

ЛОМОНОСОВ-2010

УДК 581.1

“ИСКУССТВЕННЫЕ СЕМЕНА” КАК СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ЭКОЛОГИЧЕСКИ ЧИСТОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СЫРЬЯ И СОХРАНЕНИЯ ИСЧЕЗАЮЩИХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ

М.Ю. Вдовитченко, И.Н. Кузовкина

(Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва;
e-mail: maria.vdovitchenko@gmail.com)

Исследовано влияние инкапсулирования в гелевую оболочку сегментов изолированно растущих рRi T-ДНК трансформированных корней лекарственного растения шлемника байкальского (*Scutellaria baicalensis* Georgi) на морфологические, анатомические, физиологические и биохимические параметры корневых культур, возобновляемых из так называемых “искусственных семян” (ИС). Полученные ИС сохраняли жизнеспособность после длительного хранения при температуре +4°. С помощью инкапсулирования было проведено обновление и оздоровление корневой культуры шлемника. При изучении анатомических особенностей культуры корней, возобновленной из ИС, было отмечено формирование хлоропластов в клетках корней, культивируемых в условиях освещения. Определено общее количество хлорофилла и соотношение хлорофиллов *a* и *b*, а также содержание флавонов в зеленых корнях.

Ключевые слова: “искусственные семена”, иммобилизация, hairy roots, зеленые корни.

Метод получения искусственных семян впервые был применен при микроклональном размножении для культивирования соматических эмбрионов, которые помещали в искусственный эндосперм и ограничивали искусственной семенной оболочкой [1]. В настоящее время искусственными семенами (ИС) называют капсулированные в гелевую оболочку не только соматические эмбрионы, но и пазушные и верхушечные почки, а также стеблевые и корневые сегменты. Существует небольшое количество публикаций с результатами инкапсулирования корневых фрагментов для последующего микроклонального размножения растений [2] или криосохранения растительного материала [3].

В данной работе на примере рRi T-ДНК трансформированных корней ценного лекарственного растения шлемника байкальского (*Scutellaria baicalensis* Georgi) была исследована возможность применения метода получения ИС из корневых фрагментов в практике культивирования корней *in vitro* с целью получения экологически чистого лекарственного сырья корневого происхождения.

Материалы и методы

Растительный материал. Для получения искусственных семян была использована культура генетически трансформированных корней шлемника байкальского (*Scutellaria baicalensis* Georgi), полу-

ченная с помощью рRi T-ДНК дикого штамма (A4) *Agrobacterium rhizogenes* [4]. Апикальные участки корней вручную разрезали на фрагменты длиной 2–3 мм, которые затем смешивали с гелеподобным 3,5%-м раствором альгината натрия, содержащим питательные вещества безгормональных культуральных сред Гамборга (B5) или Мурасиге и Скуга (МС) с уменьшенным вдвое содержанием азота. В состав гелевого матрикса вводили в случае необходимости антибиотик клафоран (cefotaxime) в концентрации 300–550 мг/л. Для закрепления геля и образования капсул использовали 70 мМ раствор CaCl₂, время выдерживания капсул в растворе CaCl₂ составляло 8–10 мин, после чего их промывали дистиллированной водой. Для исключения преждевременного прорастания ИС помещали на хранение в стерильные чашки Петри без питательной среды в условия низких положительных температур, проводя, таким образом, иммобилизацию корневых фрагментов.

Определение содержания флавонов в корнях шлемника байкальского проводили по методике, описанной в более ранней работе [4].

Содержание хлорофилла *a* и *b* в зеленых корнях шлемника байкальского определяли по методу Wintermans & De Motts [5].

Результаты и обсуждение

При переносе ИС после хранения при пониженных положительных температурах на питательную

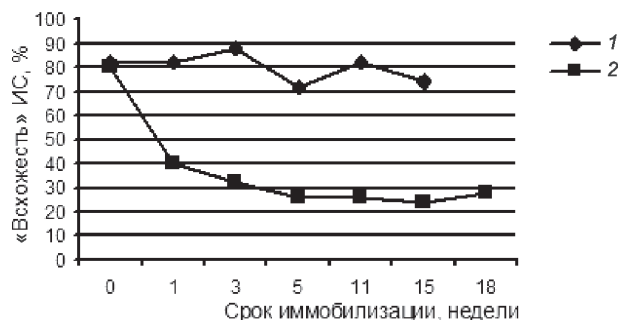


Рис. 1. Влияние возраста исходной культуры на жизнеспособность ИС: 1 — 3-недельная культура; 2 — 6-недельная культура

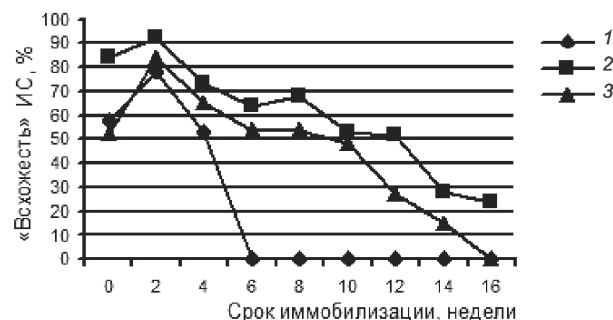


Рис. 2. Влияние состава гелевой оболочки на жизнеспособность ИС: 1 — без питательных веществ; 2 — среда В-5; 3 — среда МС

среду в условия $+26^{\circ}$ наблюдалась активация корневых меристем инкапсулированных фрагментов, что приводило к прорастанию корней на 3–4-й день через альгинатную оболочку и к образованию хорошо растущей массы ветвящихся корней.

На «всхожесть» ИС после хранения существенно влиял состав питательных веществ гелевого матрикса ИС, а также возраст исходных корневых эксплантов, взятых для инкапсулирования. Было отмечено, что всхожесть ИС шлемника после 4,5 месяцев хранения была выше у семян, полученных из 2-недельных корневых культур: она составляла 80% против 25% жизнеспособных корневых фрагментов, полученных из 6-недельной культуры корней (рис. 1). Корневые фрагменты шлемника лучше сохранялись в оболочке со средой Гамборга (В-5), чем со средой Мурасиге и Скуга (рис. 2).

Проросшие кончики корней отделяли, помещали в жидкую питательную среду того же состава и культивировали в условиях качания (90 об/мин) в темноте в течение 3–4 недель до образования хорошо растущей массы корней. Для контроля стерильности полученных таким образом из ИС корневых культур отбирали пробы культуральной среды на контаминацию.

Установлено, что заключение случайно инфицированных корневых фрагментов в оболочку, содержащую антибиотик, даже после 2-недельной иммобилизации ИС давало начало обновленной корне-

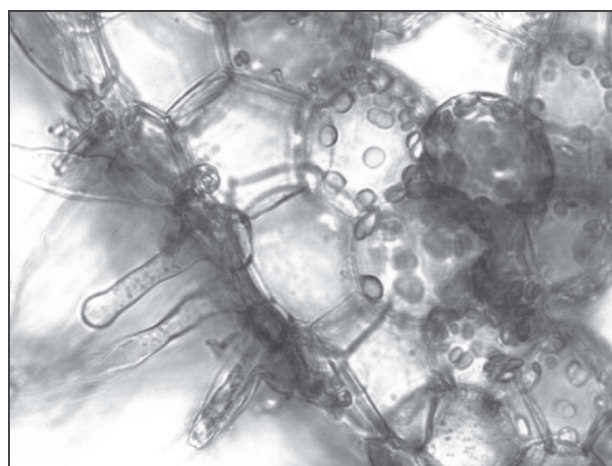


Рис. 3. Поперечный срез корня (увеличение $\times 400$)

вой культуре шлемника байкальского, сохранявшей стабильную стерильность.

Ростовая активность и масса обновленной после инфицирования культуры корня шлемника байкальского, полученной из ИС, почти в 2 раза превышала массу исходной культуры корней того же возраста, а общее содержание основных флавонов в пересчете на 1 г сухой корневой массы увеличивалось почти в 3 раза (табл. 1). Таким образом, общая продуктивность культуры корня существенно возрастала.

Таблица 1

Оценка продуктивности культуры корней шлемника байкальского до и после применения метода искусственных семян

Основные показатели	Здоровая корневая культура	Инфицированная корневая культура до обновления	Корневая культура, полученная из ИС
Сырой вес корней, г	$18,5 \pm 1,3$	$11,4 \pm 1,3$	$19,3 \pm 1,5$
Доля сухого вещества, %	$6,3 \pm 0,2$	$9,9 \pm 0,2$	$6,4 \pm 0,2$
Содержание основных флавонов, мг/г сухого вещества	$22,4 \pm 0,2$	$8,2 \pm 0,1$	$21,4 \pm 0,4$
Содержание флавонов в 6-недельной культуре, мг/колба	$26,1 \pm 0,3$	$9,3 \pm 0,2$	$26,4 \pm 0,4$

При изучении влияния иммобилизации корневых фрагментов на морфологические и анатомические параметры корней было отмечено интенсивное позеленение корней, культивируемых в условиях освещения. Микроскопирование срезов позеленевших корней показало наличие в клетках большого количества хорошо сформированных хлоропластов (рис. 3).

В результате сравнения общего содержания хлорофилла в зеленых корнях и надземных органах шлемника установлено, что содержание хлорофилла в зеленых корнях было выше, чем в стеблях интактных растений.

Химический анализ показал, что формирование в корнях хлоропластов сопровождалось снижением в зеленеющих корнях содержания флавоноидов (табл. 2).

Таблица 2

**Среднее содержание хлорофилла и флавоноидов
в зеленеющих корнях и надземных органах
шлемника байкальского**

Объекты исследования	Хлорофиллы, мг на 1 г сухого вещества		Флавоноиды, мг на 1 г сухого вещества
	a + b	a : b	
Зеленеющие корни из ИС	1,82	1,85	16,2 ± 0,5
3-недельная корневая культура	—	—	22,5 ± 0,3
6-недельная корневая культура	—	—	26,6 ± 0,1
Стебель	0,27	2,75	22,3 ± 0,2
Лист	5,19	3,10	49,8 ± 0,6

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Murashige T. Plant growth substances in commercial uses of tissue culture // In *Frontiers of Plant Tissue Culture* / Ed. T. Thrope. Calgary: International Association of Plant Tissue Culture, 1978. P. 15—26.
2. Uozumi N., Nakashimada Y., Kato Y., Andy Kobayashi T. Production of artificial seed from horseradish hairy root // *J. Ferment. Bioeng.* 1992. Vol. 74. P. 21—26.
3. Hirata K., Mukai M., Goda S., Ishio-Kinugasa M., Yoshida K., Sakai A., Miyamoto K. Cryopreservation of hairy

Закключение

Способ получения ИС в практике культивирования изолированно растущих корней лекарственных растений позволил получить оздоровленную, хорошо растущую и продуктивную массу корней шлемника байкальского, а также снизил риск потери культуры в результате контаминации.

Использование ИС в качестве исходных инокулятов при крупномасштабном выращивании корней шлемника байкальского должно обеспечить надежность транспортировки и подготовки маточных эксплантов, что в свою очередь сохранит стабильность высокопродуктивного штамма *hairy roots* шлемника, а также стерильность корневой массы, культивируемой в биореакторе.

Способность клеток корней, полученных из ИС, к образованию хлоропластов в условиях освещения может при определенных условиях стать предпосылкой к регенерации целого растения шлемника, размножающегося исключительно семенами, что будет способствовать разработке микрклонального способа получения целых растений и сохранению естественных ресурсов исчезающего лекарственного растения.

root cultures of *Vinca minor* (L.) by encapsulation-dehydration // *Biotechnology Letters*. 2002. Vol. 24. P. 371—376.

4. Кузовкина И.Н., Гусева А.В., Ковач Д., Сёке Е., Вдовитченко М.Ю. Флавоны генетически трансформированных корней шлемника байкальского (*Scutellaria baicalensis* Georgi) и индукция их образования при элиситации метилжасмонатом // *Физиол. раст.* 2005. Т. 52. С. 90—96.

5. Wintermans J.F., De Mols A. Spectrophotometric characteristics of chlorophyll *a* and *b* and their pheophytins in ethanol // *Biochim. Biophys. Acta*. 1965. Vol. 109. P. 448—453.

Поступила в редакцию
28.05.10

ARTIFICIAL SEEDS AS THE METHOD OF THE ECOLOGICAL PURE MEDICINAL RAW MATERIAL PRODUCTION AND THE WAY OF PRESERVATION OF THE RARE PLANTS

M. Yu. Vdovitchenko, I. N. Kuzovkina

Artificial seeds production by the encapsulation of somatic embryos in alginate gel is widely applied method in micropropagation. In this study, artificial seeds were obtained from pRi T-DNA transformed roots (known also as “hairy root culture”) of skullcap (*Scutellaria baicalensis* Georgi). Root segments in artificial seeds were viable after prolonged storage at +4°C. The main parameters of hairy root cultures, produced from the artificial seeds, were investigated. Using encapsulation method, the hairy root culture of skullcap with higher productivity was obtained. After encapsulation there was observed the chloroplasts formation in root cells under light conditions, and the total amount of chlorophyll and the content of flavonoids in green roots were determined.

Key words: *artificial seeds, immobilization, hairy roots, green roots.*

Сведения об авторах

Вдовитченко Мария Юрьевна — науч. сотр. Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва. Тел.: (495)977-92-11; e-mail: maria.vdovitchenko@gmail.com

Кузовкина Инна Николаевна — науч. сотр. Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва. Тел.: (495)977-92-11; e-mail: kuzovkin@ippras.ru