НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Ботанические сады как центры изучения и сохранения фиторазнообразия

Труды Международной научной конференции, посвященной
140-летию Сибирского ботанического сада
Томского государственного университета

Томск, 28–30 сентября 2020 г.

Томск
Издательство Томского государственного университета
2020

Микроклональное размножение представителей рода *Primulina* Hance, выращиваемых в Сибирском ботаническом саду НИ ТГУ

Л.В. Хоцкова¹, А.П. Капустина²

¹Сибирский ботанический сад Национального исследовательского Томского государственного университета, Томск, Россия, lyubava77kh@gmail.com

²Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия, kapstaps.kt@gmail.com

Аннотация. Приведены результаты исследования по введению в культуру *in vitro* представителей малоизученного рода *Primulina* Hance из коллекционного фонда тропических и субтропических растений Сибирского ботанического сада НИ ТГУ, являющимися редкими и экзотическими растениями. Подобраны оптимальные стерилизующие вещества при введении в асептическую культуру. Добавление в питательную среду лактата хитозана и фитогормонов ускорило развитие регенерантов.

Ключевые слова: культура *in vitro*, листовые экспланты, органогенез, регенеранты, фитогормоны, хитозан, *Primulina*.

Clonal micropropagation of representatives of the genus *Primulina* Hance grown in the Siberian Botanical Garden of the National Research Tomsk State University

L.V. Khotskova¹, A.P. Kapustina²

¹Siberian Botanical Garden of National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia, lyubava77kh@gmail.com

²National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia, kapstaps.kt@gmail.com

Abstract. The results of a study on the introduction into *in vitro* culture of representatives of the little-studied genus *Primulina* Hance from the collection fund of tropical and subtropical plants of the Siberian Botanical Garden of the National Research Tomsk State University, which are rare and exotic plants, are presented. The optimal sterilizing substances have been selected for the introduction into an aseptic culture. The addition of chitosan lactate and phytohormones to the nutrient medium accelerated a growth and development of regenerants.

Key words: *in vitro* culture, leaf explants, shoot organogenesis, regenerants, phytohormones, chitosan, *Primulina*.

Методы культивирования изолированных клеток, органов и тканей сегодня находят широкое применение в экспериментальной биологии и используются во многих биотехнологических процессах, в которые включены высшие растения. Клональное микроразмножение ценных и уникальных генотипов растений *in vitro* и сохранения генофонда растений в мировом масштабе является одной из приоритетных целей применения биотехнологических методов. Оно основано на использовании тотипотентности – свойства растительной клетки реализовать генетическую информацию, обеспечивающую ее дифференцировку и развитие до целого организма (Атанасов, 1993).

Виды и сорта рода *Primulina* Hance (ранее – *Chirita*, сем. Gesneriaceae Dumort.) являются наименее изученными растениями во многих областях науки – химии, фармакологии, медицине, генной инженерии, биотехнологии. Растения этого рода являются редкими и экзотическими, часто это эндемичные виды. В настоящее время ученые открывают всё новые виды этой группы преимущественно в Китае, Шри-Ланке, Малайзии, Индии, Таиланде. В природе их можно обнаружить на утесах и внутри карстовых пещер. Антропогенные изменения показателей освещенности и влажности естественных сред обитания данных видов, концентрации диоксида углерода, химического состава почвы и грунтовых вод приводят к тому, что эндемичные виды примулины становятся исчезающими (Padmanabhan et al., 2014). Малая изученность видов рода *Primulina*, низкий процент всхожести семян, высокие декоративные качества, угроза исчезновения в природе вкупе с повышенным интересом цветоводов к данной группе растений определяет актуальность применения метода микроклонального размножения.

Целью нашей работы являлась разработка технологии микроклонального размножения представителей рода *Primulina*, выращиваемых в коллекционных фондах тропических и субтропических расте-

ний Сибирского ботанического сада Национального исследовательского Томского государственного университета (СибБС НИ ТГУ). Для достижения цели были поставлены следующие задачи: подобрать оптимальный тип экспланта и режим стерилизации посадочного материала, выявить влияние состава питательной среды на продуцирование адвентивных почек и установить сроки выращивания регенерантов в асептической культуре.

Объектами нашего исследования послужили представители рода *Primulina* Hance – *Primulina subrhomboidea* W.T.Wang, *Primulina Aiko* (Toshijiro Okuta) и *Primulina Stardust* (Boggan) (рис. 1). Виды рода примулина представляют собой многолетние наземные бесстебельные травы. Жизненная форма растения – геофит. На вентральной стороне листьев, собранных в розетку, имеется опушение и железистые волоски. Соцветия пазушные, представляют собой зонтики с двумя прицветниками. Чашечка актиноморфная, содержит 5 лепестков. Венчик зигоморфный. Трубка цилиндрическая, вентральная губа двуллопастная, латеральная – трехлопастная. Три стаминодия, сближенные пыльники. Плод – коробочка (Padmanabhan et al., 2014).

Рис. 1. Представители рода *Primulina* Hance, выращиваемые в коллекционных фондах Сибирского ботанического сада НИ ТГУ: а – *P. subrhomboidea* W.T.Wang; б – *Primulina Aiko* (Toshijiro Okuta); в – *Primulina Stardust* (Boggan) (фото Л.В. Хоцковой)

В качестве субстрата для посадки эксплантов была использована твердая питательная среда Мурасиге-Скуга (MS) (Murashige, Skoog, 1962) со стандартным и уменьшенным в два раза содержанием макро- и микросолей, витаминов, аминокислот. Содержание агар-агара в питательных средах составило 15 г/л, сахарозы – 25 г/л. На этапе собственно размножения, после появления адвентивных почек в материнской ткани, в питательную среду MS был добавлен водный раствор биоактиватора роста «Экогель» (действующее вещество: 30 г/л лактата хитозана, производитель: ООО «Биохимические Технологии», Россия) в концентрации 1 мл/л. K.L. Nge с соавторами (2006) было показано, что небольшое содержание низкомолекулярного хитозана в питательной среде оказывает стимулирующий эффект на рост и развитие растений. В качестве регуляторов роста регенерантов были использованы фитогормоны в различных сочетаниях: цитокинины (6-бензиламинопурин (БАП), кинетин) и ауксины (3-индолилуксусная кислота (ИУК), α -нафтилуксусная кислота (НУК)). Фитогормоны и «Экогель» добавляли в питательные среды до автоклавирования. Колбы Эрленмейера на 250 мл с питательной средой были автоклавированы 20 мин. при 121°C и давлении 0,15 МПа, после чего в условиях ламинарного бокса производили розлив горячих питательных сред по культуральным сосудам объемом 100 мл. Приготовленные питательные среды были выдержаны в стерильных условиях при температуре +23°C в течение 7 дней для контроля инфицирования спорами грибов и бактерий до использования.

Для введения эксплантов *Primulina* в культуру *in vitro* использовали молодые листья из средней части розетки, которые срезали с материнского растения острой бритвой, чтобы уменьшить раневую поверхность. Поскольку листья имели густое опушение и железистые волоски, стерилизацию растительного материала проводили в несколько этапов, завершая каждый из них трехкратной промывкой в стерильной дистиллированной воде (табл.).

После стерилизации, в условиях ламинарного бокса, части листьев были подсушены и острым бритвенным лезвием были обработаны срезы до живой ткани, удалены некротизированные участки. Листья были разрезаны на сегменты размером 1,0 мм $\times$ 0,3 мм и с помощью стерильного пинцета размещены абаксиальной и адаксиальной стороной на поверхности агаризованных питательных сред с со-

держанием фитогормонов в разных сочетаниях. Емкости были закрыты алюминиевой фольгой. Культуры растений содержали на свету белых люминесцентных ламп с интенсивностью освещения 10 клк. Температура воздуха в культуральной комнате составляла 23°C, влажность воздуха – 65%. Фотопериод составил 14 ч света/10 ч темноты. Такие условия культивирования поддерживались на протяжении всего эксперимента.

Этапы стерилизации посадочного материала представителей рода *Primulina* Hance при введении в культуру *in vitro* и выход стерильного материала

Название	Предварительная подготовка растительного материала	Этап первичной стерилизации (нестерильные условия)	Этап собственно стерилизации (стерильные условия)	Доля жизнеспособных стерильных эксплантов
<i>Primulina Stardust</i>	В проточной воде с мылом – 30 мин	0,005 % раствор «Доместос» – 30 мин	70 % этанол – 1 мин, затем 3 % раствор перекиси водорода – 5 мин	100 %
<i>Primulina subrhomboidea</i>		0,02 % раствор «Ника-экстра М» – 10 мин	70 % этанол – 30 с, затем 3 % раствор перекиси водорода – 5 мин	100 %
<i>Primulina Aiko</i>			70 % этанол – 1 мин, затем 3 % раствор перекиси водорода – 10 мин	100 %

Контроль инфицирования эксплантов спорами грибов и бактерий был проведен через 7–10 дней, некроза – через 10–60 дней после посадки. Инфицированные и некротизированные экспланты были отбракованы. Пересадка эксплантов и регенерантов на свежие питательные среды осуществлялась каждые 4–5 недель. Измерение ростовых параметров (длины стебля, корня, листьев, ширину листовой пластинки, число листьев и корней) регенерантов *Primulina* было проведено в момент пересадки их из стерильных условий для последующего выращивания в условиях теплицы. Данные представлены в виде средней арифметической $\pm$ среднее отклонение по выборке.

В ходе исследования нами было обнаружено, что в эксперименте по влиянию стерилизующих веществ на жизнеспособность эксплантов через неделю от дня посадки контроль стерильности был равен 100% у всех модельных объектов (табл. 1), однако развившийся в последствии некроз ткани привел к гибели 50% эксплантов *Primulina Stardust* и более 90% у двух других представителей. Через 40 дней после начала культивирования у жизнеспособных стерильных эксплантов листа *Primulina Stardust*, размещенных адаксиальной стороной к питательной среде, начался процесс ризогенеза на MS с добавлением 1 мг/л кинетина и 0,1 мг/л ИУК и на MS с добавлением 2 мг/л кинетина и 0,1 мг/л ИУК, без содержания «Экогеля». Корни образовались в местах среза листовой пластинки поперек центральной и боковым жилкам, по 2–3 шт./эксплант. Образование первых адвентивных почек у эксплантов *Primulina Stardust* было отмечено через 67 дней от начала культивирования на питательных средах MS с тем же сочетанием фитогормонов и с добавлением «Экогеля», содержание которых в питательной среде активно влияло также и на процесс пролиферации адвентивных почек и роста регенерантов. Через 10 месяцев выращивания в асептических условиях регенеранты *Primulina Stardust* имели по 4–7 листьев и корней и были готовы к высадке *ex vitro*. Было отмечено, что молодые побеги примулины на данном этапе развития имели очередное листорасположение, листья $0,9 \pm 0,4$ см длиной и $0,4 \pm 0,1$ см шириной; длина побега составила $2,5 \pm 0,5$ см, длина корня $0,9 \pm 0,2$ см. Число побегов, регенерированных на один эксплант, было наибольшим на MS с добавлением 1 мг/л кинетина и 0,1 мг/л ИУК и 1 мл/л водного раствора лактата хитозана («Экогель»), и насчитывало 13 шт./эксплант. Выживаемость регенерантов *Primulina Stardust* после 4 недель пересадки в теплице составила 98 %.

Таким образом, нами предложена методика размножения *in vitro* представителей рода *Primulina*.

ЛИТЕРАТУРА

Атанасов А. Биотехнология в растениеводстве. Новосибирск: ИГиГ СО РАН, 1993. 242 с.

Padmanabhan P., Murch S.J., Sullivan J.A., Saxena P.K. Development of an efficient protocol for high frequency *in vitro* regeneration of a horticultural plant *Primulina tamiana* (B.L. Burt) Mich. Möller & A. Webber // Canadian journal of plant science. 2014. № 94 (7). P. 1281–1287.

Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiol. Plant. 1962. Vol. 15, № 3. P. 473–497.

Nge K.L., New N., Chandkrachang S., Stewens W.F. Chitosan as a growth stimulator in orchid tissue culture // Plant Science. 2006. № 170. P. 1185–1190.