Оконешникова Т.Ф., 2018).

Семенная продуктивность *Digitalis grandiflora* М. значительна и составляет в среднем 6035 шт. семян на особь. Семена многочисленные, мелкие, неправильно конические, с хорошо выраженным ячеистым строением. Длина семени от 0,9 до 1,2 мм, ширина от 0,5 до 0,6 мм. Масса 1000 семян 0,13-0,17 грамм. Семена наперстянки крупноцветковой не имеют периода покоя, начинают прорастать при температуре 10°C, оптимальная температура прорастания 20-30°C. Свет способствует прорастанию семян. Семена отличаются низкой всхожестью, которую они сохраняют до трех лет. При дальнейшем хранении семян ее значения падает практически до нуля (Смольникова Я.В., 2012, Оконешникова Т.Ф., 2018).

Онтогенез семян наперстянки состоит из 6 основных фаз: набухание семянки, наклеивание семянки, появление зародышевого корешка, появление и развитие гипокотилия, появление семядольных листьев, образование 1-й пары настоящих листьев (Сапарбаева Н.А., 2010).

Первое описание наперстянки приведено в травнике врача-ботаника Фукса (1543 г.), давшего ей название «*digitalis*» (лат. «*digitabulum*» - наперсток). Известный врач-клиницист С. П. Боткин назвал наперстянку "одним из самых драгоценных средств, какими обладает терапия". Много восторженных отзывов об этом незаменимом средстве при лечении сердечных заболеваний, связанных с недостаточностью сердечной мышцы, было сказано и другими врачами, а

некоторые даже заявляли, что не хотели бы быть врачами, если бы не существовало наперстянки (Сало В.М., 1968).

Листья наперстянки содержат 23 сердечных гликозида. В настоящее время фармпрепараты гликозидов наперстянки получают из надземных частей растения, скошенных до начала цветения. Лекарственные препараты наперстянки включают ее основные активные вещества - сердечные гликозиды: дигитоксин, гитоксин, дигоксин, ацетилдигоксин и многие другие, а также органические кислоты, сапонины, флавоноиды. Препараты наперстянки используются в лечении многих кардиологических заболеваний, в основном связанных с нарушениями работы сердца и сосудов: сердечная недостаточность, пороки клапанов сердца, мерцательная аритмия, воспаление и дегенерация сердечной мышцы и многие другие. Выделенные из травы наперстянки гликозиды специфически воздействуют на сердечную мышцу. При сердечной недостаточности эффект от применения наперстянки снижает частоты сокращений сердца, увеличивает силы сокращения миокарда, удлиняет период расслабления отделов сердца (диастолы). Также препараты наперстянки успешно применяются и в терапии недостаточности кровообращения, когда сердце не справляется с продвижением крови по сосудам. Все растение наперстянки крупноцветковой ядовито. Этот вид разрешен к применению в качестве лекарственного, наряду с наперстянкой пурпуровой (Оконешникова Т.Ф., 2018).

Вывод по первой главе

Среди лекарственных средств, применяемых в современной фармакотерапии сердечно-сосудистых заболеваний, препараты наперстянки занимают особое место. Их мощное кардиотоническое действие пока ничем не удалось заменить, и все лекарства этой группы вырабатываются только из растений. При этом наперстянка крупноцветковая является редким видом, так в Удмуртии в природе имеется только одна популяция данного растения в количестве 30 особей. В связи с этим большой интерес в качестве источника биологически активных веществ представляют культуры растительных клеток.

Наперстянка крупноцветковая является оптимальным объектом для микроклонального размножения, так как принадлежит к редким видам, имеет огромную практическую ценность и испытывает затруднения в размножении традиционным способом. Исследование начальных этапов культивирования вида позволит в дальнейшем разработать полную технологию его клонального микроразмножения для решения проблемы сохранения вида.

Преимуществом данного метода является возможность получения продукта независимо от внешних климатических, почвенных условий, круглогодично и сохраняя при этом естественные ареалы ценных лекарственных растений.

2. Разработка начальных этапов клонального микроразмножения *Digitalis grandiflora* M. Материалы и методика проведения исследования

Работа проводилась на базе кафедры ботаники, зоологии и биоэкологии Удмуртского государственного университета в июле-ноябре 2020 года. В работе использованы современные биотехнологические методы: метод культуры тканей для получения асептических растений (введение в культуру *in vitro*, микрклональное размножение). Схема эксперимента представлена в Приложении №1. Данная работа посвящена начальным этапам микрклонального размножения и включает в себя следующие этапы:

1. проверка семян наперстянки крупноцветковой на всхожесть,
2. выбор схемы стерилизации эксплантов,
3. подбор оптимальной питательной среды для получения жизнестойких регенерантов наперстянки крупноцветковой.

2.1. Проверка семян на всхожесть (июль-сентябрь 2020 года)

Материалом данного исследования были зрелые семена наперстянки крупноцветковой, собранные из природной популяции в окрестности пос. Яган Малоपुरгинского района Удмуртской Республики. На выбор в качестве первичного экспланта именно семян повлиял тот факт, что растения, регенерированные из нуцеллярного каллуса, обычно свободны от вирусов, так как патогены редко передаются через семена (Тимофеева О.А., 2012).

Наиболее важными показателями качества и жизнеспособности семян являются их всхожесть. В лабораторных испытаниях всхожесть определяется как появление и развитие из зародыша тех важнейших органов, которые свидетельствует о способности проверяемых семян развиваться в почве при благоприятных условиях в нормальное растение. При оценке проростков, полученных при лабораторном определении всхожести, важнейшие органы их должны достигнуть стадии развития, при которой можно уже обнаружить каждый ненормальный проросток, не имеющий практической ценности с точки зрения получения растений. Всхожесть – это количество (в %) нормально проросших семян за определенный период времени (ГОСТ 12038-84, Леурда И.Г., 1969).

Первым этапом нашей работы было изучение прорастания семян. На всхожесть были проанализированы семена, собранные в 2015, 2017 и в 2020 годах. Проращивание семян проводили в лабораторных условиях при комнатной температуре (18–25°C) и естественном освещении, в чашках Петри (диаметр 9 см), по 1-2 повторности по 40 штук (в зависимости от количества имеющихся семян) на бумажном ложе, без какой-либо предварительной обработки. Увлажнитель – дистиллированная вода, семена увлажнялись по мере необходимости через 1-2 дня. Семя считали проросшим при наличии корешка, размер которого равен семени. Всхожесть оценивали по отношению количества проросших семян к количеству заложенных на проращивание, выраженному в процентах %. Полученные результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1. Определение всхожести семян наперстянки крупноцветковой

	Год сбора семян 2015		Год сбора семян 2017		Год сбора семян 2020			
	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
3 день	0	0	0	0	30	29	75	72,5
7 день	0	0	6	15	30	29	75	72,5
9 день	0	0	8	20	30	29	75	72,5
10 день	0	0	8	20	30	29	75	72,5
14 день	0	0	8	20	30	29	75	72,5

В результате проведенных исследований установлено следующее. Семена наперстянки крупноцветковой, собранные в 2015 году, не взошли вообще. Семена, собранные в 2017 году имеют низкую всхожесть, не более 20%. Всхожесть свежих семян, урожая 2020 года, в среднем составила 75% и 72,5% в двух повторностях.

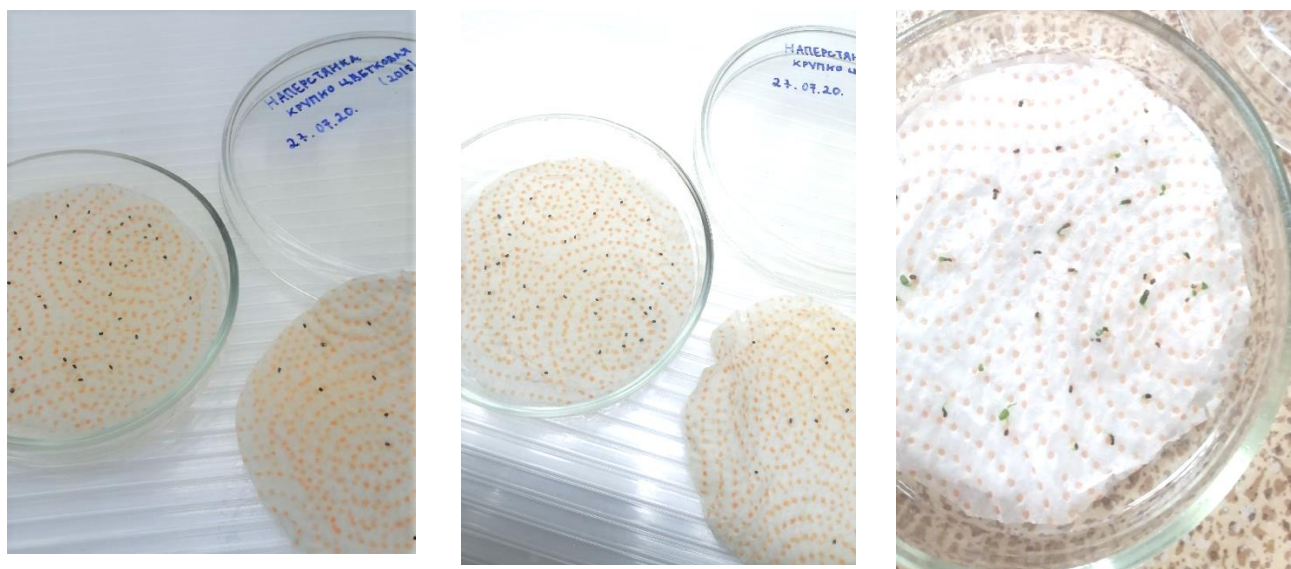


Рис.2 Прорастиание семян наперстянки крупноцветковой (сбор 2015, 2017 и 2020 годов)

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

Результат 1 этапа: для микроклонального размножения в работе подойдут только семена, собранные в 2020 году.

2.2. Стерилизации эксплантов (октябрь-ноябрь 2020)

На протяжении всего процесса микроклонирования определяющую роль играет стерильность культуры, однако, особое значение она приобретает на начальном этапе (Высоцкий В.А., 1986).

В данной работ материал стерилизовали в условиях ламинар-бокса в следующей последовательности: объекты погружали в 70% этанол (1 мин.), далее промывали дистиллированной водой (10 мин) и обрабатывали 3% раствором перекиси водорода (20 мин).

Выращивание осуществлялось на свету (3500 люкс) с фотопериодом 16 ч(день), 8ч (ночь) также по методике Р. Г. Бутенко. Для установления эффективности стерилизации экспланты осматривались на отсутствие экзофитной инфекции на 7, 10, 15 и 21 сутки после высадки. О наличии инфекции судили по изменению цвета среды, образованию колоний (при бактериальной инфекции) или грибницы и спороношению. По анализируемой схеме стерилизации был получен высокий процент стерильного материала: максимальное число жизнеспособных проростков составило 64%, а инфицированных не более 5%. Полученные результаты приведены в таблице 2.

Таблица 2. Влияние способа стерилизации на семена наперстянки крупноцветковой

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

Из полученных данных можно сделать вывод, что этиловый спирт в сочетании с перекисью водорода являются достаточно эффективными стерилизующими средствами. Исследование показали, что выживаемость эксплантов составила до 64,0 % в сочетании с низким уровнем инфицированных эксплантов до 5%. При выборе данной схемы стерилизации экспланты *Digitalis grandiflora* М. показали относительно высокие показатели стерильности и жизнеспособности.

Результат 2 этапа: выбранная схема стерилизации эксплантов: двухступенчатая обработка 70% этанолом (1 мин) и 3% раствором перекиси водорода (20 мин) доказала свою эффективность.

2.3. Выбор оптимальной питательной среды (октябрь-ноябрь 2020)

Подготовку и стерилизацию питательной среды для введения в культуру *in vitro*, микроразмножение растений *in vitro* проводили в соответствии со стандартным протоколом (Бутенко, 1964). Для работы были взяты следующие безгормональные среды (состав сред представлен в Приложении №2):

- 1) питательная среда с минеральной основой Мурасиге- Скуга (MS),
- 2) питательная среда с минеральной основой Мурасиге- Скуга с половинной нормой минеральных солей (1/2 MS),
- 3) среда Уайта (У),
- 4) агар-агар (А).

Все исследования проводили в асептических условиях в ламинар-боксе. В начале была проведена подготовка рабочего места в ламинар - боксе: обработка рабочего места 75-% спиртом.



Рис 3. Этапы культивирования наперстянки крупноцветковой

После посадки всех эксплантов на среду, все пробирки были закрыты пробками из фольги, чтобы избежать попадания пыли и воды. Побеги культивировали на свету (3500 люкс) с фотопериодом 16 ч (день), 8 ч (ночь) также по методике Р. Г. Бутенко (рис.3). В каждом варианте анализировали по 40 эксплантов, наблюдение производилось на протяжении 30 суток. При изучении прорастания семян учитывались следующие фазы: наклеивание семени, появление зародышевого корешка, выход и удлинение гипокотилия, вынос семядольных листьев и их разворачивание, появление первой пары настоящих листьев и их раскрытие, анализировалось количество проросших семян (%), лабораторная всхожесть (%) и энергия прорастания (%).

Сравнительный анализ количества проросших семян наперстянки крупноцветковой в зависимости от состава питательных сред представлен в таблице №3.

Таблица №3 Сравнительный анализ количества проросших семян наперстянки крупноцветковой в зависимости от состава питательных сред

День наблюдения	Количество проросших семян, шт			
	½ MS	MS	У	А
4	3	0	0	13
5	11	1	1	18
6	20	2	7	21
7	23	4	10	21
8	23	8	16	22
9	25	9	17	23
10	26	10	18	23
13	26	11	19	23
14	26	11	22	23
16	26	12	22	23
17	26	15	22	23
20	26	16	24	23

Худшие показатели были установлены при культивировании наперстянки на среде по прописи **Мурасиге-Скуга**. Энергия прорастания (определяется через 3 суток проращивания) – 0%, лабораторная всхожесть (определяется через 7 суток проращивания) – 20%, общее количество взошедших семян на 20 сутки составило 40% к общему количеству, на 30 сутки - 55%. Семядольные листья появились у растения на 10 день (у 3-х проростков), первые настоящие листья на 15 день (у 7-ми проростков). Морфологических изменений у микрорастений не выявлено.

Более высокие показатели выживаемости и темпов развития эксплантов зафиксированы на среде **Уайта**. Энергия прорастания – 0%, лабораторная всхожесть – 40%, общее количество взошедших семян на 20 сутки составило 60% к общему количеству, на 30 сутки - 75%. Семядольные листья появились у растения на 10 день (у 7-ми проростков), первые настоящие листья на 15 день (у 7-ми проростков). Морфологических изменений у микрорастений не выявлено.

На среде, состоящей только из **агара** зафиксированы следующие показатели: энергия прорастания - 32,5%, лабораторная всхожесть – 55%, общее количество взошедших семян на 20 сутки составило 57,5% к общему количеству, на 30 сутки - 57,5%. Семядольные листья появились у растения на 7 день (у 7-ми проростков). Однако у 3-х микропроростков (13% от всех проросших) выявлены морфологические изменения: у 2-х проростков отсутствуют корни и гипокотиль, но при этом имеются семядольные листья, 1 проросток «замер» на стадии гипокотилия и далее не развивается. Наличие проростков с уродствами можно объяснить недостатком в питательной среде макро и микроэлементов, витаминов, необходимых для полноценного развития.

Оптимальной для микроразмножения семян наперстянки крупноцветковой оказалась среда по прописи **Мурасиге-Скуга** с

половинной нормой минеральных солей. Энергия прорастания – 7,5%, лабораторная всхожесть – 57,5%, общее количество взошедших семян на 20 сутки составило 60% к общему количеству, на 30 сутки - 75%. Семядольные листья появились у растения на 7 день (у 10-ти проростков), первые настоящие листья на 15 день (у 23-х проростков). У 1 проростка (3,8% от всех проросших) зафиксировано отсутствие корня, иных морфологических изменений у микрорастений не выявлено.

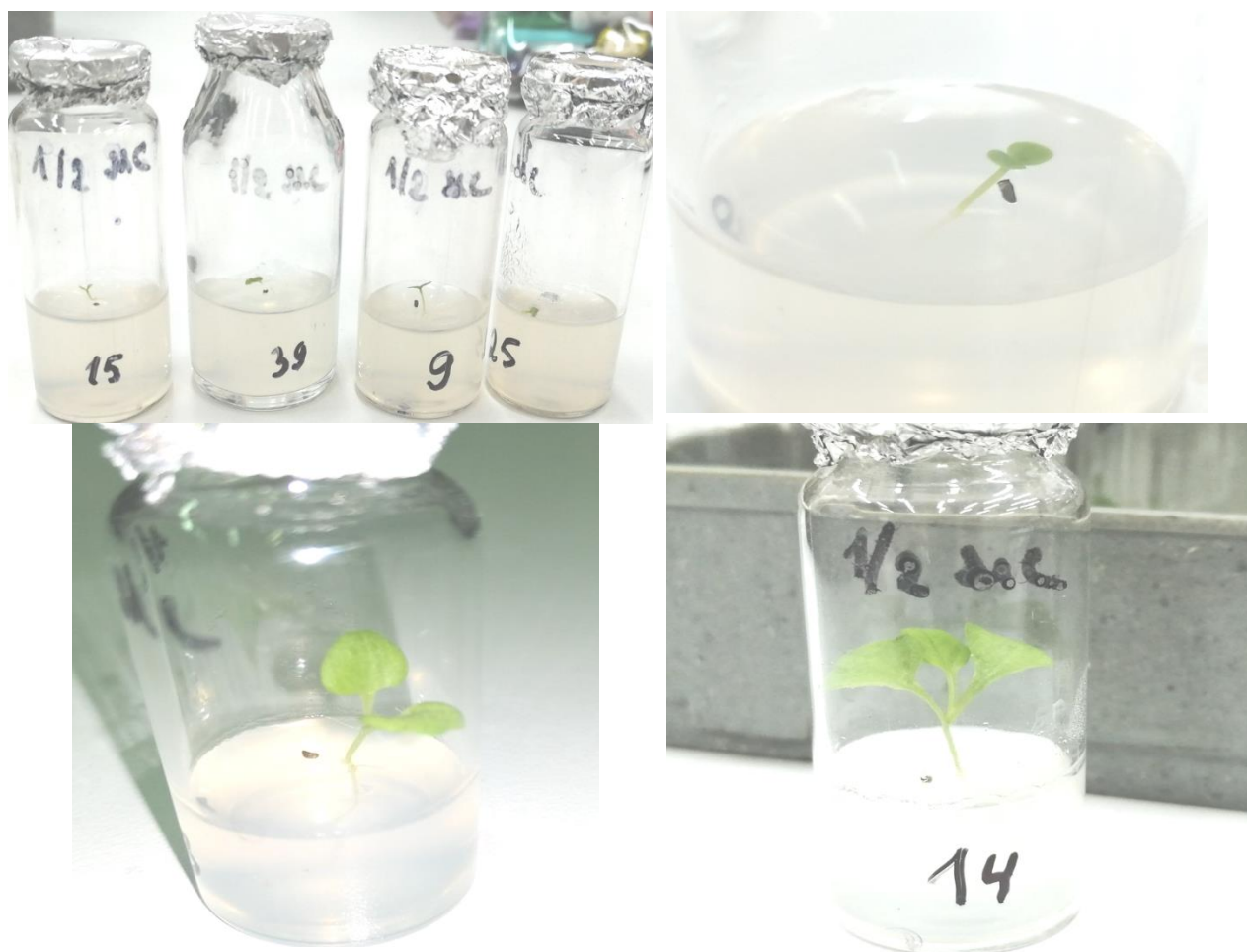


Рис.4 Проростки наперстянки крупноцветковой на питательной среде MS $\frac{1}{2}$ (7, 10, 15 и 21 день)

Т.о. наиболее подходящей питательной средой для микроклонального размножения наперстянки крупноцветковой является питательная среда Мурасиге-Скуга с половинной нормой минеральных солей. У микропроростков, выращенных на данной среде из семян наперстянки, выше такие показатели, как всхожесть, раньше и в большем количестве появились семядольные и настоящие первые листья. Сравнительный анализ количества проросших семян наперстянки крупноцветковой в зависимости от состава питательных сред представлен на рис.5.

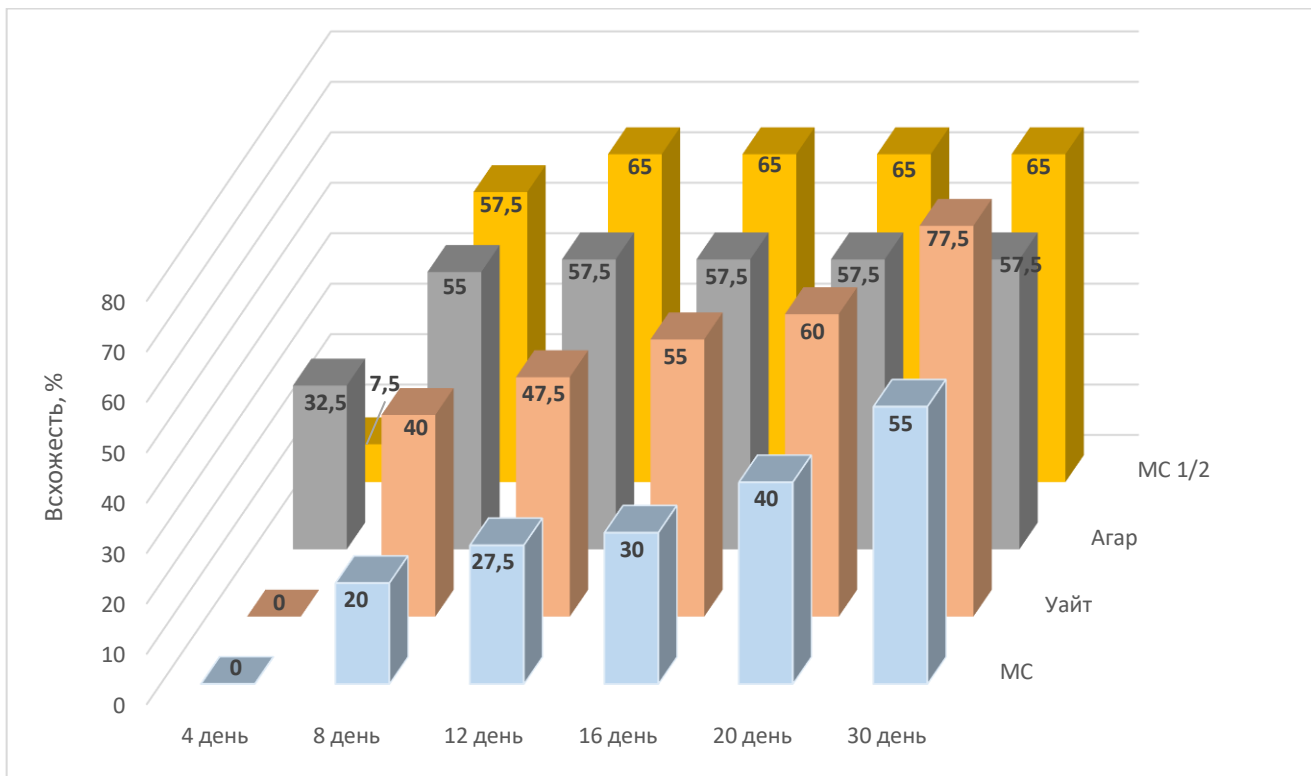


Рис. 5 Сравнительный анализ всхожести семян наперстянки крупноцветковой в зависимости от состава питательных сред

Результат 3 этапа: подобрана оптимальная питательная среда для получения жизнеспособных регенерантов наперстянки крупноцветковой – питательная среда по прописи Мурасиге-Скуга с половинной нормой минеральных солей.

Выводы

1. *Digitalis grandiflora* М. является оптимальным объектом для микроклонального размножения, так как принадлежит к редким видам, имеет огромную практическую ценность и испытывает затруднения в размножении традиционным способом.

2. Семена наперстянки крупноцветковой отличаются низкой всхожестью, которую они сохраняют до трех лет. При дальнейшем хранении семян значение всхожести падает практически до нуля.

3. Семена наперстянки крупноцветковой возможно использовать в качестве первичного экспланта для получения стерильных интактных растений, которые в свою очередь в дальнейшем можно использовать для дальнейшего культивирования.

4. Для введения в культуру *in vitro* семян *Digitalis grandiflora* М. эффективен способ стерилизации, заключающийся в двухступенчатой обработке 70% раствором этанола (1 мин), затем 3% раствором перекиси водорода (20 мин).

5. Наиболее высокую выживаемость растения показали на средах с невысокой общей концентрацией солей: по прописи Мурасиге-Скуга с 1/2 минерализации и Уайта. При этом использование среды Уайта, в сравнении с 1/2 МС, не обеспечивает высоких темпов роста проростков наперстянки. На совершенно бессолевой среде (агар) положительный результат не был достигнут и выявлены аномалии в развитии проростков, что можно объяснить недостатком полного набора элементов питания микрорастений. Т.о. оптимальной питательной средой для формирования интактных растений наперстянки крупноцветковой было использование безгормонального питательного раствора, содержащего 1/2 минеральных солей МС.

Заключение

В ходе работы доказано, что наперстянка крупноцветковая является оптимальным объектом для микроклонального 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* М.

В процессе работы установлено, что семена наперстянки отличаются низкой всхожестью, которую они сохраняют до 3 лет. Семена наперстянки возможно применять для получения стерильных интактных растений, которые в свою очередь можно использовать для дальнейшего культивирования и укоренения. 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 было использование безгормональной среды Мурасиге-Скуга с 1/2 нормой минеральных солей.

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.

Список литературы

1. ГОСТ 12038-84 «Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести (с Изменениями N 1, 2, с Поправкой)
2. Леурда И.Г. Международные правила определения качества семян: пер. с англ. М.:Колос. 1969 – 182 с.
3. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе. – М. : ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
4. Высоцкий В.А. Клональное микроразмножение растений//Культура клеток растений и биотехнология. М.: Наука,1986. С.91-102
5. Коростелева Н.И. Биотехнология: учебное пособие / Н.И. Коростелева, Т.В. Громова, И.Г. Жукова. - Барнаул: Изд-во АГАУ, 2006. - 127 с.
6. Тимофеева О.А., Невмержицкая Ю.Ю. Клональное микроразмножение растений. Учебно-методическое пособие. – Казань: Казанский университет, 2012. – 56 с.
7. Сало В.М. Растения и медицина. – М.: Наука, 1968. - 160 с.
8. Смольникова Я.В. Культивирование *DIGITALIS PURPUREAL*. В условиях *in vitro* и получение сердечных гликозидов на ее основе: Автореф...дис.кан.тех.наук.-К.:2012.-22 с.
9. 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.
10. Величко Н. А., Смольникова Я. В. Влияние стрессогенных факторов на каллусную ткань *Digitalis purpurea L.* // Вестник КрасГАУ. 2011. №7
11. Иванова Н.Н., Митрофанова И.В., Митрофанова О.В. Методические основы клонального микроразмножения некоторых декоративных культур // Сборник научных трудов ГНБС. 2014. №138.
12. Митрофанова .В., Митрофанова О.В., Корзина Н.В., Лесникова-Седошенко Н.П., Иванова Н.Н., Тевфик А.Ш., Пилипчук Т.И., Заяц А.Ю., Челомбит С.В., Мелихова Г.И. Методические аспекты в исследовании органогенеза и соматического эмбриогенеза *invitro* представителей семейств *Ranunculaceae*, *Cannaceae*, *Moraceae*, *Rosaceae*, *Myrtaceae*, *Oleaceae*, *Actinidiaceae* // Сборник научных трудов ГНБС. 2014. №138.
13. Оконешникова Т.Ф., Михалищев Р.В., Палтусова М.В., Валдайских В.В. Интродукция редких видов флоры Свердловской области, перспективных для практического использования // АБУ. 2018. №1 (168).
14. Сапарбаева Н.А. Изучение некоторых вопросов прорастания семян наперстянки ржавой (*Digitalis ferruginea L.*)//Вестник КарГУ. 2010
15. Севостьянова Н. А. Особенности сохранения биоразнообразия России // Царскосельские чтения. 2012. №XVI.

16. Болотова Н.Л. Биологическое разнообразие и проблемы его сохранения//https://spbrc.ru/ru/councils/ecology/school_science/bio_diversity
17. Наперстянка крупноцветковая (*Digitalis grandiflora* Mill). Лекарственные растения. Интернет-журнал о лекарственном растениеводстве, фармакогнозии и медицине /Электронный ресурс/ Режим доступа <https://www.lekrs.ru/digitalis-grandiflora/>
18. Воинов Н.А., Волова Т.Г. Клональное микроразмножение растений/Электронный ресурс/ Режим доступа: <https://medbe.ru/materials/problemu-i-metody-biotekhnologii/klonalnoe-mikrorazmnozhenie-rasteniy-2013/>
19. Широков А.И., Крюков Л.А. Основы биотехнологии растений. Электронное учебно-методическое пособие. – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2012 – 49 с.

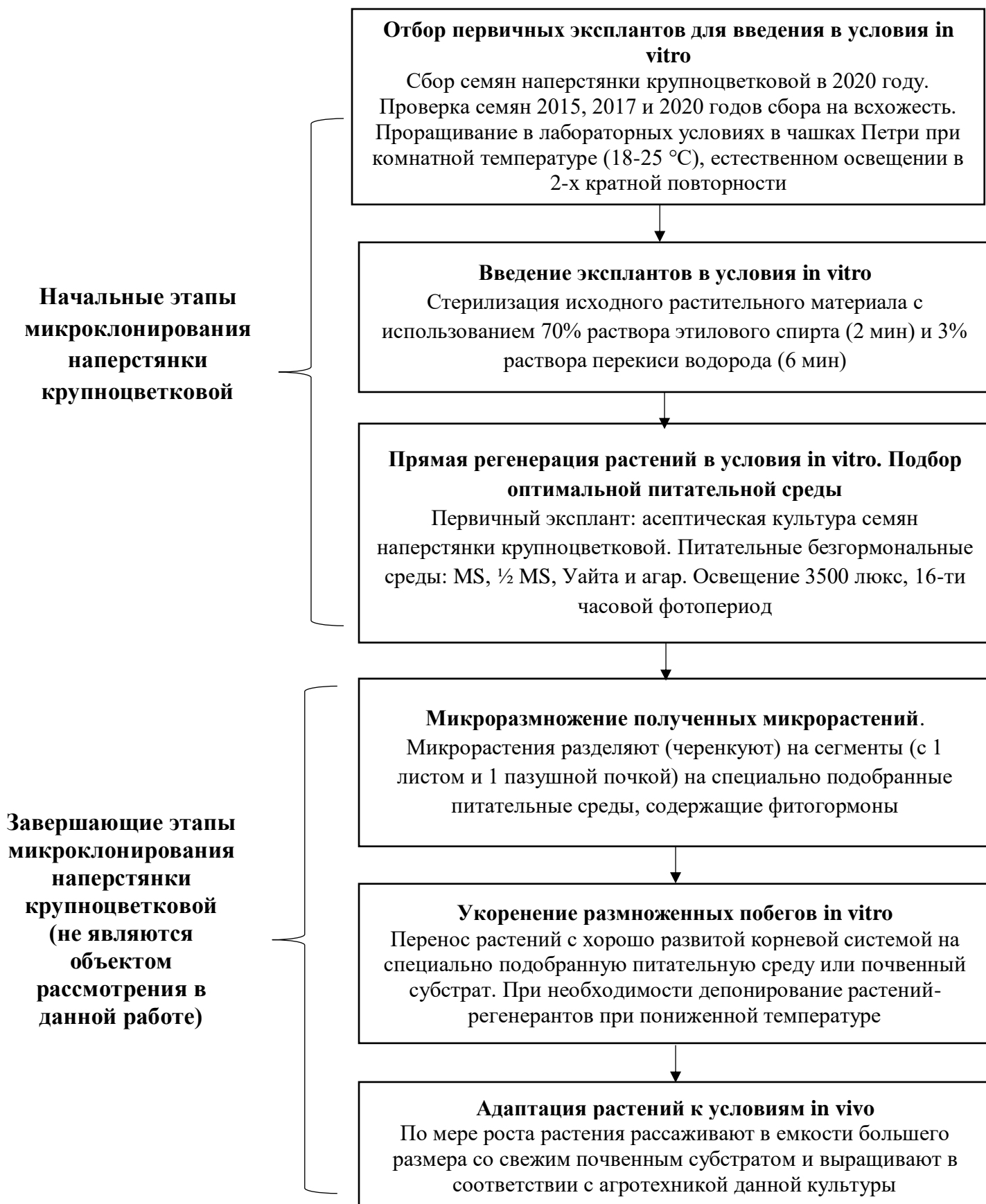


Рис. 6 Биотехнологическая схема клонального микроразмножения *Digitalis grandiflora* M. (Схема эксперимента)

Таблица 4. 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 5. Вариации питательных сред для МКР. Среда Уайта, рН 5,6-5,8

Компоненты	Содержание, мг/л	Компоненты	Содержание, мг/л
Ca(NO ₃) ₂	200	CuSO ₄ ×5H ₂ O	0,02
MgSO ₄	360	ZnSO ₄	1,5
Na ₂ SO ₄	200	Na ₂ MoO ₄ ×2H ₂ O	0,0025

KNO_3	80	КІ	0,75
KCl	65	Пиридоксин-НСІ	0,1
NaH_2PO_4	16,5	Тиамин-НСІ	0,1
H_3BO_3	1,5	Никотиновая кислота	0,5
MnSO_4	4,5	Глицин	3,0
$\text{Fe}(\text{SO}_4)_3$	2,5	Сахароза	20.000