
УДК 631.811.98:581.143.6

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ ВЫРАЩИВАНИЯ ЯТРЫШНИКА МУЖСКОГО

Алибаева А.М.¹, Зарипова А.А., к.б.н.²

¹ ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный университет», г. Уфа

² Южно-Уральский ботанический сад-институт Уфимского федерального
исследовательского центра Российской академии наук, г. Уфа

E-mail: zaripova.al@mail.ru

В современной медицине значительно возрастает использование растений и синтезируемых ими БАВ. Многие лекарственные растения относятся к редким и ресурсным видам, поэтому метод культуры клеток растений является незаменимым для воспроизведения их сырья. С целью получения жизнеспособной культуры семян ятрышника мужского *in vitro* поставлены задачи подбора оптимальной схемы стерилизации и питательной среды для проращивания. Апробирован метод асимбиотического культивирования. Максимального числа стерильных жизнеспособных (81,0 %) семян удалось достичь при выдерживании в 70 %-м этаноле в течение 0,5 мин и 0,1 %-м растворе диацита в течение 7 мин. Выявлена среда для прорастания семян *O. mascula* - Van Waes & Deberg (VD), содержащая регуляторы роста НУК и кинетин по 1 и 4 мг/л.

Ключевые слова: лекарственное растение, ятрышник мужской, культивирование *in vitro*, питательная среда, асимбиотическое выращивание

THE USE OF BIOTECHNOLOGY FOR GROWING *ORCHIS MASCULA* L.

Alibaeva A.M.¹, Zaripova A.A., candidate of Biology²

¹Bashkir state University, Ufa

²South-Ural Botanical Garden-Institute, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of
Sciences, Ufa

E-mail: zaripova.al@mail.ru

In modern medicine, the use of plants and BAS (biologically active substance) synthesized by them increases significantly. Many medicinal plants are rare and resource species, so the method of plant cell culture is indispensable for the reproduction of their raw materials. In order to obtain a viable culture of *Orchis mascula* L. seeds *in vitro*, the tasks of selecting the optimal sterilization scheme and nutrient medium for germination are set. The method of symbiotic cultivation was tested. The maximum number of sterile viable (81.0 %) seeds was achieved when kept in 70% ethanol for 0.5 min and 0.1 % diacid solution for 7 min. the medium for seed

germination of *O. mascula* - Van Waes & Deberg (VD) containing growth regulators NAA and kinetin of 1 and 4 mg/l was identified.

Keywords: medicinal plant, *Orchis mascula* L., cultivation in vitro, nutrient medium, symbiotic cultivation

Введение. Использование растений и синтезируемых ими БАВ в настоящее время значительно возрастает. В современной медицине широко используются препараты, обладающие противоопухолевой активностью, повышающие качество жизни (к примеру, адаптогены, биостимуляторы), сердечно-сосудистые, седативные, противовоспалительные и противомикробные лекарственные средства [1]. В связи с этим актуальны разработка технологий с применением биотехнологических способов размножения для плантационного выращивания, а также поиск альтернативных способов получения источников БАВ растительного происхождения [2]. Сбор растений в природе, особенно редких представителей флоры, создаёт необратимую угрозу для сохранения видов. Метод культуры клеток растений является незаменимым для воспроизведения сырья редких, исчезающих лекарственных растений. Одним из таких видов является ятрышник мужской (*Orchis mascula* L.). В лекарственных целях используются клубни растения. В них обнаружены горькие вещества, эфирные масла, слизь. Лекарственное сырье применяется при лечении заболеваний желудочно-кишечного тракта, кашле, циститах, зубной боли. Препараты на основе ятрышника действуют как профилактическое и общеукрепляющее средство, они используются для повышения потенции и при нервном истощении. Отвары клубней назначают для лечения параличей, судорог нижних конечностей, при гастритах. Отваром на молоке излечивают пневмонию, бронхиты.

Использование биотехнологии для сохранения растительных ресурсов ятрышника мужского связано также с заменой лекарственного сырья дикорастущих растений на биомассу культивируемых *in vitro* клеток. Преимуществами использования культивируемых клеток являются: возможность получения биологически активных веществ исчезающих и эндемичных видов, получение высокопродуктивных клеточных штаммов, экологически чистых с заданными параметрами роста и метаболизма. Клеточные технологии внедрены во многих странах мира, в том числе в России. В настоящее время на уровне лабораторных и промышленных регламентов получают гликозиды, алкалоиды, нафтохиноновые и другие соединения, представляющие ценность для медицины, пищевой и парфюмернокосметической промышленности [3].

Целью данной работы являлось получение стерильной жизнеспособной культуры *in vitro* *O. mascula*.

Материал и методы. В качестве материала для введения в культуру *in vitro* служили семена из нераскрывшихся коробочек *O. mascula*, произрастающих в природных популяциях. Визуально определяли степень зрелости плода по размеру, цвету, началу раскрытия коробочек. Сбор верхней части генеративного побега (целого соцветия) осуществляли в недозрелом состоянии, семена успешно дозревали в течение нескольких дней в процессе сушки. Зная примерные сроки цветения, можно приблизительно определить сроки сбора семян. С.А. Мамаев с соавторами [4] рекомендуют эффективное проращивание осуществлять незрелыми семенами на стадии 20-25 дней после опыления.

Хранение и посев осуществляли по методике изложенной другими исследователями [4, 5]. Перед закладкой на хранение для предотвращения развития патогенных бактерий и грибов обмакивали в 96 % этанол. После того как дезинфицирующий раствор испарился соцветия с плодами и отдельные коробочки, которые закладывали в пакеты из пергамента, подвешивали в стерильные прозрачные пластиковые емкости. Для предотвращения развития плесени на дно контейнера помещали силикагель, чтобы улавливать конденсат внутри емкости. Содержали семена до посева в холодильнике.

Для посева семян взяли целые неповрежденные коробочки 20-25 дней после опыления и зрелые семена. Коробочки с семенами подвергали поверхностной стерилизации в течение 1 мин в 70 %-м этаноле и 15 мин в 0,1 %-м растворе диацита, с последующей трехкратной промывкой в стерильной дистиллированной воде по 15 мин в каждой порции. Зрелые семена обрабатывали непосредственно стерилизующими веществами (табл. 1) в условиях ламинар-бокса с использованием насадки на шприц Millipore. Семена сначала выдерживали в 70%-м этаноле, а затем 0,1%-м растворе диацита.

Результаты. Максимального числа жизнеспособных (81,0 %) и меньшим числом инфицированных (12,0 %) семян удалось достичь при последовательном выдерживании в 70 %-м этаноле в течение 0,5 мин и 0,1 %-м растворе диацита в течение 7 мин (табл. 9). Наибольшая инфицированность и низкая жизнеспособность выявлена у семян, стерилизованных с использованием диацита в течение 3 мин. При обработке диацитом с экспозицией 9 мин семена теряли жизнеспособность.

Таблица 1 – Влияние стерилизующих растворов на показатели инфицированности и жизнеспособности семян *Orchis mascula* L. в культуре *in vitro*

Стерилизующие растворы		Доля эксплантов, %		
концентрация	экспозиция, мин	инфициро- ванных	жизнеспособных	некротизиро- ванных
70 % этанол, 0,1 % диацид	0,5	93,0	4,0	3,0
	3			
70 % этанол, 0,1 % диацид	0,5	49,0	40,0	11,0
	5			
70 % этанол, 0,1 % диацид	0,5	12,0	81,0	7,0
	7			
70 % этанол, 0,1 % диацид	0,5	2,0	25,0	73,0
	9			

Далее семена высевали на поверхность автоклавированных питательных сред Murashige & Skoog (MS) и Van Waes & Deberg (VD), содержащие регуляторы роста нафтилуксусную кислоту (НУК) и кинетин (КН) по 1-4 мг/л. Простерилизованные коробочки осторожно раскрывали скальпелем, семена равномерно высыпали на поверхности питательных сред.

Посеянные семена помещали в темноту при комнатной температуре на неделю для выявления стерильности посевов. Затем колбы с семенами перенесли в холодильник при температуре 4-6°C на 2 месяца. После холодной стратификации колбы с семенами содержали в темноте при комнатной температуре 22°C до начала прорастания. Через 2 месяца отмечали прорастание семян *O. mascula* (табл. 2, рис. 1).

Таблица 2 – Влияние питательной среды и концентрации регуляторов прорастание *Orchis mascula* L. *in vitro*

Среда	Регуляторы роста, мг/л	Среднее число проросших семян, %
MS	НУК 1	21,4±0,60
	КН 1	
	НУК 2	18,7±0,86
	КН 2	

	НУК 4 КН 4	9,8±0,97
VD	НУК 1 КН 1	62,5±0,38
	НУК 4 КН 4	47,3±0,99

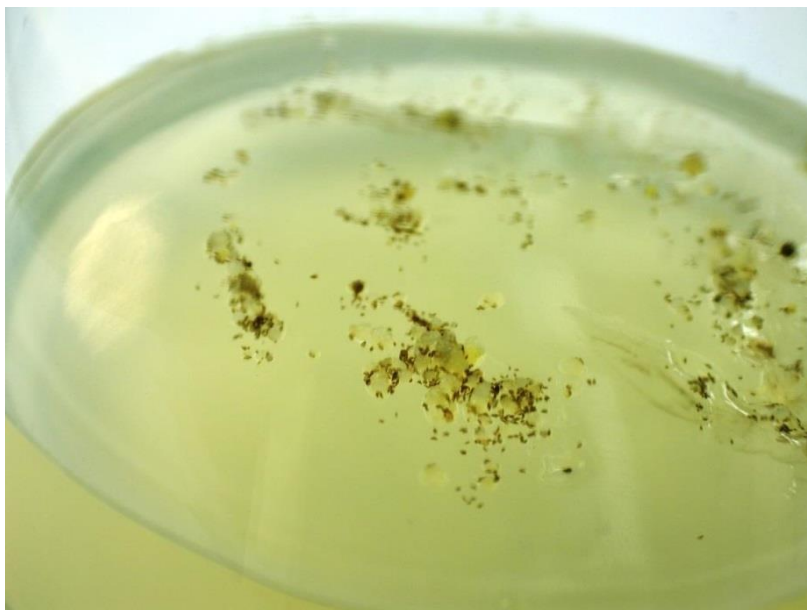


Рисунок 1 – Проращение семян *Orchis mascula* L. на среде MS, содержащей НУК 1 мг/л и КН 1 мг/л через 2 месяца после холодной стратификации в течение 2 месяцев

Наибольшее число проросших семян наблюдали на средах VD, с максимальной долей в варианте среды, содержащей НУК и КН в концентрации по 1 мг/л. Приведенная концентрация регуляторов роста также способствовала большему проценту развития семян *O. mascula*.

Спустя 4 месяца образовывались глобулы с максимальным размером 4x5x3 мм (рис. 2). Семена, которые культивировались нами только на свету, не прорастали совсем но, начинали прорастать при помещении их в темноту. А.И. Широков с соавторами [5] отмечает, что до момента проращения семян колбы с посевами необходимо содержать в абсолютной темноте, т.к. свет существенно тормозит процесс проращения семян орхидных.

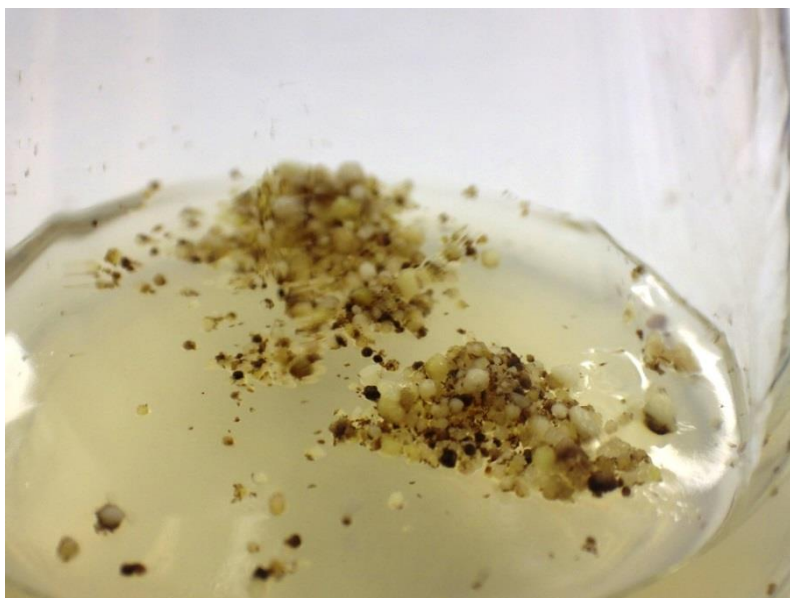


Рисунок 2 – Проращивание семян *Orchis mascula* L. на среде Van Waes & Deberg, содержащей НУК 1 мг/л и КН 1 мг/л через 4 месяца

Заключение. Таким образом, при введении в культуру *in vitro* семян *O. mascula* методом асимбиотического проращивания подобрана схема асептической обработки семян. Максимального числа стерильных жизнеспособных (81,0 %) семян удалось достичь при последовательном выдерживании в 70 %-м этаноле в течение 0,5 мин и 0,1 %-м растворе диоксида в течение 7 мин. целых коробочек с семенами при поверхностной стерилизации в течение 1 мин в 70 %-м этаноле и 15 мин в 0,1 %-м растворе диоксида. Выявлена оптимальная среда для проращивания семян *O. mascula* - Van Waes & Deberg (VD). Лучшей концентрацией регуляторов роста НУК и КН является 1 мг/л.

Библиографический список

1. Решетников В.Н., Спиридович Е.В., Фоменко Т., Носов А.М. Растительная биотехнология – способ рационального использования биосинтетического потенциала // Наука и инновации. 2014. №5 (135). С. 21-25.
2. Носов А.М. Использование клеточных технологий для промышленного получения биологически активных веществ растительного происхождения // Биотехнология. 2010, №5. С. 8-28.
3. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіологобіохімічні основи. К.: Логос, 2005. 750с.
4. Мамаев С.А., Князев М.С., Куликов П.В., Филиппов Е.Г. Орхидные Урала: систематика, биология, охрана // Екатеринбург: УрО РАН, 2004. 12 с.
5. Широков А.И., Коломейцева Г.Л., Буров А.В., Каменева Е.В. Культивирование орхидей европейской России. Нижний Новгород: Сиб-Принт, 2005. 64 с.