

УДК 631.532/.535

## ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ АШВАГАНДЫ (*WITHANIA SOMNIFERA* L.)

А.А. АЛРАШИДИ<sup>1</sup>, М.А. ЭЛЬ САЙЕД<sup>1,2</sup>, Р.Е. ПАВЛИКОВ<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева;

<sup>2</sup> Tanta University, Tanta, Egypt)

В работе представлены результаты исследования по введению в культуру *in vitro* *Withania somnifera* L. Объектом служили семена ашваганды, которые поверхностно стерилизовали 0,1%-ным раствором сулемы в течение 10 мин и в дальнейшем культивировали на безгормональной питательной среде Мурасиге и Скуга (МС). Исследования показали, что изучаемые семена обладают высокой всхожестью и применяемая экспозиция стерилизации позволяет получать в 94,2% случаев хорошо растущую стерильную культуру. В дальнейших исследованиях изучали влияние гормонального состава питательной среды (цитокинина БАП в концентрации от 0,5 до 3 мг/л) на морфогенетический потенциал изолированных сегментов стебля с одной пазушной почкой. Экспериментально установлено, что присутствие в составе питательной среды БАП в концентрации 2 и 3 мг/л приводило к образованию множества мелких витрифицированных микропобегов, а в варианте с применением 0,5 мг/л БАП формировались побеги правильной морфологии. В этом варианте наблюдали высокий и стабильный коэффициент размножения, который в среднем на каждом пассаже составил 12–13,5. На основании полученных данных был разработан регламент, позволяющий клонировать *Withania somnifera* и получать необходимое количество зеленой биомассы для проведения последующих исследований по изучению накопления вторичных метаболитов как в растениях-регенерантах, так и в каллусной и суспензионной культурах.

**Ключевые слова:** *Withania somnifera*, ашваганда, клональное микроразмножение, *in vitro*, регуляторы роста, микропобеги, питательная среда.

### Введение

В последнее время все больший интерес исследователей привлекают работы с лекарственными растениями как источниками веществ вторичного синтеза, которые широко применяются в фармакологии, медицине, ветеринарии, пищевой промышленности и т. д. Особого внимания заслуживают растения, вторичные метабо-

литы которых обладают широким спектром действия, в частности антимикробным, антифунгицидным, а также противораковой активностью. Однако многие из таких ценных лекарственных растений на сегодняшний день находятся на грани исчезновения, являются редкими и занесены в Красную книгу. Это обусловлено неконтролируемым сбором растительного сырья, ограниченностью ареала распространения, а также воздействием факторов абиотической и биотической природы. Преодолеть постоянное сокращение запасов растительных ресурсов возможно благодаря применению методов биотехнологии и, в частности, клеточной инженерии растений. Одним из таких способов является клональное микроразмножение, которое за короткое время позволяет получать необходимое количество генетически однородного посадочного материала. Кроме того, применение культуры изолированных тканей и органов растений позволяет решать вопрос о получении веществ вторичного синтеза путем выращивания в условиях *in vitro* дедифференцированных каллусных клеток и суспензионной культуры.

Одной из перспективных культур является ашваганда (*Withania somnifera*) (синонимы – зимняя вишня, индийский женьшень или физалис солнечнолистный) [15]. Растение относится к семейству пасленовых (*Solanaceae*), в котором насчитывается 84 рода и около 3000 видов, произрастающих по всему миру. Представители этого семейства – растения родов *Withania* и *Physalis* – играют важную роль в народной медицине Юго-Восточной Азии, например в системах медицины Унани и Аюрведы [5, 9–11]. Двадцать три известных вида *Withania* широко распространены в засушливых районах тропических и субтропических зон – от Канарских островов, Средиземноморского региона и Северной Африки до Юго-Западной Азии [13–16]. Среди них только два вида – *W. somnifera* и *W. coagulans* – имеют большое значение для медицины и произрастают в нескольких регионах [14–16].

Растения ашваганды (*Withania somnifera*) уже более 3000 лет применяют в народной медицине при лечении физиологических заболеваний, а также для поддержания молодости, выносливости, силы и здоровья человека [6, 7, 11, 16]. Это обусловлено тем, что во всех частях растения (листьях, коре, плодах, семенах и, в большей степени, в корне) синтезируются такие вещества, как сапонины, гликозиды, стероидные лактоны, олигосахариды, витанолид, а также свободный витаферин А (агликон), обладающий цитотоксическим (противоопухолевыми) свойством. В связи с этим данная культура весьма привлекательна для исследований как в условиях *in vitro*, так и *in vivo*. Однако поскольку работы по культивированию *Withania somnifera in vitro* малочисленны, а приведенные результаты противоречивы и плохо воспроизводимы, исследования по разработке регламента клонального микроразмножения актуальны, особенно в рамках дальнейшего изучения вторичных метаболитов в растениях-регенерантах, каллусной и суспензионной культурах.

Исходя из вышеизложенного, цель данной работы – изучить влияние условий культивирования на клональное микроразмножение ашваганды (*Withania somnifera*).

## Материалы и методы

Исследования проводили на кафедре генетики, биотехнологии, селекции и семеноводства РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева. Объектом исследования служили семена *W. somnifera*, приобретенные в фирме Plantium (Московская область, г. Мытищи).

Для получения стерильной культуры проводили стерилизацию семян 0,1%-ным раствором сулемы ( $HgCl_2$ ) в течение 5 и 10 мин, после чего их трижды промывали стерильной дистиллированной водой. Все работы по стерилизации семян, введению их в культуру *in vitro*, а также клонированию растений осуществляли в асептических условиях ламинар-бокса. В ходе эксперимента придерживались правил, разработанных на кафедре генетики, биотехнологии, селекции и семеноводства РГАУ-МСХА, которые изложены в лабораторном практикуме по сельскохозяйственной биотехнологии [2, 3].

Стерильные семена высаживали в биологические пробирки на безгормональную агаризованную питательную среду, содержащую минеральные соли по прописи Мурасиге и Скуга (МС) [12], и помещали в световую комнату при следующих условиях: температура –  $25 \pm 2^\circ C$ ; фотопериод – 16 ч; освещение – белые люминесцентные лампы ЛБ-60 с интенсивностью освещения 3,5 тыс. лк.

Полученные стерильные растения в дальнейшем делили на сегменты, включающие стебель с одной пазушной почкой, которые культивировали на питательной среде МС, содержащей 6-бензиламинопуридин (БАП) в различных концентрациях (0,5; 1; 2; 3 мг/л). В качестве контрольной была выбрана среда без регуляторов роста.

Учет результатов проводили в конце пассажа, при этом оценивали: количество стерильных эксплантов (%), число адвентивных почек на один эксплант (шт.), биометрические показатели микрорастений – высота (см) и наличие корневой системы (%), коэффициент размножения.

Все эксперименты были проведены дважды с 25-кратной повторностью. Полученные результаты обработаны методами математической статистики. Дисперсионный анализ проведен с использованием программы MS Excel. На диаграммах представлены средние арифметические значения определений и их стандартные отклонения.

## Результаты и обсуждение

Все исследования по культуре изолированных клеток и тканей растений начинаются с оптимизации условий стерилизации растительных объектов с целью получения хорошо растущей и выровненной стерильной культуры. В данной работе было изучено влияние двух режимов стерилизации (0,1%-ный раствор сулемы в течение 5 и 10 мин) на прорастание семян ашваганды на 10 и 30 сут и формирование проростков. Полученные результаты приведены в таблице.

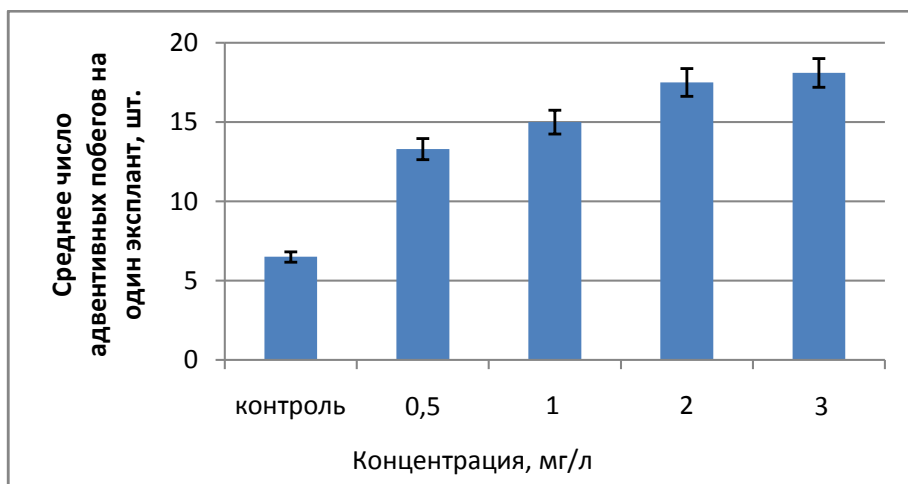
**Определение экспозиции стерилизации семян *W. somnifera***

Время стерилизации, мин	Выход стерильных проростков, %	Среднее количество проросших семян, %	
		на 10 сут	на 30 сут
5	76,2 $\pm$ 3,2	68,1 $\pm$ 2,9	84,3 $\pm$ 2,2
10	94,2 $\pm$ 4,1	91,2 $\pm$ 4,0	97,2 $\pm$ 4,7

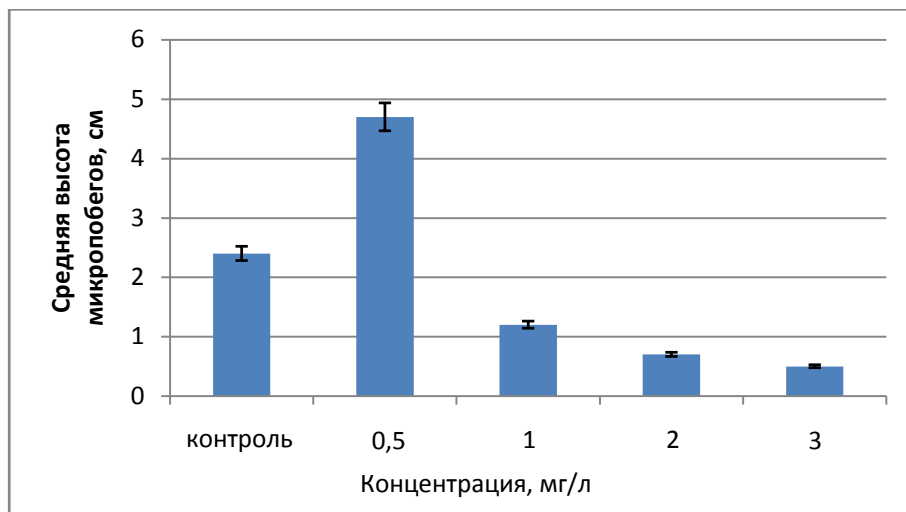
В ходе эксперимента установлено, что режимы стерилизации оказывают существенное влияние на получение асептической культуры семян. Из всех исследуемых режимов стерилизации наилучшие результаты получены при использовании экспозиции 10 мин. В этом варианте выход стерильных проростков составил 94,2%, что в среднем

на 20% выше по сравнению с экспозицией 5 мин. Данная тенденция сохранялась на протяжении всего пассажа. Кроме того, отмечено, что режимы стерилизации не оказали существенного влияния на морфометрические показатели сформировавшихся проростков. Во всех вариантах средняя высота надземной части ростков на 30 сут культивирования составила 2,3 см, а корневая система – 4,8 см.

Стерильные растения в дальнейшем черенковали, и полученные экпланты (сегмент стебля с одной пазушной почкой) культивировали на среде МС с разными концентрациями БАП в течение четырех пассажей. Результаты приведены на рис. 1–3.

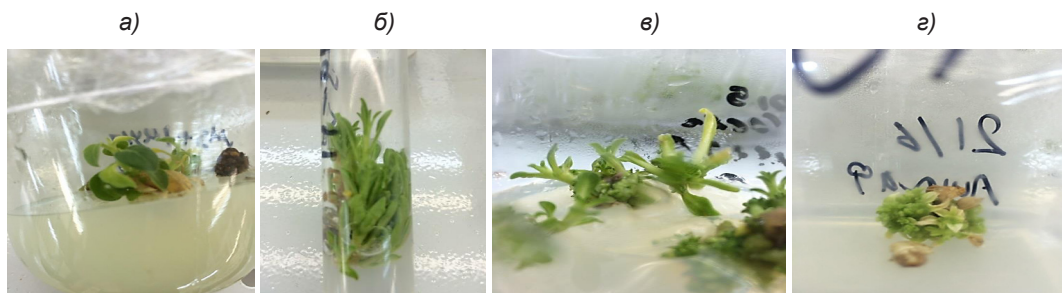


а)



б)

**Рис. 1.** Влияние концентрации БАП на образование (а) и высоту (б) адвентивных побегов *W. somnifera* при выращивании *in vitro*



**Рис. 2.** Образование адвентивных побегов *W. somnifera* на среде МС, содержащей разные концентрации БАП: а – контроль; б – 0,5 мг/л; в – 1 мг/л; е – 3 мг/л

В результате проведенных исследований установлено, что во всех вариантах питательных сред, включая и контроль, наблюдалась 100%-ная частота образования адвентивных почек, однако среднее их число на один эксплант по вариантам изменялось. Была отмечена прямая корреляционная зависимость между концентрацией гормона (БАП) в питательной среде и числом образовавшихся адвентивных почек, а в дальнейшем адвентивных побегов – с увеличением концентрации БАП возрастало число адвентивных почек (рис. 1, а). Однако рост адвентивных побегов с увеличением концентрации цитокинина в питательной среде резко уменьшался (рис. 1 (б), 2).

На основании проведенных исследований было установлено, что оптимальной питательной средой для формирования и роста почек *de novo* была среда МС, содержащая БАП в концентрации 0,5 мг/л. В этих условиях коэффициент размножения в среднем составил 13–14, а высота микропобегов – 4,7 см. Кроме того, в данном варианте наблюдалось спонтанное образование корневой системы, что не было отмечено в других условиях культивирования. Что касается питательных сред, содержащих повышенные концентрации БАП, то в этих вариантах, несмотря на высокий коэффициент размножения 17–18, средняя высота микропобегов составляла 0,5–0,7 см. Причем визуальные наблюдения позволили выявить некоторые морфологические изменения. В этих вариантах формировались микропобеги с утолщенной листовой пластинкой и стеблем. Все это свидетельствует о формировании витрифицированных побегов, которые при дальнейшем культивировании не были способны к размножению. Полученные данные полностью согласуются с результатами других исследователей и еще раз подтверждают вывод, что высокие концентрации гормонов, как правило, приводят к формированию аномальных микропобегов [1, 8].

В связи с тем, что концентрации БАП 1–3 мг/л были не эффективны для формирования микропобегов правильной морфологии, на этапе собственно микро-размножения было исследовано влияние гормонального состава питательной среды (БАП 0,5 мг/л) на коэффициент размножения. Культивирование микрочеренков ашваганды на данной среде проводили на протяжении пяти пассажей (рис. 3).

В результате проведенных исследований выявлено, что коэффициент размножения был стабильным, высоким и в среднем на каждом пассаже составил 12–13,5, что позволило получить из одного семени ашваганды до 20 тыс. растений в течение шести субкультивирований.

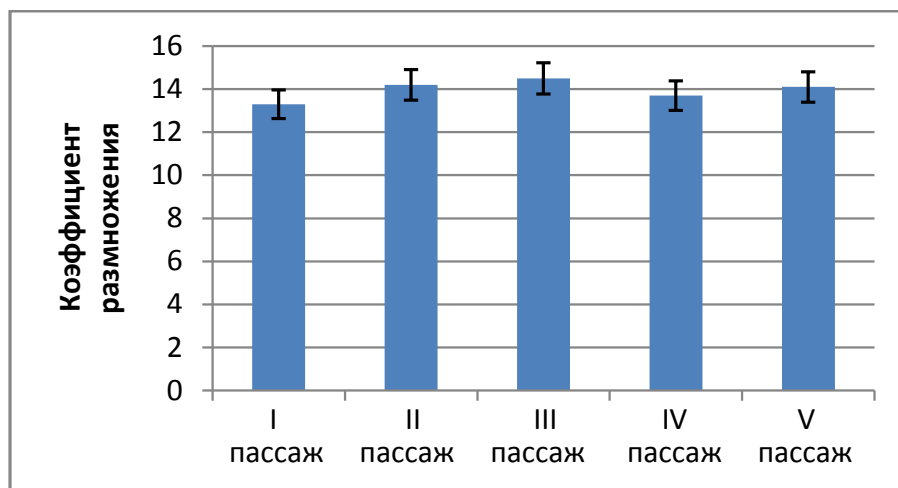


Рис. 3. Средний коэффициент размножения ашваганды на среде МС, содержащей БАП 0,5 мг/л на протяжении пяти пассажей

На основании полученных данных разработан регламент, позволяющий клонировать *Withania somnifera* и получать необходимое количество зеленой биомассы для проведения последующих исследований по изучению вторичных метаболитов как в растениях-регенерантах, так и в каллусной и суспензионной культуре.

### Библиографический список

1. Алтанцэцэг Э., Калашиникова Е.А. Размножение астрагала монгольского (*Astragalus mongholicus* Вге.) в условиях *in vitro* // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. 2013. № 6. С. 40–48.
2. Калашиникова Е.А., Кочиева Е.З., Миронова О.Ю. Практикум по сельскохозяйственной биотехнологии. М.: КолосС, 2006. 162 с.
3. Калашиникова Е.А., Чередниченко М.Ю., Карсункина Н.П., Халилуев М.Р. Лабораторный практикум по сельскохозяйственной биотехнологии. 3-е изд., испр. и доп. М.: Изд-во РГАУ-МСХА, 2014. 147 с.
4. Abhyankar G.A., Chinchani G.S. Response of *Withania somnifera* Dunal leaf explants *in vitro* // Phytomorphology. 1996. No. 46. P. 249–252.
5. Asthana R., Raina M.K. Pharmacology of *Withania somnifera* (L.) Dunal – a review // Indian Drugs. 1989. No. 26. P. 199–205.
6. Devi P.U., Sharada A.C., Solomon F.E., Kamath M.S. *In vivo* growth inhibitory effect of *Withania somnifera* (Ashwagandha) on a transplantable mouse tumor, Sarcoma 180 // Ind. Jour. Exp. Biol. 1992. No. 30. P. 169–172.
7. Furmanowa M., Gajdzis-Kuls D., Ruskowska J. et al. *In vitro* propagation of *Withania somnifera* and isolation of withanolides with immunosuppressive activity // Planta Medica. 2001. No. 67. P. 146–149.
8. Govindraj B., Ramgopal R., Venugopal R.B. et al. High frequency plant regeneration in Ashwagandha (*Withania somnifera* (L.) Dunal): an important medicinal plant // Plant Cell Biotech. Mol. Biol. 2003. Vol. 4 (1–2). P. 49–56.

9. Hepper F.N. Old world *Withania* (Solanaceae): a taxonomic review and key to the species // *Solanaceae III: taxonomy, chemistry, evolution*. Kew: Royal Botanic Gardens, 1991. P. 211–227.

10. Jaffer H.J., Jawad A.L.M., Saber H.S., Al-Naib A. Evaluation of antimicrobial activity of *Withania somnifera* extracts // *Fitoterapia*. 1988. No. 59. P. 497–500.

11. Kirtikar K.R., Basu B.D. *Indian Medicinal Plants* // Shiva Publishers. Dehradun, India. 1991. Vol. 3. P. 1783.

12. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant*. 1962. No. 15 (13). P. 473–497.

13. Panwar J., Tarafdar J.C. Distribution of three endangered medicinal plant species and their colonization with arbuscular mycorrhizal fungi // *J. Arid Environ*. 2006. No. 65. P. 337–350.

14. Sharma R. *Agro-Techniques of Medicinal Plants*. New Delhi: Daya Publishing House, 2004. P. 31–33.

15. Singh S., Kumar S. *Withania somnifera*: The Indian Ginseng Ashwagandha. Lucknow: Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants, 1998. 293 p.

16. Warriar P.K., Nambiar V.P.K., Ramankutty C. *Indian Medicinal Plants: A Compendium of 500 species* // Orient Longman. Hyderabad, India. 1996. Vol. 5. P. 409.

## INFLUENCE OF CULTIVATION CONDITIONS ON CLONAL MICRO PROPAGATION OF ASHWAGANDHA (*WITANIA SOMNIFERA L.*)

A.A. ALRASHEDI<sup>1</sup>, A. S. MOHAMED<sup>1,2</sup>, R.YE. PAVLIKOV<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Russian Timiryazev State Agrarian University;  
<sup>2</sup> Tanta University, Tanta, Egypt)

*The paper presents the results of the introduction of *Withania somnifera L.* into in vitro culture. The research object was represented by seeds of ashwagandha, which were superficially sterilized with 0,1% solution of mercuric chloride for 10 minutes and afterwards cultivated on Murashige and Skoog hormone-free nutrient medium (MS). The results have shown that the seeds under research feature high germination properties, and the applied sterilization exposition makes it possible to obtain a well-growing sterile culture in 94,2% of cases. Further research focused on the effect of nutrient medium hormonal composition (cytokinin BAP at the concentration of 0,5 to 3 mg/l) on the morphogenetic potential of isolated segments of a stem with one axillary bud. It has been experimentally verified that BAP presence in the nutrient medium at the concentration of 2 and 3 mg/l has resulted in the formation of many small vitrified micro-shoots, and in case of using BAP at a concentration of 0,5 mg/l shoots of correct morphology have been formed. In this case a high and stable reproduction rate was observed, which constituted 12–13,5 per passage in the average. Therefore, in accordance with the data obtained the authors have developed a technological regulation allowing *Witania somnifera* cloning and getting necessary amount of green biomass for further studies of secondary metabolites both in regenerative plants and in callus and suspension cultures.*

**Key words:** *Withania somnifera*, ashwagandha, clonal micropropagation, in vitro, growth regulators, microshoot, nutrient medium.

## References

1. *Altantsetseg E., Kalashnikova Ye.A.* Razmnozheniye astragala mongol'skogo (*Astragalus mongholicus* Bge.) v usloviyakh in vitro. [Reproduction of Mongolian *Astragalus* (*Astragalus mongholicus* Bge.) In vitro // *Izvestiya Timiryazevskoy sel'skokhozyaystvennoy akademii*. 2013. No. 6. P. 40–48.
2. *Kalashnikova Ye.A., Kochiyeva Ye.Z., Mironova O.Yu.* Praktikum po sel'skokhozyaystvennoy biotekhnologii [Workshop on agricultural biotechnology]. M.: KolosS, 2006. 162 p.
3. *Kalashnikova Ye.A., Cherednichenko M.Yu., Karsunkina N.P., Khaliluyev M.R.* Laboratornyy praktikum po sel'skokhozyaystvennoy biotekhnologii [Laboratory Workshop on Agricultural Biotechnology]. 3rd edition, cor. and aug. M.: Izd-vo RGAU-MSKhA, 2014. 147 p.
4. *Abhyankar G.A., Chinchankar G.S.* Response of *Withania somnifera* Dunal leaf explants in vitro // *Phytomorphology*. 1996. No. 46. P. 249–252.
5. *Asthana R., Raina M.K.* Pharmacology of *Withania somnifera* (L.) Dunal – a review // *Indian Drugs*. 1989. No. 26. P. 199–205.
6. *Devi P.U., Sharada A.C., Solomon F.E., Kamath M.S.* In vivo growth inhibitory effect of *Withania somnifera* (*Ashwagandha*) on a transplantable mouse tumor, Sarcoma 180 // *Ind. Jour. Exp. Biol.* 1992. No. 30. P. 169–172.
7. *Furmanowa M., Gajdzis-Kuls D., Ruszkowska J.* et al. In vitro propagation of *Withania somnifera* and isolation of withanolides with immunosuppressive activity // *Planta Medica*. 2001. No. 67. P. 146–149.
8. *Govindraj B., Ramgopal R., Venugopal R.B.* et al. High frequency plant regeneration in *Ashwagandha* (*Withania somnifera* (L.) Dunal): an important medicinal plant // *Plant Cell Biotech. Mol. Biol.* 2003. Vol. 4 (1–2). P. 49–56.
9. *Hepper F.N.* Old world *Withania* (Solanaceae): a taxonomic review and key to the species // *Solanaceae III: taxonomy, chemistry, evolution*. Kew: Royal Botanic Gardens, 1991. P. 211–227.
10. *Jaffer H.J., Jawad A.L.M., Saber H.S., Al-Naib A.* Evaluation of antimicrobial activity of *Withania somnifera* extracts // *Fitoterapia*. 1988. No. 59. P. 497–500.
11. *Kirtikar K.R., Basu B.D.* *Indian Medicinal Plants* // Shiva Publishers. Dehradun, India. 1991. Vol. 3. P. 1783.
12. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* 1962. No. 15 (13). P. 473–497.
13. *Panwar J., Tarafdar J.C.* Distribution of three endangered medicinal plant species and their colonization with arbuscular mycorrhizal fungi // *J. Arid Environ.* 2006. No. 65. P. 337–350.
14. *Sharma R.* *Agro-Techniques of Medicinal Plants*. New Delhi: Daya Publishing House, 2004. P. 31–33.
15. *Singh S., Kumar S.* *Withania somnifera*: The Indian Ginseng *Ashwagandha*. Lucknow: Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants, 1998. 293 p.
16. *Warrier P.K., Nambiar V.P.K., Ramankutty C.* *Indian Medicinal Plants: A Compendium of 500 species* // Orient Longman. Hyderabad, India. 1996. Vol. 5. P. 409.

**Алрашиди Ашраф Айял** – асп. кафедры генетики, биотехнологии, селекции и семеноводства РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, г. Москва,



ул. Тимирязевская, 49; тел.: (499) 976-12-72; e-mail: ahmad.aa.2013@mail.ru).

**Мухамед Ахмед Эль Сайед** – д. б. н., кафедра овощеводства Университета Танта, Египет (e-mail: ahmad.aa.2013@mail.ru).

**Павликов Роман Евгеньевич** – студент магистратуры по направлению «Агрономия», магистерская программа «Фитотехнологии и биопродукционные системы» РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, ул. Тимирязевская, 49; e-mail: pavlikov.r.e.93@gmail.com).

**Ashraf Ayyal Alrashedi** – Postgraduate student of the Department of Genetics, Biotechnology, Plant Breeding and Seed Production, Russian Timiryazev State Agrarian University (127550, Moscow, Timiryazevskaya str., 49; phone.: +7 (499) 976-12-72; e-mail: ahmad.aa.2013@mail.ru).

**Ahmed El Sayed Mohamed** – DSc (Bio), Department of Horticulture, Tanta University, Egypt (e-mail: ahmad.aa.2013@mail.ru).

**Roman Ye. Pavlikov** – MSc student of the Department of Plant Physiology, Russian Timiryazev State Agrarian University (127550, Moscow, Timiryazevskaya str., 49; e-mail: pavlikov.r.e.93@gmail.com).