

при разработке промышленного производства биомассы.

В целом при использовании полупроточного режима выращивания общая продуктивность процесса повышается в среднем на 15-20% за счет отсутствия лаг-фазы и времени, необходимого на подготовку периодического культивирования.

### **Список литературы**

1. Определение олигофуростанозидов в культуре клеток *Dioscorea deltoidea* Wall спектрофотометрическим методом / Васильева И.С., Воробьев А.С., Горская Н.В., Липский А.Х., Гуриелидзе К.Г., Пасешниченко В.А. // Прикладная биохимия и микробиология. – 1987. – № 5. – С. 692.
2. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective / Bourgaud F., Gravot A., Milesi S., Gontier E. // Plant Science. – 2001. – 161. – P. 839-851.
3. Collin H.A. Secondary product formation in plant tissue cultures // Plant Growth Regulation. – 2001. – № 34. – P. 119-134.
4. DiCosmo F., Misawa M. Plant cell and tissue culture: alternative for metabolite production // Biotechnology Advances. – 1995. – № 3. – P. 425-453.
5. Kieran P.M., MacLoughlin P.F., Malone D.M. Plant cell suspension cultures: some engineering considerations // Journal of Biotechnology. – 1997. – 59. – P. 39-52
6. Ramachandra Rao S., Ravishankar G.A. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites // Biotechnology Advances. – 2002. – V. 20. – P. 101-153.
7. Verpoorte R., Contin A., Memelink J. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites // Phytochemistry Reviews. – 2002. – № 1. – P. 13-25.

## **РАЗМНОЖЕНИЕ БОРЕЦА СЕВЕРНОГО В КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЕ *IN VITRO* НА ОСНОВЕ ФЕНОМЕНА ЭМБРИОИДОГЕНИИ**

Н.Н. КРУГЛОВА, *доктор биологических наук*; А.Е. КРУГЛОВА

Учреждение РАН Институт биологии Уфимского НЦ РАН, Уфа, Россия

### **Введение**

Длительный процесс адаптивной эволюции привел к возникновению у цветковых растений разнообразных репродуктивных структур, обеспечивающих семенное (гетерофазная репродукция) и вегетативное (гомофазная репродукция) размножение [1]. Особый интерес вызывают случаи формирования эмбриоида (синонимы: соматический зародыш, зародышеподобная структура, адвентивный зародыш) – зачатка растения, образующегося из соматических (неполовых) клеток. Системный эмбриологический подход позволил установить новую категорию вегетативного (бесполого) размножения цветковых растений – эмбриоидогению; показано, что растения, образующиеся из эмбриоидов, представляют собой клоны – особи, генетически идентичные между собой и исходным растением [2].

В течение ряда лет явление эмбриоидогении в каллусной культуре *in vitro* изучается нами на примере борца северного *Aconitum lycoctonum* L. (синоним: аконит высокий *Aconitum septentrionale* Koelle), многолетнего растения из семейства Лютиковые (рис. 1).

Помимо теоретического значения, связанного с выявлением разнообразия способов размножения и систем репродукции цветковых растений, полученные данные имеют и прикладное значение для разработки способа стабильного получения растений-клонов этого ценного лекарственного растения.

В корневищах и в меньшей степени в надземной части бореца северного содержится ряд фармакологически активных алкалоидов [6].



**Рис. 1. Борец северный *Aconitum lycoctonum* L. в природных условиях, x0.08**

В то же время места сбора корневищ с высоким/супервысоким содержанием лаппаконитина приурочены к малонаселенным горным или таежным районам. Кроме того, массовый сбор корневищ большими группами, как правило, неквалифицированных сборщиков наносит существенный урон всему растительному покрову региона сбора и ведет к тому, что это ценное растение может попасть в категорию исчезающих видов. Таким образом, поиск альтернативных способов расширения сырьевой базы для производства препарата аллапинин весьма актуален.

Цель работы состояла в разработке способа стабильного получения растений бореца северного – клонов суперпродуцентов лаппаконитина, на основе использования феномена эмбриоидогенеза в каллусной культуре *in vitro*.

#### **Объекты и методы исследования**

Объектом исследования послужили растения бореца северного – суперпродуценты лаппаконитина, отобранные на основании морфологических показателей во время экспедиционных выездов по Южному Уралу сотрудниками лаборатории экологии растительных ресурсов Института биологии Уфимского НЦ РАН (зав. лабораторией – д.б.н. Н.И. Федоров) и предварительно проанализированные методом ВЭЖХ на содержание лаппаконитина.

Использовали метод культуры органов, тканей и клеток растений *in vitro* [3], светооптические методы исследования [4].

#### **Результаты и обсуждение**

На первом этапе экспериментов с помощью гистологического контроля подобрали корневищные почки, характеризующиеся развитыми апексами. Высечки апексов таких корневищных почек, содержащие меристематическую ткань, использовали в качестве эксплантов для получения каллусов. Высечки инокулировали на среду I, составленную по Мурасиге и Скуга [9], с введением кинетина в эмпирически подобранной концентрации (*know how*), адекватной для индукции каллусообразования *in vitro*, и размещали в темноте при температуре +20°C.

Через 7-9 суток культивирования формировались каллусы, которые переносили на среду II, также составленную по Мурасиге и Скуга, с введением фитогормона ИУК в эмпирически подобранной концентрации (*know how*), индуцирующей формирование в каллусах эмбриоидов. Каллусы культивировали в темноте при температуре +26°C.

Особый интерес вызывает алкалоид лаппаконитин. Именно борец северный – единственный источник производимого из лаппаконитина высокоэффективного антиаритмического препарата аллапинин, разрешенного к производству Минздравом РФ (с 1992 г.), запатентованного в США, Японии и Германии [5].

В настоящее время борец северный достаточно широко распространен на Южном Урале [7]. Однако в корневищах растений, произрастающих на большей части ареала, отмечается низкое содержание лаппаконитина, что делает нерентабельной их заготовку как сырья.

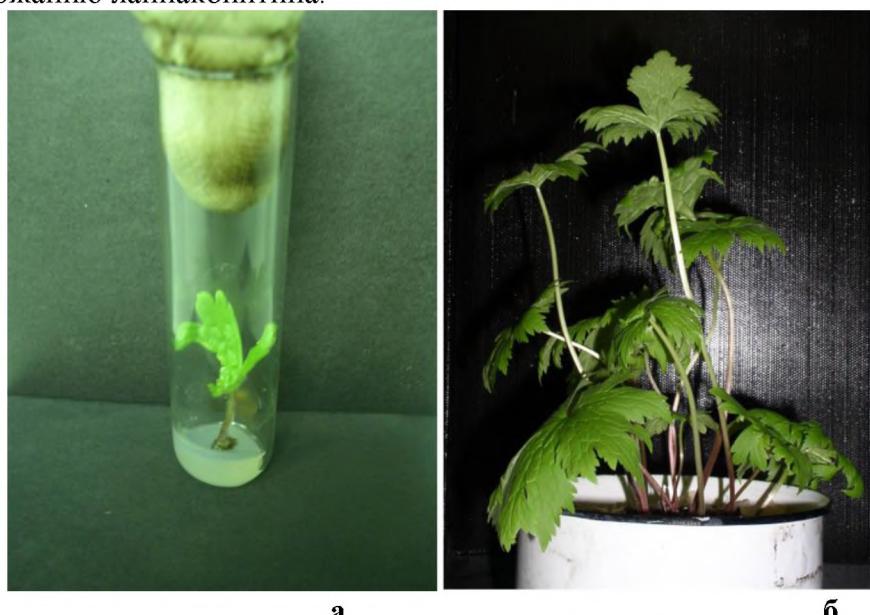
Через каждые сутки культивирования проводили гистологический анализ части каллусов для выявления механизмов формирования и развития эмбриоидов. Так, установлено, что эмбриоиды развиваются из комплекса инициальных клеток, изолированных от остальных клеток каллуса. На 28-30 суток культивирования эмбриоид характеризуется наличием органов, типичных для зародышей двудольных растений: апекс побега, апекс корня, заложившаяся пара первых листьев. К 30-35 суткам эмбриоид представлен структурой с хорошо развитыми зародышевым корнем, парой первых листьев и заложившейся парой вторых листьев.

Такие эмбриоиды во множестве отмечены на поверхности каллусов. Тот факт, что из одного каллуса (полученного в свою очередь из одной высечки корневищной почки растения-суперпродуцента) можно получить множество эмбриоидов, хотелось бы подчеркнуть особо.

Эмбриоиды переносили на среду III, составленную по Блейдзу [8], и размещали при освещенности 18 клк в условиях имитации летнего светового дня (18 час свет/6 час темнота). На 35-38 сутки эмбриоиды давали начало проросткам (рис. 2, а).

После формирования у проростков корневой системы их переносили в вегетационные сосуды со специально подобранный почвенной смесью, размещали также при освещенности 18 клк. Вокруг проростков поддерживали высокую влажность. В таких условиях проростки активно вегетировали и формировали растения (рис. 2, б).

В дальнейшем планируется перевести регенеранты в условия открытого грунта на полевые участки научного стационара и через 3-4 года провести оценку их корневищ по содержанию лаппаконитина.



**Рис. 2. Формирование и развитие регенерантов бореца северного: а – проросток в условиях *in vitro*, х 0.8; б – регенерант в fazu вегетации, х 0.1**

### Выводы

Анализ полученных данных дает основание выделять у бореца северного способ размножения в каллусной культуре *in vitro* через этап формирования эмбриоидов. Тем самым еще одно экспериментальное подтверждение получает концепция эмбриоидогенеза как особой категории вегетативного размножения растений в условиях *in vitro* [2].

Разработан способ стабильного получения регенерантов ценного лекарственного растения бореца северного в культуре *in vitro*. Преимущество данного способа состоит в возможности массового получения клонов как вегетативного потомства растения – суперпродуцента лаппаконитина.

Полученные клоны могут быть использованы в фармакологии для расширения сырьевой базы при производстве препарата аллапинин. Однако особенно важно то, что вносится вклад в сохранение природных популяций этого растения.

*Работа выполнена в рамках программы «Ведущие научные школы РФ» (грант НШ 2096.2008.4, лидер школы – член-кор. РАН Т.Б. Батыгина, Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, г. Санкт-Петербург).*

### Список литературы

1. Батыгина Т.Б. Воспроизведение, размножение и возобновление растений // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 3: Системы репродукции. – СПб.: Мир и семья, 2000а. – С. 35-39.
2. Батыгина Т.Б. Эмбриоидегенация – новый тип вегетативного размножения // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 3: Системы репродукции. – СПб.: Мир и семья, 2000б. – С. 334-349.
3. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии растений. – К.: Наукова думка, 1980. – 468 с.
4. Круглова Н.Н., Егорова О.В. Световой микроскоп как инструмент в биотехнологии растений. – М.: Лабора, 2009. – 119 с.
5. Латыпова Г.М., Плеханова Т.М., Мухаметшина В.С. Фармакогностическое изучение аконита северного как источника «Аллапинина» // III Укр. конф. по мед. ботанике. Киев, 25-27 сентября 1992 г. – К., 1992. – С. 78-79.
6. Содержание алкалоида лаппаконитина в подземной и надземной частях *Aconitum septentrionale* Koelle в растительных сообществах в Башкирии / Федоров Н.И., Мартъянов Н.А., Никитина В.С., Ишбирдина Л.М. // Растительные ресурсы. – 1996. – Вып. 3. – С. 96-101.
7. Цицилин А.К, Шретер А.И. Прогноз природных ресурсов *Aconitum septentrionale* Koelle в Башкирской АССР // Растительные ресурсы. – 2000. – Вып. 4. – С. 513-539.
8. Blaydes D.F. Interaction of kinetin and various inhibitors in the growth of soybean // Physiol. Plant. – 1966. – V. 19, N 3. – P. 748-753.
9. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures // Physiol. Plant. – 1962. – V. 15, N 3. – P. 473-497.

### PECULIARITIES OF SPHAEROBLAST FORMATION AND DEVELOPMENT IN *OLEA EUROPAEA* L.

KONSTANTINOS ROUBOS<sup>1</sup>; ANTONIOS IFOULIS<sup>1</sup>;  
IRINA MITROFANOVA<sup>2</sup>, DrSci; CHRISTOS NELLAS<sup>1</sup>, NIKOLAOS KOUTINAS<sup>1</sup>;  
ATHANASSIOS RUBOS<sup>1</sup>, PhD

<sup>1</sup>Plant Production Department, ATEI Thessaloniki, Greece

<sup>2</sup>Nikitsky Botanical Gardens – National Scientific Center, Yalta, Ukraine

#### Introduction

Sphaeroblasts are adventitious buds consisting of a woody, more or less globular structure connected to the vascular system of the plant through a pointed end and capable of differentiating vegetative meristems giving growth to juvenile shoots (Fig. 1 C, D, E). Their life is between three to four years and if during this life period do not differentiate meristems and/or give new growth they lose their viability. The first to describe sphaeroblasts was Theophrastos (371 – 287 BC), in his surviving work «*Enquiry into Plants*». He named them γόγγρο (singular), γόγγραι (plural) after their shape, looking like the beet root (γογγύλη). The first and perhaps the only study on sphaeroblast formation in olive trees have been made by Baldini and Mosse [1].

Sphaeroblasts are formed on various tree species under the effect of various factors and