

УДК 582.717:57.082.261

UDC 582.717:57.082.261

03.00.00 Биологические науки

Biological sciences

**ОБ ОСОБЕННОСТЯХ НАЧАЛЬНОГО ЭТАПА КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ БАДАНА ТОЛСТОЛИСТНОГО (*BERGENIA CRASSIFOLIA* L.) IN VITRO В ЯКУТИИ**

**SPECIAL ASPECTS OF THE INITIAL STAGE OF *BERGENIA CRASSIFOLIA* L. CLONAL MICROREPRODUCTION IN VITRO IN YAKUTIA**

Дарханова Валентина Гаврильевна  
научный сотрудник, SPIN – код: 1643-9942  
e-mail: [darhana@mail.ru](mailto:darhana@mail.ru)  
ФГБУН Институт биологических проблем  
криолитозоны СО РАН, Россия, 677980, Якутск,  
пр. Ленина, 41

Darkhanova Valentina Gavrilyevna  
researcher, RSCI SPIN-code: 1643-9942  
e-mail: [darhana@mail.ru](mailto:darhana@mail.ru)  
FGBUN Institute for biological problems of  
cryolithozone SB RAS, Russia, 677980 Yakutsk, 41  
Lenin av.

Строева Наталья Семеновна  
научный сотрудник, SPIN – код: 8391-7960  
e-mail: [natali.stroeva.62@mail.ru](mailto:natali.stroeva.62@mail.ru)  
ФГБУН Институт биологических проблем  
криолитозоны СО РАН, Россия, 677980, Якутск,  
пр. Ленина, 41

Stroeva Natalya Semenovna  
researcher, RSCI SPIN-code: 8391-7960  
e-mail: [natali.stroeva.62@mail.ru](mailto:natali.stroeva.62@mail.ru)  
FGBUN Institute for biological problems of  
cryolithozone SB RAS, Russia, 677980 Yakutsk, 41  
Lenin av.

Барашкова Наталья Владимировна  
д.с.-х.н., г.н.с., SPIN – код: 5657-2879  
e-mail: [BNW-07@yandex.ru](mailto:BNW-07@yandex.ru)  
ФГБУН Институт биологических проблем  
криолитозоны СО РАН, Россия, 677980, Якутск,  
пр. Ленина, 41

Barashkova Natalia Vladimirovna  
Dr.Sci.Agr, head researcher, SPIN-code: 5657-2879  
e-mail: [BNW-07@yandex.ru](mailto:BNW-07@yandex.ru)  
FGBUN Institute for biological problems of  
cryolithozone SB RAS, Russia, 677980 Yakutsk, 41  
Lenin av.

Наряду с традиционными способами сохранения растений *ex situ* все большее значение приобретает использование биотехнологических методов. Данная работа посвящена разработке и совершенствованию методов культуры изолированных тканей и органов редкого вида камнеломковых (*Saxifragaceae*) - бадана толстолистного *Bergenia crassifolia* (L.) для использования в системе сохранения и воспроизводства растительных ресурсов. В результате проведенных исследований были получены растения - регенеранты из семян бадана толстолистного. Впервые в условиях Якутии проводятся сохранение и размножение бадана толстолистного методом *in vitro*

Along with traditional ways, the biotechnological methods become more significant in contribution to plant conservation *in situ*. The work is dedicated to elaboration and advancement of the method of isolated tissues and organs culture for conservation and reproduction of the badan, *Bergenia crassifolia* L., the rare species of *Saxifragaceae* family. The conducted study yielded the regenerated plants of *B. crassifolia* from seeds. For the first time, we have performed conservation and reproduction of *B. crassifolia in vitro* under conditions of Yakutia

Ключевые слова: БАДАН ТОЛСТОЛИСТНЫЙ, *BERGENIA CRASSIFOLIA*, КУЛЬТУРА IN VITRO, ЭКСПЛАНТ, ФИТОГОРМОНЫ, МЕХАНОАКТИВИРОВАННЫЕ ВЕЩЕСТВА ХВОИ ПИХТЫ  
**Doi: 10.21515/1990-4665-121-050**

Keywords: BADAN, *BERGENIA CRASSIFOLIA*, IN VITRO CULTURE, EXPLANT, PHYTOHORMONES, MECHANICALLY ACTIVATED SUBSTANCES OF *ABIES* NEEDLES

## Введение

*Bergenia crassifolia* (L.) Tritsch. бадан толстолистный - многолетнее растение семейства камнеломковых – *Saxifragaceae*.

Бадан толстолистный распространен на юге Сибири, Монголии и в Северном Китае в лесном и альпийском поясах на высоте до 2000 м над уровнем моря. В Якутии проходит северо-восточная граница ареала. Встречается в бассейне р. Алдана на горных затененных склонах, на каменистых осыпях и в трещинах скал. Редкий вид, внесен в «Красную книгу Республики Саха (Якутия)» (2000) [1] имеет статус IV категории редкости. Размножается семенами и корневищами. Корневище мясистое, с многочисленными корневыми мочками, сильно разветвленное, ползучее. Семена до 2 мм длиной, многочисленные, гладкие, продолговатые, гранистые, черные. Семена созревают в июле-начале августа.

В Европе бадан очень неприхотлив в культуре, и его часто выращивают как декоративное растение в садах, парках и, как лекарственное, на плантациях. Как лекарственное сырье используют корневища, которые заготавливают осенью или ранней весной. При сборе необходимо оставлять 10-15% растений и часть корневищ для восстановления популяции [2]. В условиях культуры слабоустойчив, не самовозобновляется и поражается вредителями, размножение семенами несколько затруднено, сеянцы развиваются медленно [3]. Впервые в условиях Якутии изучаются особенности морфогенеза *in vitro* бадана толстолистного для массового размножения и ускорения интродукции.

Целью данной работы является клональное микроразмножение бадана толстолистного методом *in vitro* для получения и использования в интродукции и реинтродукции в условиях криолитозоны.

### **Материал и методы**

В качестве первоначальных эксплантов служили семена бадана толстолистного *Bergenia crassifolia* (L.), произрастающего в коллекционном питомнике Ботанического сада ИБПК СО РАН. Исходные образцы растений бадана толстолистного были собраны в 1963 г. на побережье оз. Байкал (Иркутская обл.) [4].

При разработке метода клонального микроразмножения растений за основу были взяты этапы размножения, предложенные Н.В. Катаевой и В.А. Аветисовым [5]. Работа в асептических условиях, приготовление и стерилизация питательных сред была проведена согласно рекомендациям Р.Г. Бутенко, Ф.Л. Калинин и др. [6,7].

В качестве первичного экспланта использовали семена бадана толстолистного *Bergenia crassifolia* (L.). Семена стерилизовали мыльным раствором в течение 30 минут, затем промывали проточной и дистиллированной водой. Следующий этап исследований проводили в ламинар-боксе в стерильных условиях. В качестве дезинфицирующих средств использовали 0,1 % раствор сулемы, 70%-ный раствор этанола. В ходе эксперимента установлен оптимальный режим стерилизации семян бадана толстолистного с учетом плотности семенной кожуры. Влияние различных режимов стерилизации на получение жизнеспособных, менее инфицированных семян удалось достичь при использовании комбинации дезинфицирующих растворов – последовательном выдерживании семян в 0,1% раствор сулемы (в течение 15 мин), 70%-ный раствор этанола (в течение 5 мин). Для проращивания семян бадана толстолистного в условиях *in vitro* использовали безгормональную питательную среду Гамборга В5 с половинным составом 1/2В5. Семена растений помещали в коническую колбу объемом 150 мл (рис.1).

Растения культивировали при 16 часовом фотопериоде с люминесцентным освещением 1-3тыс.лк., при комнатной температуре до 26<sup>0</sup>С и при относительной влажности воздуха 70%. Всходы растений бадана толстолистного *Bergenia crassifolia* (L.) появились через 2 недели. Проростки без признаков угнетения роста, полученные из семян растений бадана, являются благоприятным материалом для введения в культуру.



**Рис. 1. Асептические семена бадана на среде 1/2B5**

Для дальнейшего микроразмножения бадана в качестве эксплантов использовали непосредственно конус нарастания (апекс), который вновь дезинфицировали 0,1% раствором сулемы в течение 3 минут и промывали автоклавированной дистиллированной водой.

Для стимулирования регенерационных процессов использовали фитогормоны: 6 - бензиламинопурина (БАП) в концентрации 0,5 - 1 мг/л; нафтилуксусной кислоты (НУК) в концентрации 0,5 - 1 мг/л с использованием питательной среды Гамборга B5. Также применили высокоэффективный нетоксичный регулятор роста антистрессового действия нового типа (нанобиокомпозит), полученный в Институте химии твердого тела и механохимии СО РАН методом механохимической обработки растительного сырья [8, 9]. Препарат представляет порошковую композицию, действующим началом которой являются тритерпеновые кислоты [10, 11].

Навеску механоактивированного вещества хвои пихты (МПН) в концентрации 100 мг/л добавляли в горячие агаризованные питательные

среды и после тщательного перемешивания среды разливали в колбы с последующим автоклавированием в обычном режиме.

### Результаты работы

Морфогенез высшего растения - это определенная материальная структура, созданная под влиянием условий внешней среды с наследственно закрепленными признаками посредством сложных физиологических взаимодействий между органами, тканями, клетками, разделенными в пространстве и времени [12].

При изучении особенности морфогенеза бадана толстолистного *Bergenia crassifolia* (L.) in vitro как редких и исчезающих видов растений флоры Якутии установлено, что практически на всех разработанных питательных средах добавлением фитогормонов наблюдалась регенерация растений бадана (табл.).

Таблица

**Характеристика роста и развития регенерантов бадана толстолистного в зависимости от типа питательной среды (период инкубации 30 дней)**

Показатель морфогенеза	Питательные среды			
	1/2B5	1/2B5+БАП0,5 мг/л+НУК0,5 1мг/л	1/2B5+БАП1 мг/л+НУК1мг/л	1/2B5 + МПН 100 мг/л
Количество эксплантов, шт.	20	20	20	20
Частота развития, %	90	85	85	100
Среднее число листьев на эксплант, шт.	7	5	4	8
Высота экспланта, см	2,52	1,62	0,97	2,74
Частота ризогенеза, %	100	92	87	100
Среднее число корней на эксплант, шт.	3	4	2	4
Длина корней, см	0,87	1,03	0,53	1,92

Исследования показали, что действие стимуляторов роста на корнеобразование и рост листа растений бадана зависит не только от способности их к укоренению, но и от целого ряда других условий (интенсивность света, продолжительность дня, температура и т.д.). Следует отметить, что при увеличении концентрации фитогормонов как НУК, так и БАП до 1 мг/л снижается развитие корневой системы и рост листа растений бадана.

Наиболее эффективной средой по всем параметрам (увеличение частоты и ускорение образования корней и листьев) при культивировании бадана является питательная среда Гамборга 1/2B5 с добавлением МПН в концентрации 100 мг/л. Под действием МПН частота ризогенеза бадана толстолистного повысилась до 100% и способствовала дальнейшему росту и развитию растений (рис. 2). При этом число листьев на экспланте бадана достигало до 8 штук и число корней до 4 штук со средней длиной 1,98 см и с высотой экспланта до 2,74 см.



**Рис. 2. Укоренившиеся растения бадана толстолистного перед высадкой в почву (среда Гамборга B5 +МПН100 мг/л)**

Наиболее ответственным моментом при клональном микроразмножении любой культуры является перенос растений в

нестерильные условия, т.е. высадка их в почвенный субстрат. Разработанная питательная среда Гамборга В5+МПН100 мг/л позволяет стимулировать активность роста и развития корневой системы и листьев бадана толстолистного *Bergenia crassifolia* (L.). Подросшие растения-регенеранты бадана с хорошо развитой корневой системой пересаживали в почвенный субстрат (рис.3). В качестве субстрата использовали смесь: торф, песок и дерновая земля в соотношении (1:1:2). Растения высаживали в стаканчики с емкостью 0,2 л. Именно на данном этапе отмечается наибольший процент гибели пробирочных растений. Адаптацию растений-регенерантов бадана проводили при комнатной температуре  $t=25^{\circ}\text{C}$ , освещенности 3 тыс. лк. и влажности воздуха 70%. Для регуляции влажности воздуха использовали пищевую пленку с постепенным ее перфорированием. Выход адаптированных растений составил 50-70%.



Рис. 3. Адаптация растения-регенеранта в почвенной среде.

### Выводы

В процессе проведения исследований установили, что в качестве первоначальных эксплантов необходимо использовать стерильные семена бадана толстолистного *Bergenia crassifolia* (L.). Для дальнейшего микроразмножения *in vitro* используются асептические проростки.

Наиболее интенсивный рост растений бадана происходит в весенне-летний период в питательной среде Гамборга 1/2B5 с добавлением МПН в концентрациях 100 мг/л и сахарозы 40 мг/л. Полученные данные свидетельствуют о перспективности применения метода микрклонального размножения редких и исчезающих видов растений, в том числе бадана толстолистного *Bergenia crassifolia* (L.).

Работа выполнена в рамках НИР VI.52.1.11. «Разнообразие растительного мира таежной зоны Якутии: структура, динамика, сохранение» № госрегистрации 01201282190.

### Список литературы

1. Красная книга Республики Саха (Якутия). Т. 1. Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды растений и грибов / Мин-во охраны природы РС (Я), Департамент биологических ресурсов. Якутск: НИПК «Сахаполиграфиздат», 2000. 256 с.
2. Атлас лекарственных растений. М.: Изд-во мед. Лит.. 1962. 702 с.
3. Атлас ареалов и ресурсов лекарственных растений СССР/ Отв. Ред. Зайко Л.Н., Шрегер А.И. М.: ГУГК, 1980. 340 с.
4. Кадастр интродуцентов Якутии. Растения природной флоры Якутии / Н.С. Данилова, С.З. Борисова, А.Ю. Романова и др. М.: МАИК «Наука/Интерпериодика». 2001. 167 с.
5. Катаева Н.В., Аветисов В.А. «Клональное размножение в культуре ткани». Культура клеток растений. М.: Наука, 1981. С. 137-149.
6. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М: Наука, 1964. 272 с.
7. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев:Наукова думка. 1980. 320 с
8. Oleg Lomovsky, Kirill Korolyov, Young Soon Kwon // Proceedings of the 7-th Russian-Korean International Symposium on Science and Technology "KORUS-2003", Ulsan, Republic of Korea, 2003. Vol. 1.
9. Королев К.Г., Ломовский О.И., Рожанская О.А., Васильев В.Г. // Химия природных соединений [K.G. Korolev, O.I. Lomovskii, O.A. Rozhanskaya, V.G. Vasil'ev //Chem. Natural compounds], 2003. 39:4.
10. Шевцов С.А. Тритерпеноиды из видов *Abies*. V: Строение и спектральные свойства основных 9β-ланостановых кислот хвои пихты сибирской / С.А. Шевцов, В.А. Ралдугин // Химия природ. соед. 1988. № 3. С. 364–371.
11. Патент № 2244426. МПК А01N65/00, А61K35/78, С07C51/41. Препарат, содержащий водрастворимые соли тритерпеновых кислот и способ его получения. Ломовский О.И., Королев К.Г.; заявитель и патентообладатель Институт химии

твёрдого тела и механохимии СО РАН (ИХТТМ СО РАН) (RU). № 2003125160/15. Заявлено 11.08.2003. Оpubл.: 20.01.2005, БИ № 2.

12. Рожанская О.А. Соя и нут в Сибири: культура тканей, соматклоны, мутанты. Новосибирск: юпитер, 2005. 155с

### Reference list

1. Krasnaja kniga Respubliki Saha (Jakutija). T. 1. Redkie i nahodjashhiesja pod ugrozoy ischeznovenija vidy rastenij i gribov / Min-vo ohrany prirody RS (Ja), Departament biologicheskikh resursov. Jakutsk: NIPK «Sahapoligrafizdat», 2000. 256 s.

2. Atlas lekarstvennyh rastenij. M.: Izd-vo med. Lit.. 1962. 702 s.

3. Atlas arealov i resursov lekarstvennyh rastenij SSSR/ Otv. Red. Zajko L.N., Shreger A.I. M.: GUGK, 1980. 340 s.

4. Kadastr introducentov Jakutii. Rastenija prirodnoj flory Jakutii / N.S. Danilova, S.Z. Borisova, A.Ju. Romanova i dr. M.: MAIK «Nauka/Interperiodika». 2001. 167 s.

5. Kataeva N.V., Avetisov V.A. «Klonal'noe razmnozhenie v kul'ture tkani». Kul'tura kletok rastenij. M.: Nauka, 1981. S. 137-149.

6. Butenko R.G. Kul'tura izolirovannyh tkanej i fiziologija morfogeneza rastenij. – M: Nauka, 1964. 272 s.

7. Kalinin F.L., Sarnackaja V.V., Polishhuk V.E. Metody kul'tury tkanej v fiziologii i biohimii rastenij. Kiev:Naukova dumka. 1980. 320 s

8. Oleg Lomovsky, Kirill Korolyov, Young Soon Kwon // Proceedings of the 7-th Russian-Korean International Symposium on Science and Technology "KORUS-2003", Ulsan, Republic of Korea, 2003. Vol. 1.

9. Korolev K.G., Lomovskij O.I., Rozhanskaja O.A., Vasil'ev V.G. // Himija prirodnyh soedinenij [K.G. Korolev, O.I. Lomovskii, O.A. Rozhanskaya, V.G. Vasil'ev //Chem. Natural compounds], 2003. 39:4.

10. Shevcov S.A. Triterpenoidy iz vidov Abies. V: Stroenie i spektral'nye svojstva osnovnyh 9 $\beta$ -lanostanovyh kislot hvoi pihty sibirskoj / S.A. Shevcov, V.A. Raldugin // Himija prirod. soed. 1988. № 3. S. 364–371.

11. Patent № 2244426. МПК А01N65/00, А61K35/78, С07С51/41. Preparat, sodержashhij vdrastvorimye soli triterpenoyh kislot i sposob ego poluchenija. Lomovskij O.I., Korolev K.G.; zajavitel' i patentoobladatel' Institut himii tverdого tela i mehanohimii SO RAN (ИХТТМ SO RAN) (RU). № 2003125160/15. Zajavleno 11.08.2003. Opubl.: 20.01.2005, БИ № 2.

12. Rozhanskaja O.A. Soja i nut v Sibiri: kul'tura tkanej, somaklony, mutanty. Novosibirsk: jupiter, 2005. 155s