

БИОТЕХНОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ**ГЕНОМНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *NEPETA* L.
IN SITU И *IN VITRO***

В.Д. РАБОТЯГОВ, доктор биологических наук;
И.В. МИТРОФАНОВА, доктор биологических наук; Ю.В. АКСЁНОВ
Никитский ботанический сад – Национальный научный центр

Введение

Из года в год растет интерес к проблеме рационального использования растительных ресурсов. Большие возможности открывает использование эфирномасличных растений как источника биологически активных соединений, необходимых для медицины, парфюмерно-косметической и пищевой промышленности. С каждым годом увеличивается спрос на эфирные масла с цветочным, цитральным, эвгенольным и другими запахами [6, 8, 9].

Решение данной проблемы заключается в изыскании, привлечении и глубоком изучении биологии и биохимии ароматических растений, содержащих ценные эфирные масла. Наиболее интересными в данном вопросе являются представители рода *Nepeta* L. Котовник известен как пряно-ароматическое, лекарственное и эфирномасличное растение [5, 8]. Эфирное масло котовников имеет высокую антимикробную активность, применяется в качестве фунгицида для борьбы с плесневыми грибами. В последнее время масло котовника используется во многих странах мира в медицине и парфюмерно-косметической промышленности, в связи с чем этому растению уделяется особое внимание [8, 9].

В Никитском ботаническом саду проводятся селекционные работы по получению новых сортов сельскохозяйственных культур методами отдаленной гибридизации, экспериментальной полиплоидии, культуры органов, тканей и клеток [3, 6, 10, 14]. Показаны результаты селекции при правильном подборе родительских пар по созданию новых высокопродуктивных и устойчивых к неблагоприятным факторам среды сортов.

Целью настоящей работы было создание сложных межвидовых гибридов с заданными признаками путем комбинирования геномов исходных видов котовника для получения высокопродуктивных сортов, дальнейшего их введения в условия *in vitro* и разработки биотехнологических приемов клонального микроразмножения.

Объекты и методы исследования

Материалом для исследования служили образцы трех видов котовника: *Nepeta cataria* Beck., *Nepeta transcaucasica* Grosen и *Nepeta grandiflora* L. Полиплоиды получали действием водного раствора колхицина (0,1%) на проростки семян. Межвидовую гибридизацию проводили по общепринятым методикам, а также по методике, разработанной в отделе новых ароматических и лекарственных культур [1, 9, 11]. Эфирное масло получали из надземной части растений, собранной в период массового цветения. Массовую долю эфирного масла определяли методом гидродистилляции на аппаратах Клевенджера [2]. Компонентный состав эфирного масла исследовали на хроматографе Agilent Technology 6890N с масс-спектрометрическим детектором 5973N. Условия анализа: хроматографическая колонка кварцевая, капиллярная HP5MS. Температура испарителя – 250°C. Газ-носитель – гелий. Скорость газа носителя 1 мл/мин. Ввод пробы с делением потока 1/50. Температура термоса – 50°C с программированием 3 мин до 220°C. Температура детектора – 250°C. Индексы удерживания компонентов рассчитывали по результатам контрольных анализов эфирных масел с набором нормальных алканов [12].

Микропобеги полученных полиплоидных форм вводили в условия *in vitro*. В процессе работы придерживались как общепринятых методов асептики, так и методов,

разработанных в отделе биотехнологии НБС–ННЦ [4, 7]. Вычленение эксплантов и их пассаж проводили в ламинарных боксах марки Fotran Lf и БП–4–004. Экспланты, помещенные в пробирки и колбы, выращивали на модифицированной питательной среде МС [13] в культуральной комнате, где поддерживалась постоянная температура $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 16–часовой фотопериод, интенсивность освещения 0,5–3 клк и 70–80%–ная относительная влажность воздуха.

Результаты и обсуждение

В условиях Южного берега Крыма все интродуцированные виды проходят полный цикл развития, обильно цветут и плодоносят. Цитогенетический анализ показал, что вид *N. grandiflora* имеет соматическое число хромосом $2n=4x=36$ и является аутотетраплоидом. Для вида *N. cataria* v. *citriodora* характерно основное число хромосом $2n=4x=36$. Вид *N. transcaucasica* – $2n=2x=18$ хромосом. Таким образом, первые два вида являются аутотетраплоидами, а котовник закавказский содержит диплоидное число хромосом.

Изучение содержания эфирного масла у исследуемых видов показало, что массовая доля эфирного масла варьирует в пределах от 0,24 до 0,42% на сырую массу сырья или от 0,82 до 1,56% на абсолютно сухую массу. Наибольшая массовая доля эфирного масла отмечена у котовника лимонного, наименьшая – у котовника крупноцветкового. Эфирное масло котовников является ценным сырьем для парфюмерии и содержит следующие компоненты: нерол, нераль, гераниол, гераниаль, цитронеллол и непеталактоны. Лучшим по качеству и содержанию эфирного масла оказался *N. cataria*, а по урожайности – *N. grandiflora*.

Известно, что при направленном скрещивании возникает новая генотипическая изменчивость, которая служит источником отбора новых комбинаций признаков и широко используется в селекции растений. Однако размах генетической изменчивости возрастает еще больше, если взаимодействие генов происходит на разных уровнях пloidности [1]. Поэтому экспериментальная полиплоидия и направленная межвидовая гибридизация дивергентных особей представляет собой один из богатейших источников создания новой генетической изменчивости для нужд селекции котовника. Учитывая вышесказанное, нами путем колхицинирования синтетически созданы аутотетраплоиды *N. transcaucasica* ($2n=4x=36$). При скрещивании *N. transcaucasica* x *N. grandiflora* получен аллотриплоид. Межвидовой гибрид имеет $2n=3x=27$ хромосом, т.е. в его образовании участвовали сбалансированные 9–хромосомные гаметы котовника закавказского и 18–хромосомные гаметы котовника крупноцветкового. Гибрид включает один геном первого вида и два генома второго вида (рис. 1).

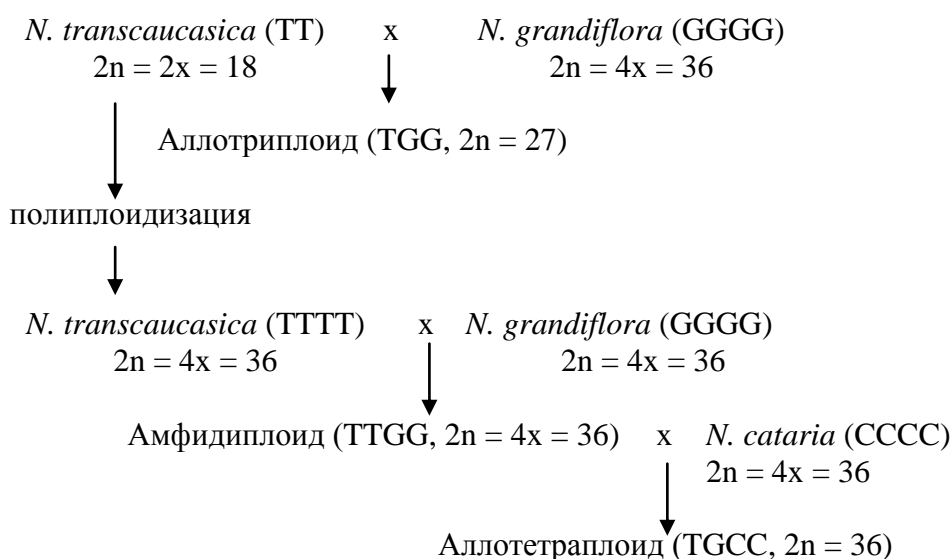


Рис. 1. Схема межвидовых скрещиваний исходных форм *N. cataria*, *N. transcaucasica* и *N. grandiflora* с дальнейшей полиплоидизацией и скрещиванием синтетических амфидиплоидов

Скрещивание индуцированного автотетраплоида *N. transcaucasica* x *N. grandiflora* позволило создать амфидиплоид с двумя геномами котовника закавказского и двумя геномами котовника крупноцветкового. Гибрид – $2n=4x=36$ хромосом, в его образовании участвовали сбалансированные 18-хромосомные гаметы как одного, так и другого вида (рис. 1). Амфидиплоид является фертильным и образует семена от свободного опыления. Гибрид отличается мощным габитусом, крупными листьями и соцветиями.

С целью создания нового ароматического растения, совмещающего высокую урожайность с повышенным содержанием эфирного масла и ценных компонентов, проведены скрещивания трех видов котовника. Для скрещивания были использованы лучшие хемотипы котовника закавказского, крупноцветкового и лимонного (рис. 1).

Скрещивание сложного индуцированного амфидиплоида между двумя видами котовника (геномная формула TTGG) с видом *N. cataria* (гаметы CC – 18-хромосомные) позволило синтезировать гибриды F₁ с участием трех видов (геномная формула TGCC $2n=45$). Цитологический анализ гибрида показал, что он имеет $2n=45$, т.е. в его образовании участвовали сбалансированные 18-хромосомные гаметы котовника кошачьего и по одному геному котовника закавказского (Т) и крупноцветкового (геном G). Уникальный трехвидовой гибрид оказался высокопродуктивным, с большим выходом эфирного масла (1,78% на сухую массу сырья) и интересным компонентным составом эфирного масла: нерол – 20%, нераль – 32%, гераниол – 15,4%, гераниаль – 7,2% и геранилацетат – 10,5%, но с недоразвитой женской сферой, что не позволяет его размножать семенами. В обратной комбинации скрещивания *N. cataria* (геномная форма CCCC) x аллотетраплоид (TTGG) удалось синтезировать трехвидовой гибрид (геномная формула CCTTGG, $2n=54$). Число хромосом у гибрида $2n=6x=54$, т.е. в его образовании участвовали сбалансированные 18-хромосомные гаметы котовника лимонного (CC), закавказского (TT) и крупноцветкового (GG). Следует отметить, что у сложных трехвидовых гибридов котовника (аллогексаплоида) продуцируются наряду с нормальными и неполноценные семена с низкой энергией прорастания. Среди аллогексаплоидов выделены формы с оригинальным компонентным составом эфирного масла: нерол – 61,2%, гераниол – 23,4%, гераниаль – 9,5%. Однако большинство гибридов имело высокую массовую долю непеталактонов (до 90%) в эфирном масле, что отрицательно сказывается на его качестве.

Нашими исследованиями установлено, что очень часто при отдаленной гибридизации эфирномасличных и лекарственных растений сложные синтетические гибриды формируют неполноценные семена, что препятствует внедрению их в производство. Однако вышеприведенные примеры показывают, что при отдаленной гибридизации получают уникальные гибриды с ценными признаками, но с недоразвитыми зародышами.

Применение методов культуры органов и тканей позволяет получать полноценные проростки. Для межвидовых гибридов, характеризующихся недоразвитием мужской и женской сферы, особое значение имеет также клональное микроразмножение. Огромным преимуществом является то, что с помощью биотехнологических методов можно получить здоровый растительный материал, свободный от вирусной, бактериальной и грибной инфекции. В культуре *in vitro* открывается также возможность получения растений F₂ из гибридных зародышей для отбора форм с высоким содержанием биологически активных веществ.

Нами разработан способ клонального микроразмножения видов и сложных гибридов котовника. Способ включает пять последовательных этапов:

1) *отбор донорных растений* на коллекционных участках НБС–ННЦ – май–июнь (частота регенерации – 80%);

2) *ступенчатая стерилизация растительного материала* (1%-ный раствор Thimerosal – 15–20 мин → 70%-ный C_2H_5OH – 1 мин → 0,08%-ный раствор $AgNO_3$ – 2–3 мин с добавлением 1–2 капель детергента Tween–80 и последующей 3–4-кратной промывкой в стерильной дистиллированной воде). При этом режиме стерилизации получено от 70–80% растительного материала, свободного от контаминации;

3) *вычленение эксплантов и введение их в условия *in vitro** (вегетативные почки, междоузлия культивировали на модифицированной питательной среде МС, дополненной 3,19–4,56 мкМ зеатина, 0,89 мкМ ИМК; частота регенерации составила – 85%; начало побегообразования на 12–14 сутки культивирования);

4) *собственно микроразмножение* – 2 типа: а) культура вегетативных почек с последующим побегообразованием и микрочеренкованием. Микрочеренкование и получение множественных микропобегов проводили на среде МС с половинным содержанием нитрата аммония и нитрата калия, дополненной 2,28 мкМ зеатина и 0,49 мкМ ИМК. На этом этапе интенсивность освещения возрастала до 2,5–3 клк, а температура понижалась до 23°C; б) культура листовых дисков с последующим микрочеренкованием побегов, полученных в результате прямой регенерации. Листовые диски культивировали на среде МС, дополненной TDZ. Оптимальная концентрация TDZ составили 9 мкМ. Через 4 недели после введения эксплантов на питательную среду отмечено массовое формирование адвентивных почек (12 шт/эксплант). Адаксиальное расположение эксплантов увеличивало частоту регенерации до 70%;

5) *укоренение *in vitro**. Укоренение *in vitro* осуществляли на питательной среде МС, содержащей половинный набор макро– и микросолей. В среду добавляли ИМК в концентрации 2,46 мкМ. Культуральные сосуды выставляли на стеллажи с интенсивностью освещения 0,5–1 клк. Корни длиной 5–6 см формировались в течение 2–2,5 недель. Количество укорененных микропобегов котовника достигало 72%.

Выводы

Исследование 3 видов рода *Nepeta* L. показало, что при направленном скрещивании возникает новая, огромная по своим масштабам генотипическая изменчивость, которая служит источником отбора новых комбинаций признаков и широко используется в селекции эфирномасличных растений. Только использование межвидовой гибридизации и полиплоидии позволило создать уникальные сложные гибриды, обладающие комплексом биологически активных веществ, являющихся носителями нужных генов. После проведения генетически обоснованного подбора родительских пар по генам, контролирующим синтез терпеноидов, получены трехвидовые гибриды с соотношением геномов исходных видов (1:1:2; 1:2:1; 2:1:1; 2:2; 2:1) со следующей геномной формой (ССТГ, ТССГГ, ТТГГ, ТГГ, ССГГ, ССТГГ) от исходных видов *Nepeta*. Созданы гибриды с цветочным, цитральным и розовым запахом эфирного масла. Разработаны биотехнологические приемы клонального микроразмножения видов и ценных гибридов котовника.

Список литературы

1. Бороевич С. Принципы и методы селекции растений. – М.: Колос. – 1984. – 344 с.
2. Горяев М., Плива И. Методы исследования эфирных масел. – Алма-Ата: Из-во АН Каз. ССР, 1961. – 752 с.

3. Здруйковская–Рихтер А.И. Культура изолированных зародышей и некоторые другие приемы выращивания растений *in vitro*: Методические рекомендации. – М., 1974. – 62 с.
4. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – К.: Наукова думка, 1980. – 488 с.
5. Либусь О.К., Работягов В.Д., Кутько Л.А. Эфирномасличные и пряно-ароматические растения. – Херсон: Айлант, 2004. – 270 с.
6. Машанов В.И. Некоторые итоги и проблемы интродукции и селекции эфирномасличных растений // Труды ГНБС. – 1978. – Т. 75. – С. 5–27.
7. Митрофанова О.В., Логвиненко И.Е., Иванова Н.Н. Регенерация растений из изолированных органов и тканей *Artemisia balchanorum* Krasch. и *Artemisia scoparia* W. K. // Биотехнологические исследования садовых и других ценных многолетних культур: Сб. науч. трудов Никит. ботан. сад. – 1997. – Т. 119. – С. 143–153.
8. Новые эфирномасличные культуры / Машанов В.И., Андреева Н.Ф., Машанова Н.С., Логвиненко И.Е. – Симферополь: Таврия, 1988. – 160 с.
9. Работягов В.Д., Машанов В.И., Андреева Н.Ф. Интродукция эфирномасличных и пряно-ароматических растений. – Ялта, 1999. – 31 с.
10. Работягов В.Д. Аллотриплоидные формы в роде *Lavandula* L. // Цитолого-эмбриологические исследования высших растений: Сб. науч. трудов // Никит. ботан. сад. – 1992. – Т. 113. – С. 102–114.
11. Чувашина Н.П. Цитогенетика и селекция отдаленных гибридов и полиплоидов смородины. – Л.: Наука, 1980. – 121 с.
12. Jennings W., Shibamoto T. Qualitative analysis of flavor and fragrance volatiles by glass capillary gas chromatography. – New York: Academic Press, 1980. – 380 p.
13. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* – 1962. – V. 15, N 4. – P. 473–497.
14. The effect of dinitroaniline and phosphorothiamidate herbicides on polyploidisation *in vitro* of *Nepeta* plants / Mitrofanova I.V., Zilbervarg I.R., Yemets A.I., Mitrofanova O.V., Blume Ya.B. // *Cell Biology International.* – 2003. – Vol. 27. – P. 229–231.

Рекомендовано к печати д.б.н., проф. Митрофановой О.В.