

М.В.Носырева, Н.А.Вечернина, О.К.Таварткиладзе
**Изучение регенерационной способности
 изолированных почек *Adonis vernalis* L.
 в культуре in vitro**

Адонис весенний или горичцвет – декоративный раннецветущий вид природной флоры, принадлежит к ценнейшим лекарственным растениям. Сердечные гликозиды адониса весеннего обладают высокой биологической активностью и являются незаменимыми средствами при лечении сердечно-сосудистых заболеваний [1]. Постоянные потребности фармацевтической промышленности в этом лекарственном растении удовлетворяются только за счет сбора сырья с дикорастущих зарослей. К тому же ареал вида значительно сократился под усиленной антропогенной нагрузкой [2; 3]. Адонис весенний занесен в Красную книгу СССР [4] и Красную книгу Алтайского края [5], отнесен к редким исчезающим растениям Сибири [6]. Ввиду того, что обычные способы размножения (семенное и вегетативное) у этого растения затруднены, то возникает необходимость в разработке альтернативных методов, одним из которых является размножение в культуре изолированных органов. Но для того чтобы такой метод стал реальностью, нужно изучить потенциальные возможности процессов регенерации и научиться управлять этими процессами в культуре in vitro. Поэтому основная цель данного исследования – изучение влияния минерального состава, являющегося основой искусственной питательной среды, а также регуляторов роста цитокининовой природы на процессы регенерации in vitro.

Материалы и методы. Объект исследования – *Adonis vernalis* L (сем. Ranunculaceae), выращиваемый на опытном участке отдела декоративных растений ЮСБС АГУ с 1983 г.

В качестве первичного растительного материала использовали прикорневые почки возобновления, которые вводили в культуру in vitro осенью, в сентябре. В этот период они были плотно укрыты почечными чешуями. Изолированные почки поверхностно стерилизовали в 0,2% растворе сулемы ($HgCl_2$) в течение 30 мин, затем четырежды промывали в стерильной дистиллированной воде. В последней порции воды их выдерживали 40 мин. Выделение эксплантов проводили с использованием бинокуляра: с почек возобновления удаляли чешуи нескольких генераций и бутон. В качестве эк-

спланта использовались только вегетативные почки, расположенные в пазухах листьев репродуктивного побега. Культивирование эксплантов осуществляли на агаризованных (0,6% агар) основных питательных средах по прописи Мурасиге и Скута (МС), Гамборга (В5), Андерсона (А), Хильдебрандта-Райкера-Даггера (ХРД) [7]; до автоклавирования рН питательных сред доводили до 5,6–5,8. В состав основной питательной среды вводили регуляторы роста: 6-бензиламиногуанин (БАП) в концентрации 2–40 мкМ, кинетин (К) 5–10 мкМ, изопентиладенин (2iP) 1–10 мкМ. Питательные среды стерилизовали в автоклаве при давлении $0,9 \pm 0,1$ атм. Все операции, требующие соблюдения условий стерильности, проводили в ламинар-боксе. Процессы регенерации и размножения изучали в контролируемых условиях: фотопериод 16/8 ч свет/темнота, 25 ± 10 °С. Период между субкультивированием составлял 25 суток.

Результаты и их обсуждение. На этапе введения первичного растительного материала в культуру in vitro важным моментом является поиск эффективных условий поверхностной стерилизации растительного материала. Часто для стерилизации очень загрязненного растительного материала используют ртуть-содержащие стериленты, в том числе $HgCl_2$. В нашем исследовании был применен 0,2% раствор сулемы. Однако необходимо учитывать и время нахождения растительного материала в этом растворе. Результаты данного эксперимента приведены в таблице 1.

Таблица 1
 Влияние 0,2% $HgCl_2$ на жизнеспособность почек *Adonis vernalis* L in vitro (n = 20)

Экспозиция, мин	Инфицированность, %	Жизнеспособность, %
20	50	100
30	14	100
40	12	70

Представленные данные свидетельствуют о том, что для выхода большего количества неинфицированных жизнеспособных почек необходимо проводить поверхностную стерилизацию первичного растительного материала в 0,2% растворе сулемы в течение 30 мин.

Изолированные почки адониса весеннего в течение первых четырех пассажей культивировали на среде МС, дополненной БАП 2 мкМ, ГК 2 мкМ, НУК 0,5 мкМ. За этот период удалось вывести из состояния покоя не только апикальные, но и пазушные почки: к концу периода культивирования происходило образование множества побегов, имеющих общее основание. Основной сложностью культивирования адониса весеннего являлось ингибирование ростовых процессов токсичными продуктами метаболизма. Поэтому в питательные среды добавляли различные антиоксиданты: глутатион, ЭДТА, лимонную кислоту. Однако в наших экспериментах эти вещества оказались неэффективными.

На этапе микроразмножения *Adonis vernalis* L. использовали различные питательные среды, в частности, МС, В₅, А, ХРД (табл. 2).

Таблица 2

Влияние минеральной основы на регенерацию побегов *Adonis vernalis* L в присутствии БАП 5мкМ (n = 20)

Минеральная основа	Количество побегов, шт./эксп.	Высота побега, см
МС	5,5	1,5
А	4,9	1,5
В ₅	3,4	1,2
ХРД	3,0	1,1
НСР _{0,05}	0,5	0,2

Данные, представленные в таблице 2, показывают, что на средах МС и А количество регенерировавших побегов на эксплант составляло в среднем 5,5 и 4,9 шт./экспл. соответственно. Однако на среде МС листья были более крупные и развитые, чем на всех других испытанных питательных средах. Необходимо также отметить, что на среде А, характеризующейся более низким содержанием минеральных солей, количество формирующихся побегов лишь незначительно отличалось от такового по сравнению со средой МС. Возможно, это связано с тем, что для адониса необходимо одновременное присутствие относительно высокой концентрации в составе среды азота в форме NH_4^+ и NO_3^- , что обеспечивает применение среды МС в сравнении с другими, используемыми в данном эксперименте:

МС – (NH_4NO_3 – 1650 мг/л, KNO_3 – 1900 мг/л);
 А – (NH_4NO_3 – 400 мг/л, KNO_3 – 480 мг/л);
 В₅ – (KNO_3 2500 мг/л, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 134 мг/л);
 ХРД – (KNO_3 – 80 мг/л, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ – 400 мг/л).

Поэтому в последующих экспериментах питательная среда МС была взята нами за основу. О широком использовании минеральной основы среды МС имеются сообщения для ряда других лекарственных растений, например,

Anthemis nobilis [8]; *Hibiscus rosa Sinensis* [9]; *Rhodiola rosea* и *R. Iremelica borris* [10]. Регенерационные процессы индуцировали и изучали при добавлении в среду МС регуляторов роста цитокининовой природы: БАП, 2iP, К (табл. 3).

Таблица 3

Влияние цитокининов на регенерацию побегов *Adonis vernalis* L в культуре in vitro (n = 10)

Среда	Количество побегов, шт./эксп.
МС + БАП 2 мкМ	4,2
МС + БАП 5 мкМ	5,5
МС + БАП 10 мкМ	3,4
МС + БАП 20 мкМ	2,9
МС + БАП 40 мкМ	1,9
МС + 2iP 1 мкМ	2,5
МС + 2iP 5 мкМ	2,9
МС + 2iP10 мкМ	3,8
МС + К 5 мкМ	3,9
МС + К 10мкМ	4,2
МС – контроль	0,8
НСР _{0,05}	0,8

Результаты, представленные в таблице 3, показывают, что пролиферация побегов отмечалась на всех вариантах сред. Наиболее эффективным стимулятором регенерационных процессов оказался БАП в концентрации 5 мкМ. Среднее количество побегов на эксплант составляло 5,5. Использование других цитокининов было менее эффективно при такой же используемой их концентрации. Аналогичные данные получены в экспериментах с наперстянкой шерстистой, где использование 5 мкМ БАП оказалось лучшей концентрацией для образования и развития точек роста изолированных апикальных почек [11]. Увеличение концентрации БАП до 40 мкМ приводило к угнетению процессов регенерации побегов. Среднее количество побегов на эксплант не превышало 1,9. Данное количество цитокинина в культивируемых тканях оказалось выше физиологического уровня и проявилось его ингибирующее действие на процессы регенерации.

Кроме вариабельности по количественным показателям, использование различных по химической природе цитокининов продемонстрировало и вариабельность в морфологии регенерирующих побегов: введение в состав среды кинетина приводило к уменьшению размеров листовых пластинок, формирующихся на чрезвычайно тонких черешках.

Таким образом, для изолированных вегетативных почек *Adonis vernalis* L в качестве минеральной основы необходимо использовать основную среду по прописи МС, дополненную стимулятором регенерационных процессов – цитокинином БАП (5 мкМ).

Литература

1. Минаева В.Г. Лекарственные растения Сибири. Новосибирск, 1991.
2. Верецагина И.В. Зеленое чудо Алтая. Барнаул, 1983.
3. Лекарственные растения Сибири для лечения сердечно-сосудистых заболеваний / Н.В. Казаринова, М.Н. Ломоносова, В.М. Триль и др. Новосибирск, 1991.
4. Красная книга. Дикорастущие виды флоры СССР, нуждающиеся в охране / Под ред. А.Л. Тахтаджяна. Л., 1975.
5. Красная книга Алтайского края. Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды растений / Под ред. Р.В. Камелина. Барнаул, 1998.
6. Соболевская К.А. Исчезающие растения Сибири в интродукции. Новосибирск, 1984.
7. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев, 1980.
8. Clonal micropropagation of Roman chamomile (*Anthemis nobilis* L.) / Echeverrigray Segio, Biaso Simone, Fracaro Fernando, Serafini Lucian Atti // J. Herbs, Spices and Med. Plants. 2000. 7, №2.
9. Development of tissue culture methods for multiplication of *Hibiscus rosa Sinensis*: Abstr. World Congr. In vitro Biol., San Francisco, Calif, June 22-27, 1996 / Carter Johnny, Khir Seema // In vitro Cell and Dev. Biol. Anim. 1996. 32, №3.
10. Ишмуратова М.М. Клональное микроразмножение *Rhodiola rosea* L. и *R. iremelica borris* in vitro // Растительные ресурсы. 1998. Т. 34. Вып. 1.
11. Изучение действия регуляторов роста цитокининовой и ауксиновой природы на морфогенез изолированных верхушек наперстянки шерстистой / С.П. Михайлова, Г.С. Левандовский, Э.В. Дружинина и др. // Биология культивируемых клеток и биотехнология: Тез. докл. междунар. конф., Новосибирск, 2-6 августа 1988 г. Новосибирск, 1988.