

ОСОБЕННОСТИ РАЗМНОЖЕНИЯ ЛАПЧАТКИ БЕЛОЙ (*POTENTILLA ALBA* L.) И ЛАПЧАТКИ КРУПНОЦВЕТКОВОЙ (*POTENTILLA MEGALANTHA* L.) В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Н.А. Поляков

к.б.н.,

Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва);
Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева (Москва)

E-mail: polakov@yandex.ru

Е.А. Калашникова

д.б.н., профессор,

кафедра биотехнологии, Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева (Москва)

E-mail: kalash0407@mail.ru

Р.Н. Киракосян

к.б.н.,

кафедра биотехнологии, Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева (Москва)

E-mail: mia41291@mail.ru

Ф.М. Хазиева

к.б.н.,

Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва)

Лапчатка белая (*Potentilla alba* L.) и лапчатка крупноцветковая (*Potentilla megalantha* L.) являются ценными лекарственными растениями, в клетках которых синтезируются разные классы фенольных соединений, в частности дубильные вещества, обладающие высокой биологической активностью. Поиск альтернативных путей размножения лапчатки в условиях *in vitro* и сохранения их биоразнообразия является актуальной задачей. Цель работы – изучение особенностей размножения лапчатки белой (*P. alba* L.) и лапчатки крупноцветковой (*P. megalantha* L.) в условиях *in vitro*. Для достижения поставленной цели применялись различные способы предобработки семян: механическая обработка, термическая обработка, замачивание, стратификация. Установлено, что при введении в культуру *in vitro* *P. alba* L. и *P. megalantha* L. необходимо применять стратификацию семян и проводить их прорастание на безгормональной среде. Добавление в состав питательной среды БАП в концентрации 1 мг/л приводит к наибольшему увеличению биомассы *P. megalantha* L. и *P. alba* L. в результате образования максимального количества адвентивных микропобегов.

Ключевые слова: лапчатка белая, лапчатка крупноцветковая, *in vitro*, семена, клональное микроразмножение.

Для цитирования: Поляков Н.А., Калашникова Е.А., Киракосян Р.Н., Хазиева Ф.М. Особенности размножения лапчатки белой (*Potentilla alba* L.) и лапчатки крупноцветковой (*Potentilla megalantha* L.) в условиях *in vitro*. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2020;23(3):50–56. <https://doi.org/10.29296/25877313-2020-03-09>

Поиск альтернативных путей производства целевых лекарственных соединений из растений, которые составляют основу лекарственных препаратов, остается актуальным и сегодня. Однако в последнее время наметилась тенденция резкого сокращения популяций ряда видов лекарственных растений за счет их неконтролируемого сбора. Поэтому восстановление редких и исчезающих видов растений в естественном ареале произрастания остается актуальной темой научных исследований.

Среди известных методов сохранения и получения растительного лекарственного сырья для массового производства необходимых для челове-

ка фитопрепаратов, широкое распространение получил метод клонирования растений *in vitro*, а именно клональное микроразмножение.

Перспективными растениями для изучения в культуре *in vitro* являются растения рода лапчатка (*Potentilla*), которые принадлежат к многочисленному семейству Розоцветных (Rosaceae). Род *Potentilla* включает в себя порядка 500 видов растений и является крупнейшим по числу видов в семействе розоцветных [1].

Многие исследования показали, что экстракты, полученные из надземных и подземных частей растений рода *Potentilla*, обладают высокой био-

логической активностью. Препараты из лапчатки белой используются при лечении различных нарушений функции щитовидной железы (гипертиреоз, гипотиреоз), а также при заболеваниях печени, сердечно-сосудистой системы и желудочно-кишечного тракта [2]. Представители рода лапчатка входят в состав разных препаратов и БАД. Известен фитопрепарат «Альба» (экстракт корня лапчатки белой) для лечения патологий щитовидной железы при ее нормальной и повышенной функции [3]. Кроме того, на основе лапчатки белой созданы комплексные препараты, включающие и другие лекарственные растения.

Известно, что фармакологические свойства растений определяются содержанием в них биологически активных соединений, прежде всего дубильных веществ [4].

Растения лапчатки в природной среде плохо размножаются семенами. Об этом свидетельствуют работы известного ученого Г.К. Смык, который отмечал, что формирование растений лапчатки от появления всходов до взрослой фазы развития требует длительного времени, в связи с медленным их ростом. Кроме того, всхожесть семян, как правило, не превышает 10%, а формирование проростков сильно растянуто по времени [5]. В связи с тем, что растения лапчатки являются источником ценных вторичных метаболитов, представляет интерес исследование, целью которого является повышение их продуктивности [6, 7]. Для этого применяют методы биотехнологии, в частности клональное микроразмножение, с последующим культивированием микроклонов на гидропонной установке [8]. Однако предлагаемые технологии имеют свои определенные недостатки, которые, в первую очередь, связаны с ограниченным количеством растений-доноров в природе и медленным приростом растительной биомассы. Поэтому поиск альтернативных путей размножения лапчатки в условиях *in vitro* и сохранения их биоразнообразия является актуальной задачей.

Известно, что при разработке технологии клонального микроразмножения предпочтительным исходным материалом являются семена, использование которых обеспечивает максимальный охват генотипической изменчивости в популяциях. Работы по культивированию семян *in vitro* проводились только с лапчаткой белой, а для лапчатки крупноцветковой такие исследования не известны.

Ц е л ь р а б о т ы – изучить особенности размножения лапчатки белой (*Potentilla alba* L.)

и лапчатки крупноцветковой (*Potentilla megalantha* L.) в условиях *in vitro*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В качестве исходного материала использовали семена лапчатки белой (*P. alba* L.) и лапчатки крупноцветковой (*P. megalantha* L.).

Для повышения прорастания семян применялись различные способы их предобработки:

скарификация – механическая обработка, которая позволяет нарушить оболочку семени, и термическая обработка – выдерживание семян в горячей воде при температуре 80 °С в течение 10 мин;

замачивание семян в холодной воде в течение 60 мин;

стратификация – выдерживание семян при температуре 4 °С в течение 30 суток;

замачивание семян в растворе 6-бензиламинопурина (БАП) в концентрации 10 мг/л в течение 60 мин.

После предобработки семена подвергали стерилизации 0,1%-ным раствором сулемы в течение 8 мин, затем семена промывали стерильной дистиллированной водой и помещали на безгормональную питательную среду Мурасига и Скуга (МС), содержащую 3% сахарозы и 0,7% агара.

Для индукции каллусогенеза и морфогенеза использовали различные экспланты (сегменты гипокотилия, стебля, корня, листьев), изолированные со стерильных проростков. Экспланты культивировали на питательной среде, содержащей минеральные соли по прописи МС, а также цитокинины и ауксины. В качестве цитокининов использовали БАП (0,5–2 мг/л), препарат Дропп (0,1 мг/л), кинетин (0,5 мг/л), препарат Цитодеф (0,1 мг/л), а в качестве ауксинов – индоллил-3-уксусную кислоту (ИУК) (0,5 мг/л).

Изолированные экспланты культивировали в стеклянных сосудах в условиях световой комнаты при 16-часовом фотопериоде, температуре 25 °С, освещение белыми люминесцентными лампами с интенсивностью 3000 лк и относительной влажностью воздуха 70%.

Работу проводили на кафедре биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева по ранее разработанным методикам [9, 10].

Исследования проводили в 3 аналитических и 20 биологических повторностях. Статистическую обработку результатов эксперимента выполняли с использованием параметрических критериев Стюдента и Дункана с помощью программы AGROS

(версия 2.11), а также стандартных пакетов программы Windows Excel 2010.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что для семян лапчатки характерно формирование твердой оболочки, которая обеспечивает водонепроницаемость и препятствует появлению всходов. Поэтому проращивание таких семян представляет определенные трудности и приводит к появлению только единичных растений.

Одним из самых эффективных способов преодоления физиологического покоя семян является их стратификация. При этом синтез гормонов ингибиторов уменьшается, но усиливается синтез стимуляторов, которые и оказывают положительное влияние на прорастание семян. Однако применение данного физиологически обусловленного приема не всегда приводит к желаемому результату. Поэтому необходимо проводить исследования по поиску альтернативных способов, повышающих посевные качества семян исследуемых видов лапчатки.

Из литературных данных известно, что альтернативным и экономически эффективным способом повышения посевных качеств семян является их скарификация, в частности применение механической, термической и химической обработ-

ки. Например, на семенах астрагала показано, что применение 50%-ной серной кислоты приводит к растяжению палисадных клеток и развитию рыхлой системы межклетников. Межклеточные пространства в спермодерме освобождаются от кутина и суберина, значительно увеличиваясь и образуя хорошо выраженные промежутки, что способствует свободному поступлению воды и кислорода к зародышу. Однако авторы указывают, что при использовании данного метода скорость прорастания семян была невысокой и составляла до 30 суток. Применение другого способа скарификации – механического приводило к ускорению процесса прорастания семян, примерно в 3 раза, но при этом выход проростков не превышал 15% [11, 12].

Другим важным регуляторным фактором, оказывающим влияние на посевные качества семян, являются гормоны, в частности, цитокинины, которые инактивируют ингибирующее действие абсцизовой кислоты и выводят семена из фазы покоя.

Были использованы все выше перечисленные способы для индукции прорастания семян лапчатки белой, так как ранее проведенные нами исследования показали, что именно для данного вида отмечена очень низкая всхожесть семян. Основные результаты приведены на рис. 1.

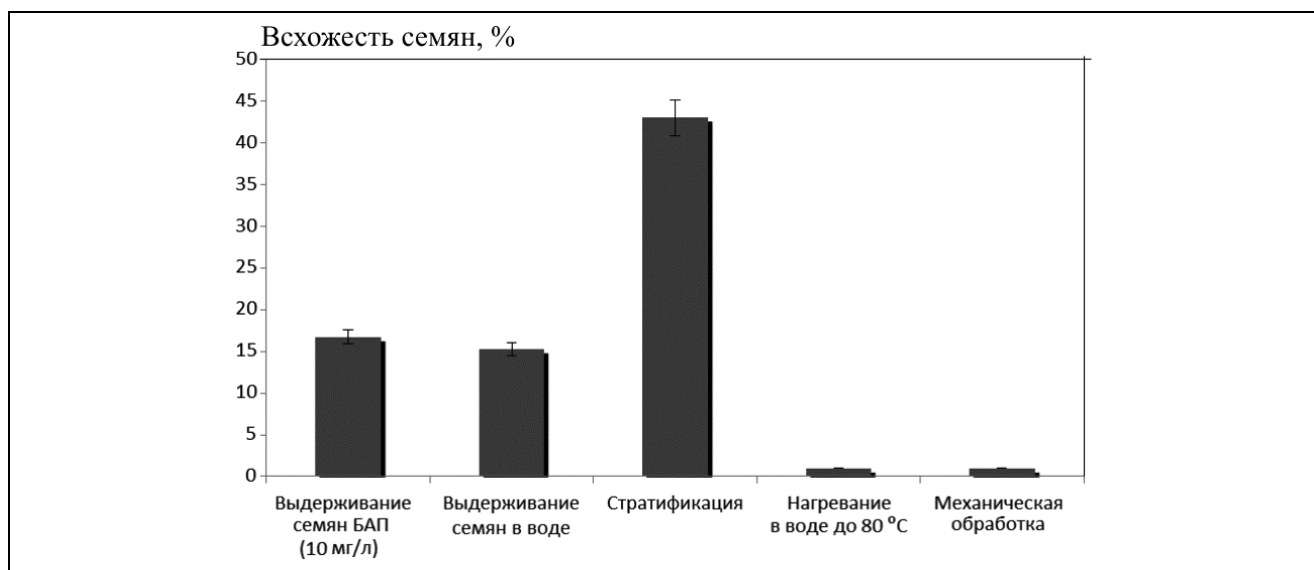


Рис. 1. Влияние предобработки на всхожесть семян лапчатки белой (*Potentilla alba* L.)

В результате проведенных исследований установлено, что применяемые варианты предпосевной обработки оказали разное влияние на всхожесть семян. Так, применение механической и тер-

мической скарификации было неэффективно. В этих вариантах учитываемый показатель не превышал 1%. В вариантах с применением замачивания семян в воде и растворе БАП 10 мг/л существенных

различий обнаружено не было, всхожесть семян составила 15,3 и 16,7% соответственно.

Повышение всхожести семян в этих вариантах можно объяснить тем, что в процессе замачивания происходят процессы набухания за счет поступления влаги, которые влияют на активацию жизнедеятельности клеток. При этом ферментативные системы клеток переходят в активное состояние, усиливаются гидролитические процессы, а также увеличивается дыхательный коэффициент. Прорастание семян при этом может быть увеличено за счет применения стимуляторов роста, таких как БАП. Однако в проведенных исследованиях действие исследуемого цитокинина было несущественным, всхожесть в этом варианте повысилась всего на 1,4%.

Иная картина отмечена при использовании стратификации в течение 30 суток. В этом варианте показатель всхожести семян был максимальным

и составил 43%. Это еще раз подтверждает необходимость применения стратификации для семян, в частности, лапчатки белой. Необходимо отметить, что в более ранних исследованиях авторов режим стратификации семян лапчатки белой составлял 75 суток [13].

В связи с тем, что на начальном этапе необходимо установить зависимость всхожести семян не только от способов предобработки семян, но и от условий их культивирования *in vitro*, были проведены исследования по влиянию гормонального состава питательной среды на изучаемые процессы. Семена лапчатки белой после стратификации и лапчатки крупноцветковой культивировали на питательной среде, содержащей минеральные соли по прописи МС с добавлением БАП и ИУК в концентрациях 1 и 0,5 мг/л соответственно, а также на безгормональной среде (контроль). Полученные результаты приведены на рис. 2.

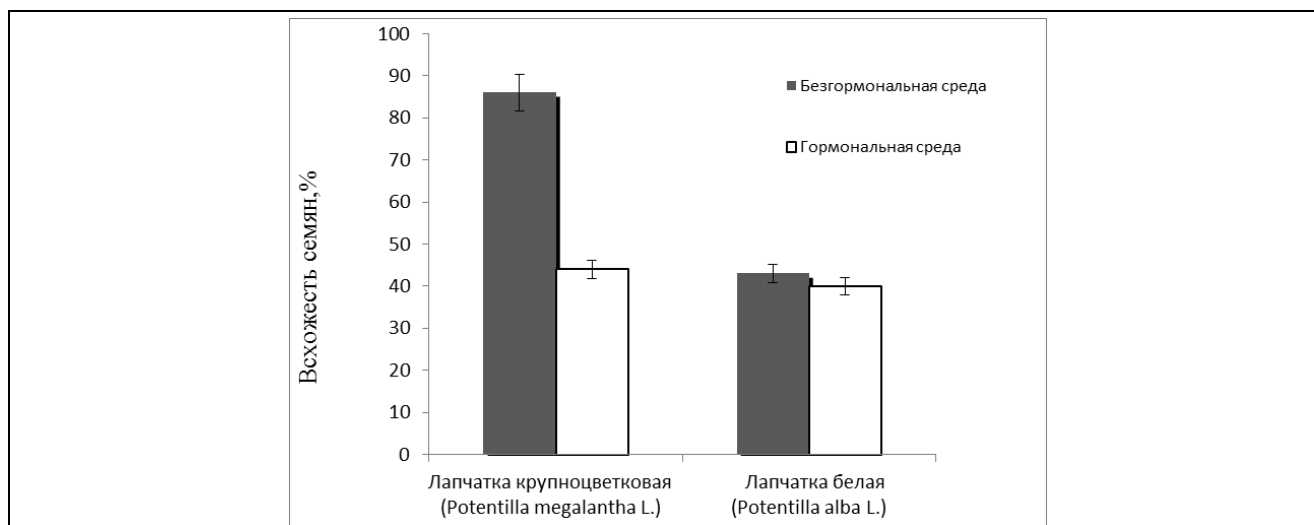


Рис. 2. Всхожесть семян исследуемых видов лапчатки

В результате проведенных исследований установлено, что на всхожесть семян исследуемых видов лапчатки существенное влияние оказывают условия культивирования. Так, согласно полученным результатам, всхожесть семян *P. megalantha* L. превышает учитываемый показатель для *P. alba* L. в два раза. Причем существенные различия проявлялись только на безгормональной среде. При культивировании семян на гормональной среде не были установлены существенные различия по генотипам. Всхожесть семян в этом варианте для изучаемых видов лапчатки составила в диапазоне 40–43%.

Кроме того, визуальные исследования показали, что период появления первых всходов ис-

следуемых видов лапчатки растянут во времени. Так, первое прорастание семян *P. alba* L. отмечалось на 15-е сутки с момента культивирования *in vitro*, а у *P. megalantha* L. – на 7-е сутки.

Важным этапом клонального микроразмножения растений является подбор питательных сред, обеспечивающих получение максимального коэффициента размножения. Регуляторным фактором, оказывающим непосредственное влияние на изучаемый показатель, являются цитокинины. Поэтому проведение скрининга этих регуляторов роста является необходимым условием при разработке технологии клонирования растений *in vitro*.

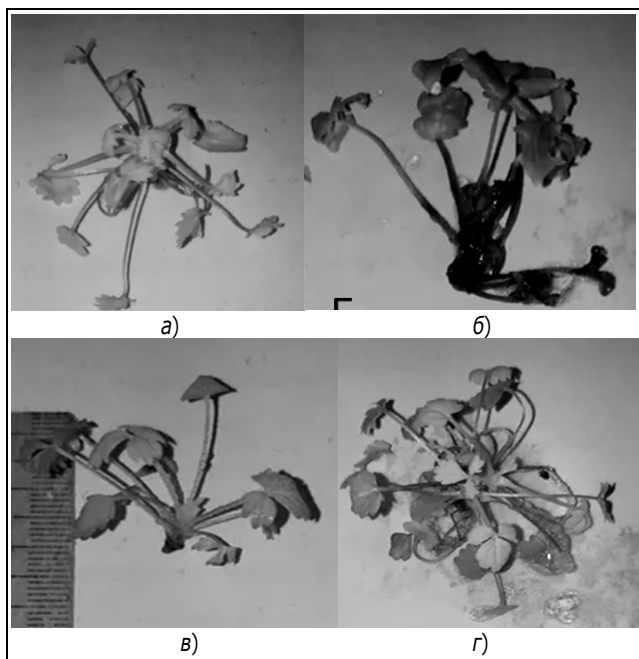


Рис. 3. Влияние цитокининов на формирование растений *P. megalantha* L. *in vitro*: а – препарат Дропп (0,1 мг/л); б – БАП (1 мг/л); в – кинетин (0,5 мг/л); г – препарат Цитодеф (0,1 мг/л)

В результате проведенных исследований установлено, что изучаемые цитокинины на ранних пассажах клонального микро размножения не оказывали существенного влияния на коэффициент размножения. Во всех вариантах формировались розетки правильной морфологии, число которых не превышало 2–3 шт. (рис. 3). Однако визуальные наблюдения позволили установить, что в варианте с применением БАП формировалась более мощная розетка с ярко зеленой окраской ли-

стьев. Полученные результаты были характерны, как для *P. megalantha* L., так и для *P. alba* L.

Исходя из того, что БАП проявил более выраженное действие на формирование растений правильной морфологии, но коэффициент размножения при этом был невысоким, следующим этапом исследования стало определение оптимальной концентрации БАП для получения максимального количества микропобегов. В работе изучали концентрации цитокинина от 0,5 до 2 мг/л. В качестве контроля была выбрана безгормональная среда. Основные результаты приведены на рис. 4 и 5.

Результаты исследования показали, что присутствие в составе питательной среды БАП в изучаемых концентрациях оказывает стимулирующее действие на формирование адвентивных побегов. Во всех вариантах среднее число сформировавшихся микропобегов в 1,5–3 раза выше по сравнению с контролем. Однако следует отметить, что интенсивность побегообразования зависела от видовых особенностей растений. Так, для лапчатки крупноцветковой (*P. megalantha* L.) отмечена обратная корреляция: с увеличением концентрации БАП в питательной среде уменьшается интенсивность побегообразования. В вариантах с содержанием БАП 0,5–1 мг/л среднее количество адвентивных микропобегов составило 16 шт., в то время как в вариантах с БАП 1,5–2 мг/л учитываемый показатель уменьшился в 2 раза и составил в среднем 8 шт. Для лапчатки белой (*P. alba* L.) выделены две лучшие концентрации БАП – 1 и 2 мг/л, при которых наблюдали максимальное образование адвентивных микропобегов – 9 и 6 соответственно.

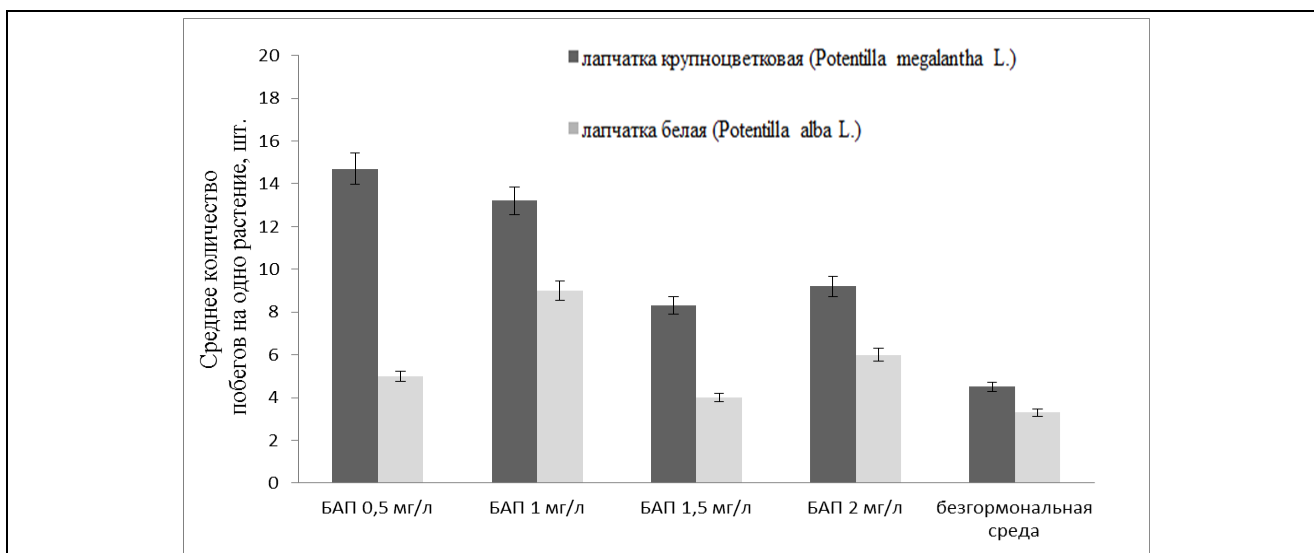


Рис. 4. Влияние различных концентраций БАП на побегообразование лапчатки

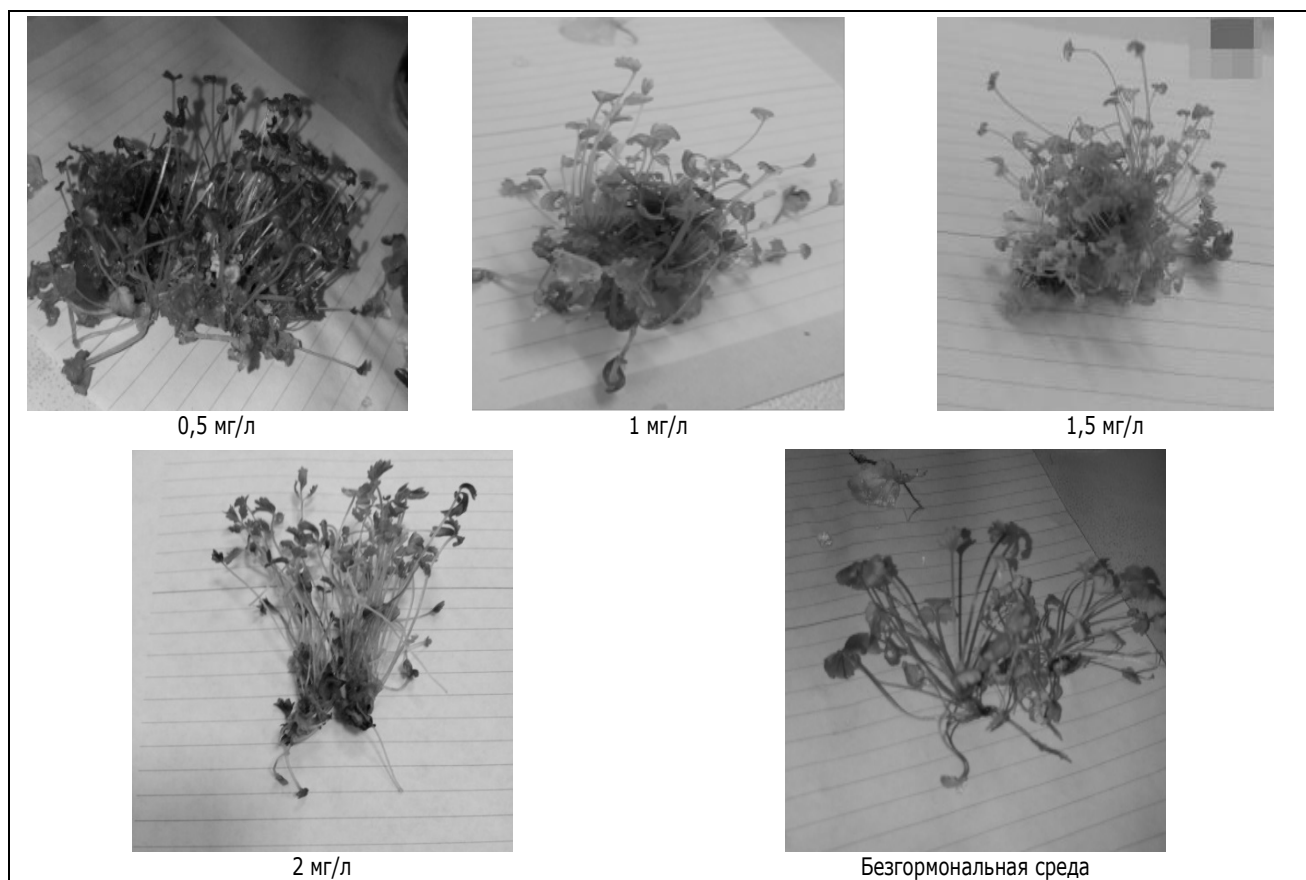


Рис. 5. Внешний вид микрорастений *P. megalantha* L. на питательных средах, содержащих различные концентрации БАП

ВЫВОДЫ

Применение стратификации семян *Potentilla megalantha* L. и *Potentilla alba* L. и последующее их культивирование на безгормональной питательной среде, содержащей минеральные соли по прописи МС, приводит к увеличению всхожести семян. Добавление в состав питательной среды БАП в концентрации 1 мг/л на этапе микроразмножения способствует наибольшему побегообразованию лапчатки белой и лапчатки крупноцветковой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шишкин Б.К., Юзенчук С.В. Род *Potentilla* L. Лапчатка. Флора СССР. М.–Л.: Изд-во АН СССР. 1941; 10:78–223.
2. Архипова Э.В. Влияние экстракта *Potentilla alba* L. и комплексного средства «Тиреотон» на течение экспериментального гипотиреоза: Автореф. дисс. ... канд. Улан-Удэ. 2012. 21 с.
3. Киселева И.А., Теплая Е.В., Каминский А.В. Применение растительного препарата «Альба®» в лечении больных с патологией щитовидной железы. Врачебное дело. 2012; 8:116–119.
4. Осипов В.И., Поляков Н.А., Сидельников А.Н. Проантоцианидины корней и корневищ *Potentilla alba* (Rosaceae). Растительные ресурсы. 2017; 1:114–125.
5. Смык Г.К. Лапчатка белая. Химия и жизнь. 1982; 3:30–35.
6. Баишилов А.В. Использование *Potentilla alba* L. в качестве лекарственного растительного сырья в условиях республики Беларусь. Экологический вестник. 2010; 3:85–89.
7. Хобракова В.Б. Иммунокорректирующее действие сухого экстракта лапчатки белой и комплексного средства «Тиреотон». Сибирский медицинский журнал. 2011; 7:121–123.
8. Тихомирова Л.И., Базарнова Н.Г., Ильичёва Т.Н., Сысоева А.В. Способ получения лекарственного растительного сырья лапчатки белой (*Potentilla alba*) в условиях гидропонии. Химия растительного сырья. 2016; 3:59–66.
9. Калашикова Е.А., Чередниченко М.Ю. Основы биотехнологии. РГАУ-МСХА, 2016. 138 с.
10. Калашикова Е.А., Миронова О.Ю., Лаврова Н.В., Кочиева Е.З. и др. Лабораторный практикум по сельскохозяйственной биотехнологии. РГАУ-МСХА, 2004. 115 с.
11. Basalma D., Uranbey S., Gurlek D., Ozcan S. TDZ-induced plant regeneration in *Astragalus cicer*. Afr. J. Biotechnol. 2008; 7(8):955–959.
12. Erisen S., Atalay E., Yorgancilar M. The effect of thidiazuron on the in vitro shoot development of endemic *Astragalus cariensis* in Turkey. Turk. J. Bot. 2011; 35:521–526.
13. Хазиева Ф.М., Сидельников А.Н. Биологические особенности лапчатки белой, интродуцированной в Центральном Черноземном регионе. Вестник российской сельскохозяйственной науки. 2017; 5:38–41.

Поступила после доработки 27 января 2020 г.

PECULIARITIES OF REPRODUCTION OF *POTENTILLA ALBA* L. AND *POTENTILLA MEGALANTHA* L. *IN VITRO*

© Authors, 2020

N. A. Polyakov

Ph.D. (Biol.), All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (Moscow)

E-mail: polakov@yandex.ru

E.A. Kalashnikova

Dr.Sc. (Biol.), Professor, Department of Biotechnology, RSAU-MTAA named after K.A. Timiryazev (Moscow)

E-mail: kalash0407@mail.ru

R.N. Kirakosyan

Ph.D. (Biol.), Department of Biotechnology RSAU-MTAA named after K.A. Timiryazev (Moscow)

E-mail: mia41291@mail.ru

F.M. Khazieva

Ph.D. (Biol.), All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (Moscow)

The results of cultivation of *Potentilla alba* L. and *Potentilla megalantha* L. *in vitro* are presented. These species are valuable medicinal plants whose cells synthesize different classes of phenolic compounds, in particular tannins with high biological activity. Natural resources are not meeting the needs of the pharmaceutical industry. The search for alternative ways of reproduction *in vitro* of *Potentilla* plants and preservation of their biodiversity is an urgent task.

The aim of this work was to study the reproduction characteristics of *Potentilla alba* L. and *Potentilla megalantha* L. *in vitro*. To achieve this goal, various methods of pretreatment of seeds were used: mechanical processing, heat treatment, soaking and stratification.

As a result, of the conducted research, it was found that when introduced into the culture *in vitro* *Potentilla alba* L. and *Potentilla megalantha* L. it is necessary to apply seed stratification and carry out their germination on a hormone-free medium. Adding BAP to the nutrient medium at the concentration of 1 mg / l leads to the greatest increase in the biomass of *P. megalantha* and *P. alba*, as a result of the formation of the maximum number of adventive microbeads.

Key words: *Potentilla alba*, *Potentilla megalantha*, *in vitro*, seed, clonal micropropagation.

For citation: Polyakov N.A., Kalashnikova E.A., Kirakosyan R.N., Khazieva F.M. Peculiarities of reproduction of *Potentilla alba* L. and *Potentilla megalantha* L. *in vitro*. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2020;23(3):50-56. <https://doi.org/10.29296/25877313-2020-03-09>

REFERENCES

1. Shishkin B.K., Yuzepchuk S.V. Rod *Potentilla* L. Lapchatka. Flora SSSR. M.–L.: Izd-vo AN SSSR. 1941; 10:78–223.
2. Arhipova E.V. Vliyaniye ekstrakta *Potentilla alba* L. i kompleksnogo sredstva «Tireoton» na techeniye eksperimental'nogo gipotireoza: Avtoref. diss. ... kand. Ulan-Ude. 2012. 21 s.
3. Kiseleva I.A., Teplaya E.V., Kaminskij A.V. Primeneniye rastitel'nogo preparata «Al'ba®» v lechenii bol'nyh s patologiej shchitovidnoj zhelezy. Vrachebnoe delo. 2012; 8:116–119.
4. Osipov V.I., Polyakov N.A., Sidelnikov A.N. Proantocyanidiny kornej i kornevishch *Potentilla alba* (Rosaceae). Rastitel'nye resursy. 2017; 1:114–125.
5. Smyk G.K. Lapchatka belaya. Himiya i zhizn'. 1982; 3:30–35.
6. Bashilov A.V. Ispol'zovaniye *Potentilla alba* L. v kachestve lekarstvennogo rastitel'nogo syr'ya v usloviyah respublik Belarus'. Ekologicheskij vestnik. 2010; 3:85–89.
7. Hobraikova V.B. Immunokorrigiruyushchee dejstviye suhogo ekstrakta lapchatki belo j i kompleksnogo sredstva «Tireoton». Sibirskij medicinskij zhurnal. 2011; 7:121–123.
8. Tihomirova L.I., Bazarnova N.G., Il'ichyova T.N., Sysoeva A.V. Sposob polucheniya lekarstvennogo rastitel'nogo syr'ya lapchatki belo j (*Potentilla alba*) v usloviyah gidroponiki. Himiya rastitel'nogo syr'ya. 2016; 3:59–66.
9. Kalashnikova E.A., Cherednichenko M.Yu. Osnovy biotekhnologii. RGAU-MSKHA, 2016. 138 s.
10. Kalashnikova E.A., Mironova O.Yu., Lavrova N.V., Kochieva E.Z. i dr. Laboratornyj praktikum po sel'skohozyajstvennoj biotekhnologii. RGAU-MSKHA, 2004. 115 s.
11. Basalma D., Uranbey S., Gurlek D., Ozcan S. TDZ-induced plant regeneration in *Astragalus cicer*. Afr. J. Biotechnol. 2008; 7(8):955–959.
12. Erisen S., Atalay E., Yorgancilar M. The effect of thidiazuron on the *in vitro* shoot development of endemic *Astragalus cariensis* in Turkey. Turk. J. Bot. 2011; 35:521–526.
13. Haziyeva F.M., Sidelnikov A.N. Biologicheskie osobennosti lapchatki belo j, introducirovannoj v Central'nom Chernozemnom regione. Vestnik rossijskoj sel'skohozyajstvennoj nauki. 2017; 5:38–41.