

МЕТОД КУЛЬТИВИРОВАНИЕ *IN VITRO* ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТЕНИЯ *WITHANIA SOMNIFERA* L. (DUNAL)

А.И. Кутковски-Муштук, Н.Г. Чоркина, М.И. Трофим

Национальный Ботанический сад (Институт) Академии Наук Молдовы, Кишинев, Молдова, alinacutcovschi@mail.ru

Аннотация. Растение *Withania somnifera* L. (Dunal), семейства *Solanaceae* исследуется в качестве растения интродуцента в Молдовы с высокими терапевтическими свойствами. Для размножения растений существует много способов регенерации. Но есть растения, которые для воспроизведения требуют особых условий. Одно из них – *W. somnifera*.

Ключевые слова: *Withania somnifera*, экспланты, стерилизация

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1299-1302

Последние столетия ботанические сады внесли значительный вклад в развитие и экологического воспитания общества. Роль ботанических садов в сохранения фиторазнообразия видов растений нашей планеты трудно переоценить. Для размножения растений существует много способов регенерации. Но есть растения, которые для воспроизведения требуют особых условий.

Один из способов сохранения генофонда редких и эндемических видов в условиях установок искусственного климата может быть создание коллекций живых растений *in vitro*, меристем, культур клеток, культур тканей и в виде семян другого генетического материала.

Выращивание в условиях *in vitro* дает возможность контролировать многие факторы внешней среды: температуру, влажность, продолжительность и интенсивность светового дня, состав питательных веществ. Это и определило широкое использование культуры растительных тканей *in vitro* в качестве модельной системы для теоретических и прикладных исследований в области физиологии и биотехнологии растений.

Растение *Withania somnifera* L. (Dunal) (рис. 1) семейства *Solanaceae* исследуется в качестве растения интродуцента в Молдовы с высокими терапевтическими свойствами ценными в медицине Ayurvedic. Этот вид широко распространен во многих регионах Азии, Африки и Европы, но родом из Индии. *Withania Somnifera* также называют Ashwagandha или зимняя вишня. В Индии это растение популярно и называют его индийский женшень, но самое известное имя – Ashwagandha, что в переводе означает «лошадиный запах». Ashwagandha у себя на родине – многолетнее растение, в наших условия ведет себя как однолетнее растение.

Как правило, каждая искусственная среда *in vitro* представляет собой комбинацию неорганических соединений (минералы) и органические соединения, в том числе углеводы, витамины и рострегулирующие вещества. Каждая питательная среда, используемая для культуры, содержит затвердители, обычно агар. Для подготовки среды, вода должна быть очищенной, фильтрованной, дистиллированной, деионизированной.

Инокуляция культуры *in vitro* составляет два последовательных этапа:

- 1) выбор и приготовление экспланта из стерильного растительного материала;
- 2) размещение экспланта в культуральные пробирки, колбы (сосуд) методом инокуляции на поверхность среды.

Выбор и стерилизация донорских органов эксплантов имеют важную роль, как и источник растительного материала, а также и период сезона, в котором эксплант принят для инокуляции.



Рис. 1. *Withania somnifera*.

При культивировании вида *in vitro* были протестированы различные варианты сред и различные типы эксплантов. Были разработаны схемы стерилизации растительного материала, экспланта и сред.

Для исследования влияния цитокининов на морфогенные процессы у *W. somnifera* были отобраны различные типы эксплантов: апикальные и боковые меристемы, фрагменты побегов, фрагменты листьев (3x4 мм), семена. Все экспланты были взяты из растений, выращенных в открытом грунте. Перед инокуляцией *in vitro* экспланты дезинфицировали.

Для стерилизации растений *Withania somnifera*, во-первых, каждая часть растения была разделена и каждый тип фрагмента помещали в разные стаканы и закрывали чашками Петри. Каждый эксплант промывали 4-5 раза водопроводной водой, после чего добавляли Na_2SO_4 , промывали, пока моющее средство не исчезнет. Для дезинфекции добавляли Tween 20 (2 капли) + KMnO_4 (4 капли), после чего экспланты сначала промывали водопроводной водой, а затем 2–3 раза промывали дистиллированной водой. После исчезновения раствора в дистиллированную воду добавляли в стакан 2-3 капли KMnO_4 , и материал оставляли в этом растворе в течение 10 минут и транспортировали в бокс.

В боксе удаляли дистиллированную воду и добавляли диацид 0,01%. Меристемы оставляли в диациде в течение 7 минут, остальные части растения выдерживали в диациде 10 минут. После удаления диацида экспланты промывали 4 раза автоклавированной дистиллированной водой для тщательного промывания от диацида. Для более эффективной дезинфекции растения промывали H_2O_2 , затем снова промывали автоклавированной дистиллированной водой.

После стерилизации все экспланты инокулировали на разные типы сред с или без гормонов.

Перед инокуляцией был выбран состав среды. В дополнение к микро- и макроэлементам в среде также важны витамины и сахароза. рН, установленный нами для питательной среды *in vitro* *W. somnifera*, составляет 5,6–5,8. После приготовления среды стерилизовали в автоклаве при 115 °С в течение 8 минут – для агаровой среды и при 110 °С в течение 5 минут – для жидких сред.

После инокуляции все растения были помещены в культуральную, где температура поддерживалась на уровне 23 ± 20 °С, 16 часов света/8 часов темноты и 65% относительной влажности воздуха.

Различные питательные среды были испытаны для культивирования *in vitro* *W. somnifera*, протестированы на индукцию и иницирование органогенеза, проявляющегося посредством процессов ризогенеза и каулогенеза. Мы также тестировали среды для укоренения *W. somnifera* в культуре *in vitro*. Процесс разработки этого растения в культуре *in vitro* обусловлен регуляторами роста, которые используются в различных количествах в среде. Основной средой, используемой для развития культуры *in vivo*, является Murashige, Skoog. В зависимости от количества ауксинов и цитокинов продолжается развитие растений. Известно, что в процессе органогенеза содержание ауксинов должно быть ниже, чем цитокинов, тогда как для ризогенеза увеличивается содержание ауксина и уменьшается цитокинин.

Инокуляция растений является сложным процессом, который протекает в стерильных условиях. *Withania somnifera* – это растение с благоприятными свойствами для инокуляции и высоким регенерационным потенциалом. Вначале инокулировали меристемы, затем листья, цветы, семена. В результате I-посадки появился калусогенез, ризогенез и каулогенез. Для следующих посадок (2-5) использовали калусную массу и меристемы от растений, полученных *in vitro*. У растений, которые образовывали корни, воздушную часть инокулировали в условиях *in vitro*, а корни переносили в *ex vitro* для развития растений в открытый грунт. Растение инокулировали на агаризованной и жидкой среде.

Средняя температура хранения растений в культуре *in vitro* составляла 23-25 °С. Когда температура опускается ниже 20 °С, растения перестают расти. Во всех испытанных средах визуализировались ризогенез, каулогенез и калусогенез.

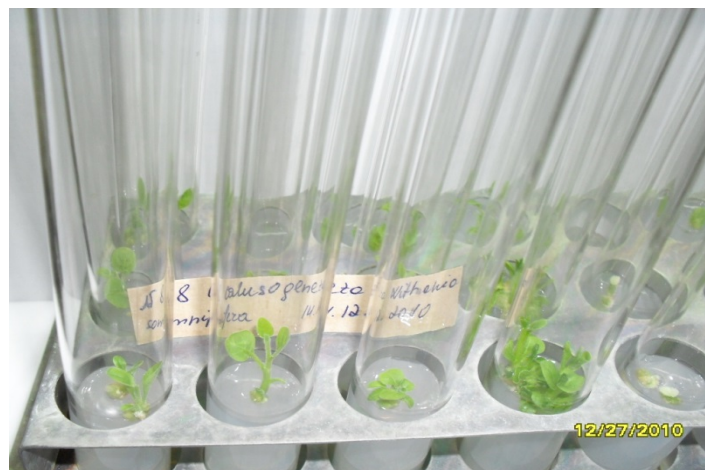


Рис. 2. *Withania somnifera* в *in vitro*.

За основу для развития *Withania somnifera in vitro* была взята агаризованная среда MS-100% с добавлением гормонов. Была обогащена следующими гормонами: БАП; 2,4 D; 2,5 S + зеатин и α -НУК. Для инокулирования были использованы следующие виды эксплантов: апикальная и латеральная меристемы, фрагменты листьев, стеблей. Экспланты инокулированы на этих средах. Полученные результаты показали, что изменения в культуре *in vitro* находятся в зависимости от времени года, от фазы развития, расположения по своей природе экспланта на стебле и от гормонального баланса ауксинов и цитокининов. После 4 недель у эксплантов, которые были инокулированы на среды с добавлением 2,4 D и БАП гормонов, было отмечено

калусообразование, а на средах с добавлением гормона 2,5S+зеатин и α -НУК – каулогенез и ризогенез (рис. 2). Более эффективное развитие новообразований наблюдалось на эксплантах из апикальной и боковой меристем. Затем культуры перемещены в специальные для выращивания камеры или помещения – так называемые инкубационные.

CULTIVATION METHOD *IN VITRO* OF MEDICINAL PLANT *WITHANIA SOMNIFERA* L. (DUNAL)

A. Cutcovschi-Mustuc, N. Ciorchina, M. Trofim

National Botanical Garden (Institute) of the Academy of Sciences of Moldova,
Chisinau, Republic of Moldova, alinacutcovschi@mail.ru

Abstract. The plant *Withania somnifera* L., Solanaceae family is investigated as a plant of an introducent in Moldova with high therapeutic properties. For the reproduction of plants, there are many ways of regeneration. But, there are plants that require special conditions for reproduction. One of them is *W. somnifera*.

Keywords: *Withania somnifera*, explants, sterilization