

МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ  
НАПЕРСТЯНКИ ПУРПУРНОЙ (*DIGITALIS PURPUREA* L.)  
И АДАПТАЦИЯ РЕГЕНЕРАНТОВ МЕТОДОМ ГИДРОПОНИКИ

П.Н. МАКАРОВ<sup>1</sup>, С.С. МАКАРОВ<sup>2</sup>, Т.А. МАКАРОВА<sup>1</sup>,  
З.А. САМОЙЛЕНКО<sup>1</sup>, Н.М. ГУЛАКОВА<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Сургутский государственный университет

<sup>2</sup>Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева)

В статье представлены результаты разработки технологии микроклонального размножения наперстянки *Digitalis purpurea* L. с адаптацией растений в гидропонных установках системы периодического подтопления. Показано, что для культивирования растений *in vitro* с высокой степенью эффективности можно использовать питательные среды MS и WPM с полным и уменьшенным содержанием минеральных солей, дополненных цитокининами 6-БАП, 2-іР и ауксинами ИУК, ИМК в различных концентрациях. Интенсивная пролиферация побегов и ризогенез растений в культуре *in vitro* происходят на питательных средах MS и WPM уменьшенного вдвое содержания минеральных солей, в составе фитогормонов 6-БАП 0,5 мг/л и 2-іР 0,3 мг/л. На питательной среде MS полного состава минеральных солей с 6-БАП 0,5 мг/л наблюдается высокая частота образования каллуса. Применение гидропонных систем на этапе адаптации к условиям *ex vitro* обеспечивает высокую приживаемость растений. В ходе исследований выявлены анатомо-морфологические особенности растений-регенерантов в условиях *in vitro* и *ex vitro*.

**Ключевые слова:** наперстянка пурпурная, *Digitalis purpurea*, *in vitro*, *ex vitro*, микроклональное размножение, гидропоника, фитогормоны, анатомия растений.

### Введение

Наперстянка пурпурная, или пурпуровая, или красная (*Digitalis purpurea* L., семейство Норичниковые (*Scrophulariaceae*)), – двулетнее травянистое растение, широко используемое в современной фармакотерапии, садоводстве и флористике [11]. Как лекарственное растение, наперстянка (*Digitalis sp.*) является незаменимым источником важных специфических биологически активных веществ [7]. В листьях *D. purpurea* содержится более 60 различных гликозидов сердечной группы (пурпуреагликозиды А и В, дигитоксин, гитоксин, гиталоксин, гиторин, дигиталеин, дигиталин, дигипрозид и др.). Препараты, созданные на основе сердечных гликозидов, обладают кардиотонической, антиаритмической, антивирусной и противоопухолевой активностью [6, 10, 21, 29]. В надземной части растений обнаружены и другие биологически активные вещества: стероидные сапонины (дигитонин, гитонин, тигонин), флавоноиды (лютеолин, дигитолитеин), ряд органических кислот, холин и другие соединения, обуславливающие практическую значимость и широкое применение данного растения в медицине [7].

На сегодняшний день около 1/3 всех лекарственных субстанций имеют растительное происхождение. При этом промышленное получение ряда соединений (сердечных гликозидов, флавоноидов, кумаринов, эфирных масел) достигается только путем извлечения их из растительного сырья [21, 26]. На фоне острого дефицита природного лекарственного сырья наперстянки (*Digitalis sp.*) перспективным в качестве источника биологически активных веществ становится использование культуры клеток, тканей и органов растений. Методами клеточной биотехнологии в каллусных культурах клеток *Digitalis lanata* и *D. purpurea* обнаружены прогестерон, изофукостерин, 24-метилениклоартенол, стероидные гликозиды (производные гитогенина и тигогенина), антрахиноны и фенилэтаноиды [25, 27].

В настоящее время исследования в области культуры клеток и тканей растений направлены на изучение условий культивирования *in vitro*, установление их влияния на повышение продуктивности клеточной культуры *D. purpurea* [20] и получение каллусных и суспензионных культур клеток *D. purpurea* с высокой пролиферативной активностью, на оптимизацию условий культивирования *in vitro* данных культур для получения эффективного прироста массы и оценки способности к биосинтезу гликозидов дедифференцированных клеток эксплантатов растения [11, 31]. Проводятся разработки в области микроклонального размножения представителей рода *Digitalis L.*

Л.Г. Бердичевец с соавт. (2008) изучено влияние фитогормонов на рост и развитие растений в условиях *in vitro* [2]. Показано влияние питательной среды MS, дополненной цитокинином 6-БАП в концентрации 1–6 мг/л, на побегообразование *D. purpurea* и питательной среды В5 с ауксином  $\alpha$ -НУК в концентрации 0,1 мг/л на степень укоренения растений *in vitro*. Индийскими учеными изучено влияние абиотических компонентов и регуляторов роста растений (прогестерона, холестерина, сквалена, салициловой кислоты, KCl, сорбита и др.) на накопление важных для медицины кардиотонических гликозидов дигитоксина и дигоксина в культурах побегов *D. purpurea* – усиливается накопление в 2,2–11,9 раза [30]. В исследованиях Nartop и Altan (2021) показано увеличение биомассы и количества образовавшихся побегов *D. purpurea* в культуре *in vitro* при использовании биосинтетических наночастиц серебра разной концентрации. При этом количество побегов растений возрастает до 2,25 раза по сравнению с контролем (среда WPM). Выявлена оптимальная концентрация наночастиц серебра для роста микроклонов наперстянки, составляющая 2 мг/л, а скорость накопления биомассы увеличивается в 2,35 раза для сырой массы и в 2,4 раза – для сухой биомассы [28].

В российской и зарубежной литературе имеются сведения о состоянии растений-регенерантов, выращенных в условиях *in vitro* [10, 18, 19, 24]. Авторами отмечено, что у растений в условиях *in vitro* в отличие от интактных растений часто наблюдается ряд анатомо-морфологических изменений, снижающих свойства регенерантов. Наблюдается уменьшение слоев клеток в паренхиме листа, в порах которой скапливается большое количество воздуха [18]. Высокая влажность воздуха в сосуде, а также отсутствие воздействия ультрафиолетовой радиации *in vitro* приводят к уменьшению образования кутикулярного воска на листьях. У растений *in vitro* развиваются нефункциональные устьица, которые не закрываются под воздействием целого ряда специфических факторов [24]. Корни, сформировавшиеся в условиях *in vitro*, не имеют корневых волосков, проводящая система слабо развита, клетки сильно увеличены [19]. Многочисленные сведения о состоянии растений-регенерантов, выращенных в условиях *in vitro* [10, 18, 19, 24], носят обобщенный характер и не представлены для культуры *Digitalis sp.*

В источниках научной литературы содержится обсуждение проблемы адаптации растений к нестерильным условиям. Очевидно, что растения *ex vitro* максимально уязвимы по отношению к факторам внешней среды, особенно к изменениям температуры, влажности, интенсивности света, а также к наличию патогенных микроорганизмов [5]. По мнению Н.А. Вечерниной и др. (2009), в состоянии стресса останавливается рост растений, резко уменьшается активность корневой системы, снижается интенсивность фотосинтеза. Для успешной приживаемости растений необходимо создавать оптимальные сочетания факторов для роста и развития не только надземной части регенеранта, но и его корневой системы. В момент пересадки растения подвергаются прежде всего водному стрессу, что приводит к обезвоживанию тканей и разрушению мембран. Особую чувствительность растения-регенеранты проявляют к низкой влажности воздуха сразу после их удаления из сосудов для культивирования, что связано с недостатком воскового налета на листьях и стебле, нефункционирующими устьицами, сокращением поглощения воды корневой системой и сильной транспирацией [5, 23].

Несмотря на то, что в литературе имеются сведения о микроклональном размножении наперстянки (*Digitalis sp.*) [2, 30], основаны они на использовании классических способов адаптации растений к нестерильным условиям, которым присущи вышеперечисленные стрессовые факторы, поэтому данные технологии нуждаются в совершенствовании.

В настоящее время для адаптации растений-регенерантов княженики арктической, клюквы крупноплодной, эстрагона, курительского чая апробирован гидропонный метод выращивания и получены положительные результаты по приживаемости и продуктивности растений [14–17]. В литературе подобная технология для культуры наперстянки пурпурной не встречается.

**Цель исследований:** разработка технологии микроклонального размножения растений наперстянки пурпурной (*Digitalis purpurea*) с элементами гидропоники на этапе адаптации растений к нестерильным условиям и оценка влияния условий культивирования растений на их анатомо-морфологические признаки в культуре *in vitro* и *ex vitro*.

## Материал и методы исследований

Объектом исследований являлась наперстянка пурпурная *Digitalis purpurea* L., сорт 'Карлик красный', – травянистое прямостоячее растение высотой 35 см. В первый год жизни оно образует розетку листьев, на второй год вступает в фазу цветения и плодоношения; в условиях г. Сургута цветет с июля по август. Цветки – крупные колокольчатые, собранные в густую многоцветковую кисть. Растение светолюбивое, морозо- и засухоустойчивое.

Для введения в культуру *in vitro* материнские растения *Digitalis purpurea* выращивали из семян методом гидропоники [13]. Микроклональное размножение растений осуществляли по методике Р.Г. Бутенко, Ф.Л. Калинина и др. [4, 9]. При введении в культуру *in vitro* наперстянки пурпурной в качестве инициальных эксплантов использовали удлиненную часть главного побега длиной 1,5 см с пазушными почками. Для поверхностной стерилизации эксплантов применяли 0,1%-ный раствор сулемы ( $\text{HgCl}_2$ ) в экспозиции 5 мин с последующим 5-кратным промыванием в стерильной дистиллированной воде. Экспланты культивировали на агаризованной модифицированной питательной среде Мурасиге и Скуга (MS) с полным и половинным набором минеральных солей, дополненной 6-бензиламинопурином (6-БАП) (Acros Organics, Россия) в концентрации 0,5 мг/л, и модифицированной питательной среде

Woody plant medium (WPM) с полным и половинным набором минеральных солей, дополненной цитокинином 2-изопентиладенин (2-*iP*) (Китай) в концентрации 0,3 мг/л, на этапе укоренения – ауксинами индолилуксусной кислотой (ИУК) (Биолот, Россия) и индолил-3-масляной кислотой (ИМК) (Hebei Hontai Biotech Co., Китай) по 0,1 мг/л.

На всех этапах культивирования *in vitro* экспланты выращивали в условиях световой комнаты, где поддерживали температуру +24°C, 16-часовой фотопериод и освещение лампами с белыми и красными светодиодами, цветовая температура – 4000 К, интенсивность освещения PPFD75 мкмоль/с/м<sup>2</sup>. Состояние растений-регенерантов оценивали через 40 дней после черенкования по следующим признакам: высота растения, см; ширина и длина листьев, см; качество корней. Качество корней оценивали по 3-балльной шкале: 1 балл – слаборазвитая корневая система, имеющая один основной корень не более 20 мм или 2–3 более коротких, боковых корней нет; 2 балла – среднеразвитая корневая система, основных корней 3–4, длиной 20–50 мм, или один, но с хорошо развитыми боковыми и всасывающими корнями; 3 балла – хорошо развитая корневая система, основных корней 5 и более, длиной 20–50 мм, часто с хорошо развитыми боковыми и всасывающими корнями [12].

Частоту каллусообразования определяли по количеству эксплантов, давших каллус, от общего числа эксплантированных; интенсивность роста каллуса оценивали по шкале: «+» – низкая интенсивность роста; «++» – средняя интенсивность роста; «+++» – высокая интенсивность роста [3]. Для решения проблемы адаптации и повышения процента приживаемости растений-регенерантов в нестерильных условиях были использованы приемы беспочвенного выращивания растений [14–17]. Анатомо-морфологические признаки растений изучали микроскопическим методом [1] при помощи биологического стереоскопического микроскопа МБС-10, стереомикроскопа ZEISS Stermi 305 и микроскопа Zeiss Primo. Определение общей и рабочей адсорбирующей поверхности корней рассчитывали методом Д.А. Сабинина и И.И. Колосова [22].

Материнские растения наперстянки *D. purpurea* выращивали в гидропонных установках до 45-дневного возраста (рис. 1). Для этого в горшочки с минераловатным субстратом размером 60×60 мм осуществляли посев в количестве 10 шт/горшочек на глубину 0,1–0,3 см. Семена проращивали в темноте при температуре воздуха +23...+24°C, относительной влажности воздуха 90% в течение 9–11 дней. Затем растения выращивали в культивационном помещении, размещая на поддоны многоярусной гидропонной установки системы периодического подтопления. Для питания растений использовали полностью растворимое комплексное удобрение с микроэлементами Yara Fericare Hydro (NPK 6:14:30) (Yara International, Норвегия) и кальциевую селитру (Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) (Yara International, Норвегия). Электропроводность питательного раствора варьировала в пределах 0,8–1,8 мСм/см.

Первые 10 дней культивации растений в гидропонной установке электропроводность питательного раствора составляла 0,8 мСм/см, далее, в течение следующих 10 дней, концентрацию солей увеличивали до 1,3 мСм/см, а после 20 сут. культивации – до 1,8 мСм/см. Уровень кислотности (рН) готового питательного раствора поддерживали в пределах 5,5–6,2. На протяжении всего периода выращивания растений в гидропонной установке поддерживали температуру воздуха +22...+25°C, температуру раствора – +20°C, влажность воздуха – 55–65%. Освещение производилось белыми светодиодными лампами с параметрами: световой поток – 8000 лм; цветовая температура – 4000 К; PPFD – 165 мкмоль/с/м<sup>2</sup>; 16-часовой световой режим.

Статистическую обработку данных проводили с использованием Microsoft Office Excel 2016.



**Рис. 1.** Выращивание материнских растений *D. purpurea*:

*a* – семена в семенном отделении; *б* – растения в основном культивационном помещении

### Результаты и их обсуждение

На этапе введения в культуру *in vitro* приживаемость эксплантов *D. purpurea* составила 92%. Рост и развитие микропобегов на этапе «собственно микроразмножение» зависели от содержания минеральных солей, гормонального состава питательной среды и объема культурального сосуда.

Экспланты наперстки выращивали на модифицированных питательных средах MS и WPM в культуральных сосудах: пробирках диаметром 20 мм и колбах объемом 250 мл (рис. 2). В отличие от колб рост растений *D. purpurea* в пробирках при выращивании на средах одинакового состава сопровождался образованием каллуса, максимальной высотой растений и снижением количества побегов.

Через 6 недель культивирования на питательной среде MS полного состава минеральных солей, дополненной 6-БАП (0,5 мг/л), в колбах растения *D. purpurea* активно развивались, в 100% случаев наблюдался ризогенез. При этом качество корней оценивалось в 3 балла, тогда как в пробирках на среде того же состава корнеобразование не наблюдалось, рост растений сопровождался высокой частотой и интенсивностью роста каллуса (табл. 1).

В зависимости от объема сосуда менялись биометрические показатели растений. Максимальная высота растений-регенерантов, выращенных в пробирках, была в 4 раза выше, чем в колбах (17,3 и 4,4 см соответственно), при снижении числа побегов в 2 раза в пробирках (рис. 3). Существенных различий размерах листьев не наблюдалось.

По сравнению с полным набором минеральных солей среда  $\frac{1}{2}$  MS с 6-БАП в концентрации 0,5 мг/л способствовала увеличению количества побегов с 3 до 5 шт. и развитию корневой системы (3 балла), но в 1,5 раза снижалась высота побегов (рис. 4а). При высокой частоте каллусообразования интенсивность развития каллуса была низкой (табл. 1).

Среда WPM полного и уменьшенного в 2 раза содержания минеральных солей по морфометрическим показателям роста и развития регенерантов незначительно уступала среде MS, однако способствовала снижению образования каллуса, что важно в процессе микрклонального размножения. В колбах высота побегов растений-регенерантов на среде WPM с 2-іР 0,3 мг/л составила  $4,87 \pm 0,23$  см, в пробирках –  $6,6 \pm 0,13$  см; количество побегов –  $10,44 \pm 0,41$  и  $2 \pm 0,15$  шт/растение соответственно; качество корней – 3 и 2 балла соответственно. На среде  $\frac{1}{2}$  WPM с 2-іР 0,3 мг/л количество побегов достигало  $11,56 \pm 0,52$  шт/растение, изменений остальных показателей в процессе роста растений не выявлено.

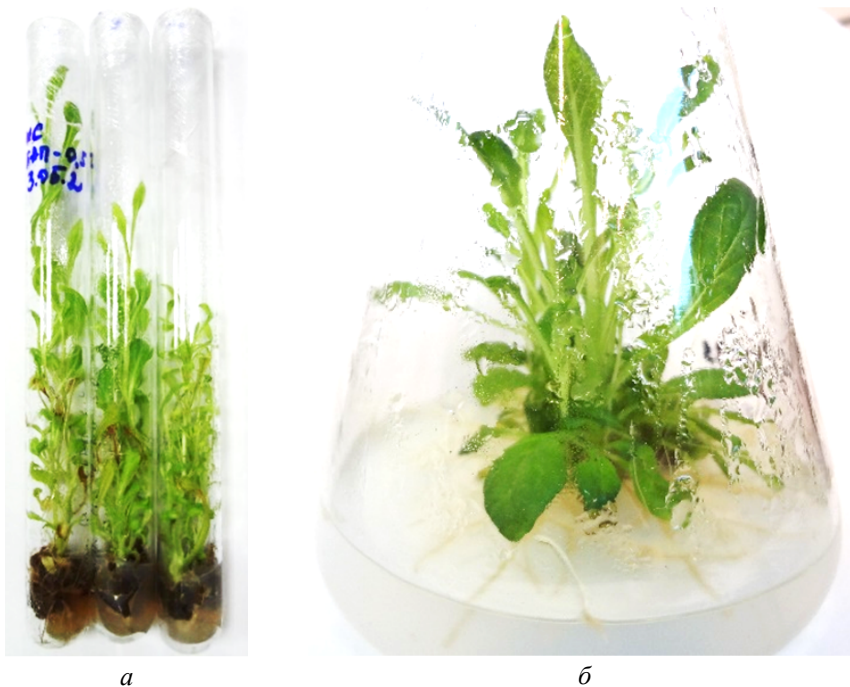


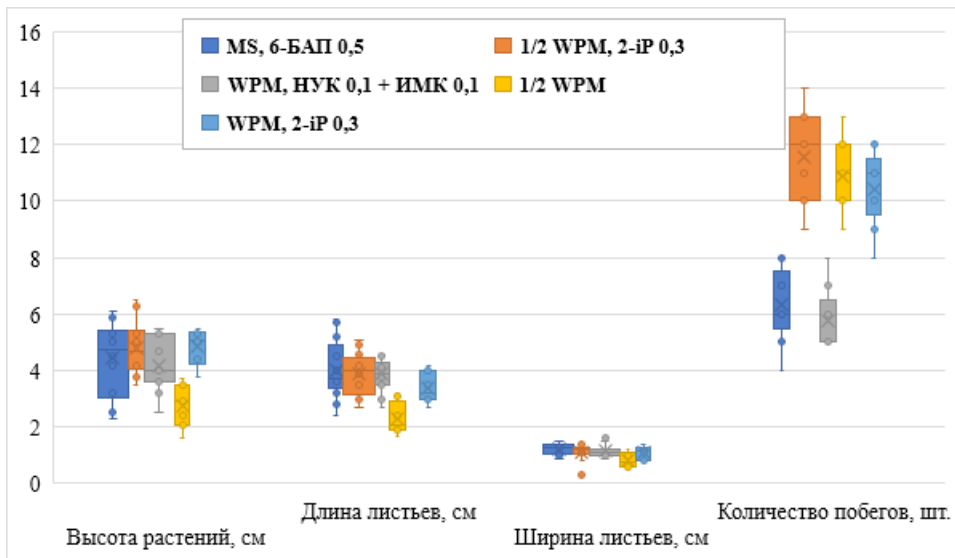
Рис. 2. Растения-регенеранты *D. purpurea* на среде MS с 6-БАП 0,5 мг/л:  
а – в пробирке; б – в колбе

Таблица 1

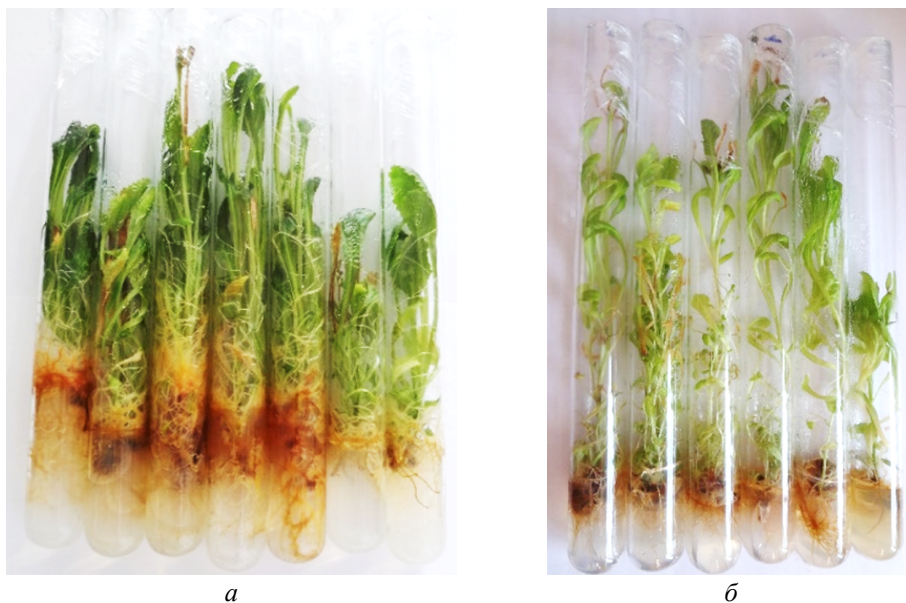
**Развитие *D. purpurea in vitro* в зависимости от состава питательной среды  
(в пробирках)**

Питательная среда и концентрация фитогормонов, мг/л	Кол-во побегов, шт.	Высота побегов, см	Ширина листа, см	Длина листа, см	Частота каллусообразования, %	Интенсивность роста каллуса
MS + 6-БАП (0,5)	3±0,11	17,3±0,14	1,0±0,01	4,5±0,12	100	+++
½ MS + 6-БАП (0,5)	5±0,21	9,0±0,12	0,9±0,02	3,8±0,16	100	+
WPM + 2-иР (0,3)	2±0,15	6,6±0,13	0,4±0,02	2,0±0,11	–	–
½ WPM + 2-иР (0,3)	5±0,13	7,0±0,20	0,4±0,01	1,8±0,14	50	++
WPM + ИУК (0,1), ИМК (0,1)	2,4±0,10	12,1±0,21	0,8±0,05	1,3±0,09	40	+

Присутствие в питательной среде WPM ауксинов ИУК и ИМК по 0,1 мг/л привело к снижению числа побегов растений-регенерантов в пробирках (до 2,4±0,10 шт.), уменьшению ширины и длины листьев (0,8±0,05 и 1,3±0,09 см) и удлинению междоузлий растений. Корни (в среднем 10 шт./растение длиной 4,5 см) в отличие от сред без ауксинов формировались преимущественно в базальной части микропобегов (рис. 4б). В колбах на среде ½ WPM с ИУК и ИМК по сравнению с полным составом минеральных солей количество побегов увеличивалось в 2 раза, размер листьев – в 1,5–2 раза (рис. 3).



**Рис. 3.** Влияние состава питательной среды на биометрические показатели растений-регенерантов *D. purpurea* (в колбах)



**Рис. 4.** Рост растений *D. purpurea* на разных питательных средах:  
 а –  $\frac{1}{2}$  MS + 6-БАП (0,5 мг/л); б – WPM + ИУК (0,1 мг/л), ИМК (0,1 мг/л)

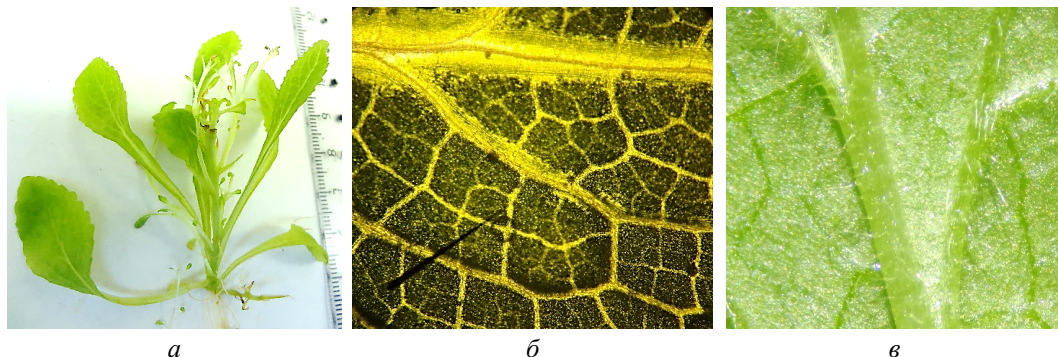
Установлено, что при выращивании растений качество и поглотительная деятельность корневой системы зависят от комплекса взаимодействующих факторов (температурного и водного режима, аэрации, концентрации и pH питательного раствора) [8]. В условиях *in vitro* активный рост корней у растений-регенерантов наблюдался на питательных средах MS и  $\frac{1}{2}$  MS, где в базальной части побега развивались 5–12 корней длиной 25–50 мм. Условия культивирования растений также способствовали формированию и появлению придаточных корней в узлах и междоузлиях побегов. Значительная часть всей поверхности корней растений-регенерантов

на питательных средах MS и  $\frac{1}{2}$  MS приходится на рабочую поглощающую поверхность и составляет 57,3 и 62,1% соответственно от общей адсорбирующей поверхности.

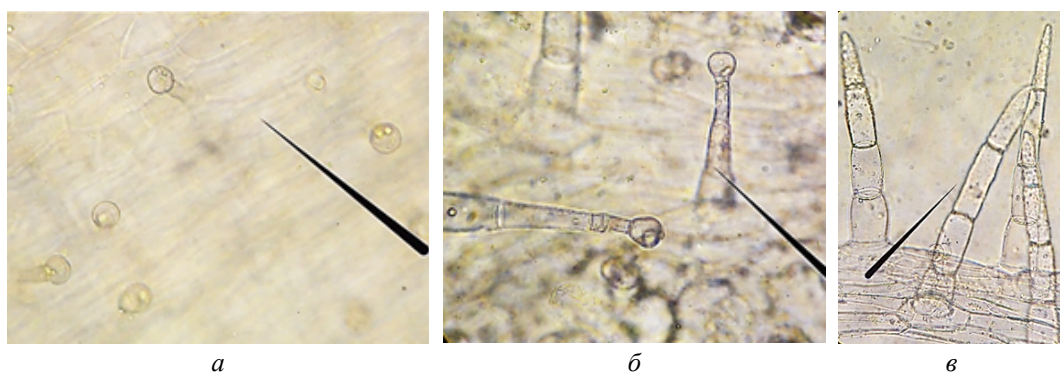
Для изучения анатомо-морфологических признаков наперстянки пурпурной использовали регенеранты, выращенные на среде MS с 6-БАП 0,5 мг/л. Отмечено, что как и у интактных растений, листья регенерантов имеют продолговато-яйцевидную-ланцетную форму с неравномерно-городчатым краем, длинными черешками (рис. 5а), сильно развитой срединной жилкой и сетчатым жилкованием (рис. 5б). С нижней стороны листа сильноопушенные (рис. 5в).

Волоски простые и головчатые: простые волоски 4-клеточные со слабобороздчатой кутикулой и тонкими стенками, головчатые волоски – с одноклеточной шаровидной головкой на длинной многоклеточной ножке (рис. 6).

На поверхности листьев растений-регенерантов видны клетки эпидермы с извилистыми стенками и многочисленными устьицами аномоцитного типа (рис. 7). Большое количество устьиц на поверхности листа свидетельствует о высокой интенсивности устьичной транспирации. В условиях *in vitro* устьица находятся в открытом положении (рис. 7а), при адаптации растений в условиях гидропоники функционирование устьиц восстанавливается (рис. 7б).



**Рис. 5.** Листья растений-регенерантов *D. purpurea*:  
 а – форма листовой пластинки; б – тип жилкования (увеличение  $\times 8$ );  
 в – опушение на нижней стороне листа (увеличение  $\times 16$ )



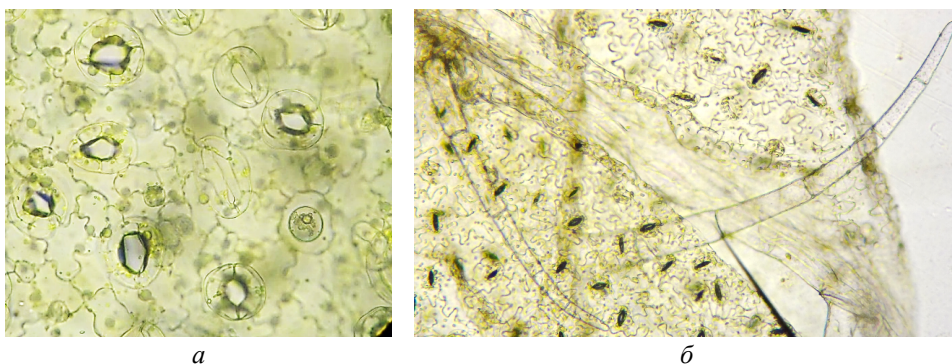
**Рис. 6.** Придатки эпидермы листа растений-регенерантов *D. purpurea*:  
 а – расположение головчатых волосков на поверхности эпидермы;  
 б – структура головчатого волоска; в – структура простого волоска  
 (увеличение  $40\times 10$ )



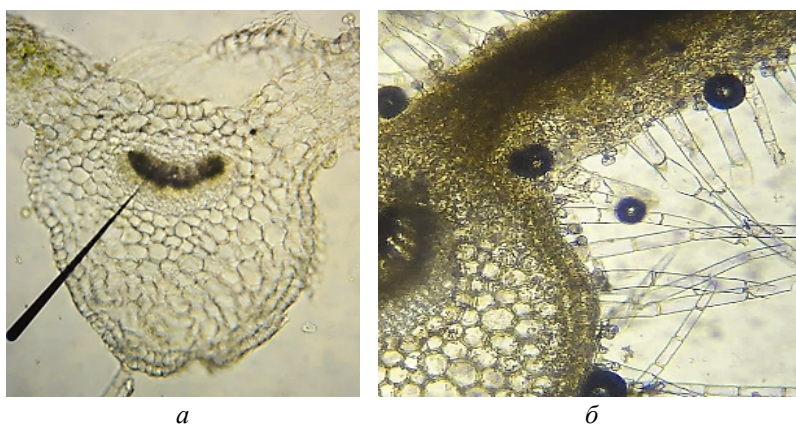
Поверхность листьев растений в условиях *in vitro* состоит из одного слоя эпидермальных клеток, кутикула и восковой налет отсутствуют (рис. 8а). Утолщение покровной ткани листа происходит в период адаптации растений (рис. 8б). Мезофилл листа независимо от условий выращивания растений (*in vitro*, *ex vitro*) – слабодифференцированный. В листьях формируется закрытый проводящий пучок коллатерального типа, при этом активное развитие флоэмы и ксилемы наблюдается в период адаптации растений. Поверхность листа покрыта волосками различного типа. В условиях гидропоники листья сильноопушенные (рис. 8б).

В стебле хорошо развита основная паренхима, выполняющая запасную и ассимиляционную функции (рис. 9). Анатомическая структура стебля меняется с возрастом растений: на ранних сроках развития большую часть вегетативного органа занимают паренхимные клетки основной ткани, слабо развиты ксилема и флоэма (рис. 9а); на поздних сроках в равной степени хорошо развиты основные и проводящие ткани (рис. 9б). На поверхности стебля образуется большое количество простых и железистых волосков.

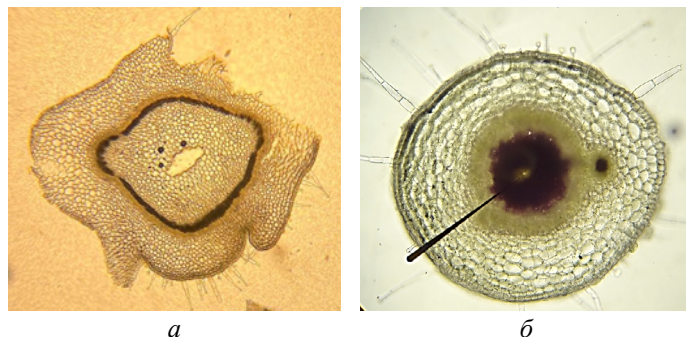
Корни растений-регенерантов тонкие, слабоветвящиеся (рис. 10а). Точка роста корня покрыта корневым чехликом. Эпиблема корня – с корневыми волосками. Формирование корневых волосков более интенсивно происходит на поверхности придаточных корней, возникающих на стебле растения, чем на корнях, отходящих от базальной части стебля (рис. 10б, 10в).



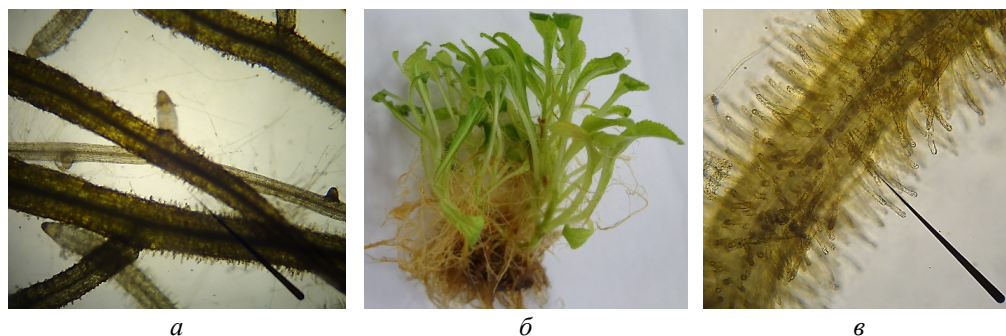
**Рис. 7.** Клетки эпидермы и структура устьиц растений-регенерантов *D. purpurea*: а – в условиях *in vitro*; б – в период адаптации (*ex vitro*) (увеличение 40×10)



**Рис. 8.** Структура листа растений-регенерантов *D. purpurea*: а – в условиях *in vitro*; б – на этапе адаптации (*ex vitro*) (увеличение 40×10)



**Рис. 9.** Структура стебля растений-регенерантов *D. purpurea* на разных сроках развития растений в условиях *in vitro*: *a* – через 5 недель; *б* – через 16 недель (увеличение 40×10)



**Рис. 10.** Корни растений-регенерантов *D. purpurea*: *a* – корневой чехлик в зоне деления (увеличение 10×10); *б* – придаточные корни на стебле растений; *в* – корневые волоски (увеличение 40×10)

Изменения, происходящие в структуре вегетативных органов (лист, стебель, корень) растений-регенерантов при выращивании в условиях *in vitro*, оказывают существенное влияние на состояние, рост и развитие растений в период адаптации их к условиям *ex vitro*.

Адаптацию растений-регенерантов проводили через 45–50 дней выращивания в условиях *in vitro*. Укоренившиеся растения вынимали из культуральных сосудов. Корни отмывали в дистиллированной воде от агара, стерилизовали в слабом растворе  $\text{KMnO}_4$ , затем обрабатывали препаратом «Корневин». Растения помещали в горшочки со стерильным керамзитом и ставили в емкость для рассады. В период адаптации растений-регенерантов поддерживали высокую влажность воздуха (80–90%), осуществляли регулярный полив раствором минеральных солей по  $\frac{1}{2}$  MS. Через 14 суток культивирования в рассадном помещении незараженные жизнеспособные растения переносили на поддон гидропонной установки основного отделения. В культивационном помещении растения находились в условиях, аналогичных условиям по выращиванию материнских растений.

На протяжении роста растений в контролируемых условиях гидропоники учитывали морфометрические показатели растений (рис. 11).

На 13-е сутки выращивания растений-регенерантов в гидропонике среднее количество листьев на 1 растение составило 13,2 шт., на 42-е сутки – 17,1 шт., на 64-е сутки – 19 шт. Средняя высота растений в учетные даты достигала 8,5; 14 и 21 см соответственно. На 64-е сутки культивирования растений длина и ширина листа в среднем составили 15 и 6 см соответственно. Приживаемость растений составила 95–100%.

Адаптированные к условиям *ex vitro* оздоровленные растения с хорошо развитой надземной частью и активно функционирующей корневой системой являются ценным посадочным материалом для высадки в открытый грунт. Они были высажены на территории Ботанического сада Сургутского государственного университета. В Ханты-Мансийском АО – Югре растения *D. purpurea* успешно зимуют и цветут на второй год жизни в соответствии с естественным циклом развития (рис. 12).

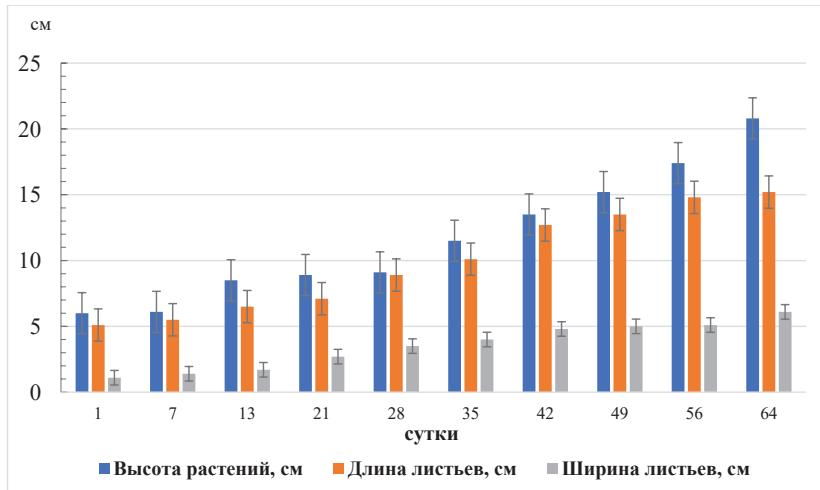


Рис. 11. Динамика роста адаптированных растений *D. Purpurea* в условиях *ex vitro*



Рис. 12. Развитие *D. purpurea* в открытом грунте: *а* – вегетирующие растения в 1-й год жизни; *б* – цветение растений на 2-й год жизни

### Выводы

Для интенсивной пролиферации побегов и ризогенеза наперстянки в культуре *in vitro* необходимо использовать питательные среды MS и WPM с уменьшенным в 2 раза содержанием минеральных солей, дополненных фитогормонами 6-БАП 0,5 мг/л и 2-iP 0,3 мг/л соответственно.

На этапе мультипликации микропобегов целесообразно использовать широкие культуральные сосуды, в которых создаются оптимальные условия, стимулирующие побего- и корнеобразование.

Культивирование эксплантов наперстянки на питательной среде MS с 6-БАП 0,5 мг/л полного состава минеральных солей сопровождается высокой частотой и интенсивностью каллусообразования.

Условия *in vitro* приводят к ослаблению защитных механизмов растений, снижению качества и поглощающей способности корневой системы, о чем свидетельствует анатомо-морфологическое строение растений-регенерантов (отсутствие кутина, воска, механических тканей, ветвления корней, слабое развитие элементов ксилемы и флоэмы).

Восстановление функциональной деятельности вегетативных органов и повышение устойчивости растений к условиям *ex vitro* становится возможным благодаря агробιοтехнологиям. Высокий уровень приживаемости растений-регенерантов (95–100%) на этапе адаптации к нестерильным условиям обеспечивает метод беспочвенного выращивания растений в малообъемных гидропонных установках.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Правительства Ханты-Мансийского АО – Югры: проект 2023–227–28 «Функциональные пищевые продукты и микроинкапсулированные ингредиенты на основе комплекса биологически активных соединений, выделенных из северных растений, выращенных в гидропонике с применением технологии микрклонального размножения (ЮграбиоФарм)» и программы Западно-Сибирского межрегионального научно-образовательного центра мирового уровня: проект «Технология выращивания и извлечения биологически активных соединений северных ягодных культур и лекарственных трав (ЮграБиоФарм)», соглашение от 8 ноября 2023 г. № 4-ЦС.*

### Библиографический список

1. Барыкина Р.П. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы. – М.: Изд-во МГУ, 2004. – 312 с.
2. Бердичевец Л.Г., Бердичевец И.Н., Малюш М.К., Фоменко Т.И. Морфогенез и микрклональное размножение в культуре *in vitro* представителей рода *Digitalis* L. // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология. – М.: ИД ФБК-ПРЕСС, 2008. – С. 44–45.
3. Бугара И.А., Мальцева О.А. Получение каллусных культур *Mentha piperita* L. и их цитологическая характеристика при выращивании на питательных средах с различной концентрацией селена // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2011. – Т. 24 (63), № 4. – С. 17–23.
4. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М.: Наука, 1964. – 272 с.
5. Вечернина Н.А. Биотехнология растений: учеб. пособие. – Барнаул: Изд-во Алтайского университета, 2009. – 224 с.
6. Гаммерман А.Ф., Кадаев Г.Н., Яценко-Хмелевский А.А. Лекарственные растения: справочное пособие. – М.: Высшая школа, 1983. – 400 с.
7. Георгиевский В.П., Комиссаренко Н.Ф., Дмитрук С.Е. Биологически активные вещества лекарственных растений. – Новосибирск: Наука, Сибирское отделение, 1990. – 333 с.
8. Ильина Н.А., Сергеева И.В., Перетятко А.И. Физиология и биохимия растений: учеб. пособие. – Саратов, 2013. – 335 с.
9. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений: монография. – Киев: Наукова думка, 1980. – 320 с.
10. Коваленко В.Н. О биологической активности некоторых видов наперстянки // Фармакология и токсикология. – 1954. – № 3. – С. 18–22.
11. Лешина Л.Г., Булко О.В. Культивирование *in vitro*, ростовые параметры и оценка способности к биосинтезу гликозидов культуры клеток *Digitalis purpurea* L. // Физиология и биохимия культурных растений. – 2011. – Т. 43, № 2. – С. 164–170.

12. Маркова М.Г., Сомова Е.Н., Потапова С.А. Влияние регуляторов роста на размножение перспективных сортов малины в культуре *in vitro* // Вестник Донского государственного аграрного университета. – 2015. – № 2–1 (16). – С. 104–111.
13. Макаров П.Н., Макарова Т.А., Самойленко З.А., Гулакова Н.М., Кравченко И.В. Оценка продуктивности и качества эстрагона и тимьяна обыкновенного при выращивании в светокультуре // Вестник Казанского государственного аграрного университета. – 2021. – № 4 (64). – С. 24–29. DOI: 10.12737/2073-0462-2022-24-29.
14. Макаров С.С., Казиева А.Ю., Макарова Т.А., Самойленко З.А., Макаров П.Н., Гулакова Н.М. Микрклональное размножение курильского чая кустарникового (*Dasiphora fruticosa* (L.) Rydb.) с элементами гидропоники // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2023. – № 2 (100). – С. 64–71. DOI: 10.37670/2073-0853-2023-100-2-64-71.
15. Макаров С.С., Макарова Т.А., Самойленко З.А., Макаров П.Н., Гулакова Н.М., Кузнецова И.Б. Особенности размножения эстрагона (*Artemisia dracunculus* L.) в культуре *in vitro* и *ex vitro* // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2023. – № 3 (101). – С. 77–83. DOI: 10.37670/2073-0853-2023-101-3-77-83.
16. Макаров С.С., Самойленко З.А., Макарова Т.А., Кузнецова И.Б., Чудецкий А.И., Кульчицкий А.Н. Адаптация клюквы крупноплодной (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) к условиям *ex vitro* с применением гидропонного метода // Вестник КрасГАУ. – 2023. – № 11 (101). – С. 104–112. DOI: 10.36718/1819-4036-2023-11-104-112.
17. Макаров С.С., Упадышев М.Т., Родин С.А., Макарова Т.А., Самойленко З.А., Кузнецова И.Б. Адаптация растений-регенерантов княженики арктической к условиям *ex vitro* с применением гидропоники // Сибирский лесной журнал. – 2023. – № 4. – С. 75–82. DOI: 10.15372/SJFS20230408.
18. Никонович Т.В., Левый А.В., Французенок В.В. Влияние спектрального состава света на рост и развитие растений-регенерантов винограда в период адаптации к условиям *in vitro* // Вестник БГСХА. – 2012. – № 2. – С. 70–75.
19. Поляков С.А., Расторгуев С.П., Верзилин А.В. Адаптация растений регенерантов земляники к неблагоприятным условиям // Повышение эффективности садоводства в современных условиях. – Мичуринск-Наукоград РФ, 2003. – Т. 2 – С. 335–339.
20. Смольникова Я.В. Культивирование *Digitalis purpurea* L. в условиях *in vitro* и получение сердечных гликозидов на ее основе: Автореф. дис. ... канд. техн. наук. – Красноярск, 2012. – 21 с.
21. Томилова С.В., Китаилов А.В., Носов А.М. Сердечные гликозиды: распространение, свойства и специфика образования в культурах клеток и органов растений *in vitro* // Физиология растений. – 2022. – Т. 69, № 3. – С. 227–245.
22. Третьяков Н.Н., Карнаухова Т.В., Паничкин Л.А. Практикум по физиологии растений. – М.: Агропромиздат, 1990. – 271 с.
23. Шакина Т.Н. Опыт адаптации растений-регенерантов к условиям *ex vitro* некоторых декоративных и плодово-ягодных культур в Учебно-научном центре «Ботанический сад» Саратовского государственного университета им. Н.Г. Чернышевского // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии. – 2020. – Т. 19, № 1. – С. 315–320. DOI: 10.14258/pbssm.2020063.
24. Drainer E. Acclimatization of Aseptically cultured Apple Plants to Low Relative Humidity // J. Am. Soc. Hort. Sci. – 1981. – Vol. 106, № 4. – Pp. 515–518.
25. Furuya T., Kojima H., Katsuta T. 3-methylpurpurin and other anthraquinones from callus tissue of *Digitalis lanata* // Phytochem. – 1972. – Vol. 11. – P. 1073. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)88455-1
26. Lobach E.Y., Tokhiriyon B., Poznyakovskiy V.M., Makarov S.S., Khanbabayeva O.E., Takaeva M.A. New Phytocomplex for Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Development

and Clinical Evidence of Anti-inflammatory Effect // Journal of Advanced Pharmacy Education & Research. – 2023. – Vol. 13, Iss. 3. – Pp. 102–108. DOI: <https://doi.org/10.51847/T15LnYDudZ>

27. Matsumoto M., Koga S., Shoyama Y., Nishioka I. Phenolic glycoside composition of leaves and callus cultures of *Digitalis purpurea* // Phytochem. – 1987. – Vol. 26. – P. 3225. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)82474-7.

28. Nartop P., Altan A.D., Titrek A. Modeling of *In Vitro* biomass production of *Digitalis purpurea* under the effects of biosynthetic silver nanoparticles // Iran J. Sci. Technol. Trans. Sci. – 2021. – Vol. 45. – Pp. 775–783. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40995-021-01105-4>

29. Pastor N., Azrak S.S. et al. Digitoxin inhibits the growth of cancer cell lines at concentrations commonly found in cardiac patients // J. Nat. Prod. – 2005. – Vol. 68, № 11. – Pp. 1642–1645.

30. Patil G., Mahendra A., Kirti N., Sayantan P., Vijay B., Polavarapu K., Nikam Td. *In vitro* propagation and production of cardiogenic glycosides in shoot cultures of *Digitalis purpurea* L. by elicitation and precursor feeding // Applied microbiology and biotechnology. – 2012. – Vol. 97. DOI: 10.1007/s00253-012-4489-y.

31. Pérez-Alonso N., Wilken D., Gerth A. et al. Cardiogenic glycosides from biomass of *Digitalis purpurea* L. cultured in temporary immersion systems // Plant Cell Tiss. Organ. Cult. – 2009. – Vol. 99. – Pp. 151–156. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9587-x>

## MICROCLONAL REPRODUCTION OF *DIGITALIS PURPUREA* L. AND ADAPTATION OF REGENERANTS IN HYDROPONICS

P.N. MAKAROV<sup>1</sup>, S.S. MAKAROV<sup>2</sup>, T.A. MAKAROVA<sup>1</sup>,  
Z.A. SAMOYLENKO<sup>1</sup>, N.M. GULAKOVA<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Surgut State University;

<sup>2</sup>Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy)

*The paper presents the results of the development of the microclonal propagation technology of *Digitalis purpurea* L. with plant adaptation in hydroponic Ebb and Flow Systems. It has been found that MS and WPM growth media with a full and reduced content of mineral salts supplemented with 6-BAP cytokinines, 2-iP and auxins of indoleacetic acid, isobutyric acid in various concentrations can be highly efficient for *in vitro* cultivation of the plants. Intensive shoot proliferation and rhizogenesis of plants *in vitro* culture is observed on MS and WPM growth media with a two-fold reduced content of mineral salts, with 6-BAP phytohormones 0.5 mg/L and 2-iP 0.3 mg/L. A high frequency of callus formation was observed on MS growth medium with full mineral salt composition containing 6-BAP 0.5 mg/L. The use of hydroponic systems at the stage of adaptation to *ex vitro* conditions ensures high survival of plants. During the work, anatomical and morphological features of regenerating plants under *in vitro* and *ex vitro* conditions were studied.*

**Keywords:** *Digitalis purpurea*, *in vitro*, *ex vitro*, microclonal propagation, hydroponics, phytohormones, plant anatomy.

### References

1. Barykina R.P. *Handbook of botanical microtechnics. Fundamentals and methods.* Moscow, Russia: Lomonosov Moscow State University – Publishing House, 2004:312. (In Russ.)

1. Berdichevets L.G., Berdichevets I.N., Malyush M.K., Fomenko T.I. Morphogenesis and microclonal reproduction in *in vitro* culture of representatives of the genus *Digitalis* L.

In: *Biology of plant cells in vitro and biotechnology*. Moscow, Russia: FBK-PRESS, 2008:44–45. (In Russ.)

2. Bugara I.A., Maltseva O.A. Obtaining of *Mentha piperita* L. callus cultures and their cytological characteristics when grown on nutrient media with different concentrations of selenium. *Uchenye zapiski Tavricheskogo natsional'nogo universiteta im. V.I. Vernadskogo. Seriya "Biologiya, khimiya"*. 2011;24(63)(4):17–23. (In Russ.)

3. Butenko R.G. *Culture of isolated tissues and physiology of plant morphogenesis*. Moscow, USSR: Nauka, 1964:272. (In Russ.)

4. Vechernina N.A. *Plant biotechnology*. Barnaul, Russia: Altay State University, 2009:224. (In Russ.)

5. Hammerman A.F., Kadaev G.N., Yatsenko-Khmelevskiy A.A. *Medicinal plants*. Moscow, USSR: Vysshaya shkola, 1983:400. (In Russ.)

6. Georgievskiy V.P., Komissarenko N.F., Dmitruk S.E. *Biologically active substances of medicinal plants*. Novosibirsk, USSR: Nauka, Sibirskoe otdelenie, 1990:333. (In Russ.)

7. Il'ina N.A., Sergeeva I.V., Peretyatko A.I. *Physiology and biochemistry of plants*. Saratov, Russia, 2013:335. (In Russ.)

8. Kalinin F.L., Sarnatskaya V.V., Polishchuk V.E. *Methods of tissue culture in plant physiology and biochemistry*. Kiev, USSR: Naukova dumka, 1980:320. (In Russ.)

9. Kovalenko V.N. On the biological activity of some species of digitalis. *Farmakologiya i toksikologiya*. 1954;3:18–22. (In Russ.)

10. Leshina L.G., Bulko O.V. Digitalis purpurea L. cells culture: cultivation in vitro, growth parameters and determination of glycosides biosynthetic ability. *Fiziologiya i biokhimiya kul'turnykh rasteniy*. 2011;43(2):164–170. (In Russ.)

11. Markova M.G., Somova E.N., Potapova S.A. influence of growthregulators thereproduction ofpromising varietiesof raspberries in culture in vitro. *Vestnik Donskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*. 2015;2–1(16):104–111. (In Russ.)

12. Makarov P.N., Makarova T.A., Samoilenko Z.A., Gulakova N.M., Kravchenko I.V. Productivity and quality evaluation of tarragon and thyme grown under artificial light. *Vestnik of the Kazan State Agrarian University*. 2021;4(64):24–29. (In Russ.) <https://doi.org/10.12737/2073-0462-2022-24-29>

13. Makarov S.S., Kazieva A. Yu., Makarova T.A., Samoilenko Z.A. et al. Microclonal reproduction of shrubby cinquefoil (*Dasiphora fruticosa* (L.) Rydb.) with elements of hydroponics. *Izvestiya Orenburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*. 2023;2(100):64–71. (In Russ.) <https://doi.org/10.37670/2073-0853-2023-100-2-64-71>

14. Makarov S.S., Makarova T.A., Samoilenko Z.A., Makarov P.N. et al. Tarragon (*Artemisia dracunculus* L.) in vitro and ex vitro propagation features. *Izvestiya Orenburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*. 2023;3(101):77–83. (In Russ.) <https://doi.org/10.37670/2073-0853-2023-101-3-77-83>

15. Makarov S.S., Samoilenko Z.A., Makarova T.A., Kuznetsova I.B. et al. Adaptation of american cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) to ex vitro conditions using the hydroponic method. *Bulletin of KSAU*. 2023;11(101):104–112. (In Russ.) <https://doi.org/10.36718/1819-4036-2023-11-104-112>

16. Makarov S.S., Upadyshv M.T., Rodin S.A., Makarova T.A. et al. Adaptation of regenerated plants of *Rubus arcticus* L. to ex vitro conditions using hydroponics. *Sibirskiy lesnoy zhurnal*. 2023;4:75–82. (In Russ.) <https://doi.org/10.15372/SJFS20230408>

17. Nikonovich T.V., Leviy A.V., Frantsuzenok V.V. The influence of the spectral composition of light on the growth and development of regenerating plants of grapes during the period of adaptation to in vitro conditions. *Vestnik BGSKhA*. 2012;2:70–75. (In Russ.)

18. Polyakov S.A., Rastorguev S.P., Verzilin A.V. Adaptation of strawberry regenerating plants to adverse conditions. In: *Improving the efficiency of gardening in modern conditions*. Michurinsk-Naukograd RF, Russia, 2003(2):335–339. (In Russ.)
19. Smolnikova Ya.V. Cultivation of *Digitalis purpurea* L. in vitro and the production of cardiac glycosides based on it. CSc (Eng) thesis. Krasnoyarsk, Russia, 2012:21. (In Russ.)
20. Tomilova S.V., Kitashov A.V., Nosov A.M. Cardiac glycosides: distribution, properties and specificity of formation in cultures of cells and organs of plants in vitro. *Plant Physiology*. 2022;69(3):227–245. (In Russ.)
21. Tretyakov N.N., Karnaukhova T.V., Panichkin L.A. *Workshop on plant physiology*. Moscow, USSR: Agropromizdat, 1990:271. (In Russ.)
22. Shakina T.N. Adaptation experience of some ornamental and fruit-berry plantlets to ex vitro conditions in the Training and Science Center “Botanical Garden” of Saratov State University n.a. N.G. Chernyshevsky. *Problemy botaniki Yuzhnoy Sibiri i Mongolii*. 2020;19(1):315–320. (In Russ.) <https://doi.org/10.14258/pbssm.2020063>
23. Drainerd E. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. *J.Am. Soc. Hort. Sci.* 1981;106(4):515–518.
24. Furuya T., Kojima H., Katsuta T. 3-methylpurpurin and other anthraquinones from callus tissue of *Digitalis lanata*. *Phytochem.* 1972;11:1073. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)88455-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)88455-1)
25. Lobach E.Y., Tokhiriyon B., Poznyakovsky V.M., Makarov S.S., Khanbayeva O.E., Takaeva M.A. New Phytocomplex for Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Development and Clinical Evidence of Anti-inflammatory Effect. *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research*. 2023;13(3):102–108. <https://doi.org/10.51847/TI5LnYDudZ>
26. Matsumoto M., Koga S., Shoyama Y., Nishioka I. Phenolic glycoside composition of leaves and callus cultures of *Digitalis purpurea*. *Phytochem.* 1987;26:3225. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)82474-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)82474-7)
27. Nartop P., Altan A.D., Titrek A. Modeling of In Vitro biomass production of *Digitalis purpurea* under the effects of biosynthetic silver nanoparticles. *Iran J. Sci. Technol. Trans. Sci.* 2021;45:775–783. <https://doi.org/10.1007/s40995-021-01105-4>
28. Pastor N., Azrak S.S. et al. Digitoxin inhibits the growth of cancer cell lines at concentrations commonly found in cardiac patients. *J. Nat. Prod.* 2005;68(11):1642–1645.
29. Patil G., Mahendra A., Kirti N., Sayantan P., Vijay B., Polavarapu K., Nikam Td. In vitro propagation and production of cardiotoxic glycosides in shoot cultures of *Digitalis purpurea* L. by elicitation and precursor feeding. *Applied microbiology and biotechnology*. 2012;97. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4489-y>
30. Pérez-Alonso N., Wilken D., Gerth A. et al. Cardiotoxic glycosides from biomass of *Digitalis purpurea* L. cultured in temporary immersion systems. *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* 2009;99:151–156. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9587-x>

### Сведения об авторах

**Макаров Петр Николаевич**, канд. биол. наук, доцент, доцент кафедры биологии и биотехнологии, Сургутский государственный университет; 628400, Российская Федерация, г. Сургут, проспект Ленина, 1; e-mail: makarov\_pn@surgu.ru; тел.: (34–62) 763–154

**Макаров Сергей Сергеевич**, д-р с.-х. наук, заведующий кафедрой декоративного садоводства и газоноведения, Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева; 127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; e-mail: s.makarov@rgau-msha.ru; тел.: (499) 976–05–45



**Макарова Татьяна Анатольевна**, канд. биол. наук, доцент, доцент кафедры биологии и биотехнологии, Сургутский государственный университет; 628400, Российская Федерация, г. Сургут, проспект Ленина, 1; e-mail: makarova\_ta@surgu.ru; тел.: (34–62) 763–154

**Самойленко Зоя Анатольевна**, канд. биол. наук, доцент, доцент кафедры биологии и биотехнологии, Сургутский государственный университет; 628400, Российская Федерация, г. Сургут, проспект Ленина, 1; e-mail: samojlenko\_za@surgu.ru; тел.: (34–62) 763–154

**Гулакова Наталья Михайловна**, инженер кафедры биологии и биотехнологии, Сургутский государственный университет; 628400, Российская Федерация, г. Сургут, проспект Ленина, 1; e-mail: gulakova\_nm@surgu.ru; тел.: (34–62) 763–154

### **Information about the authors**

**Petr N. Makarov**, PhD (Bio), Associate Professor, Associate Professor at the Department of Biology and Biotechnology, Surgut State University (1 Lenina Ave., Surgut, 628400, Russian Federation; phone: (3462) 76–31–54; e-mail: makarov\_pn@surgu.ru)

**Sergey S. Makarov**, DSc (Ag), Head of the Department of Ornamental Horticulture and Lawn Science, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (49 Timiryazevskaya St., Moscow, 127550, Russian Federation; phone: (499) 976–05–45; e-mail: s.makarov@rgau-msha.ru)

**Tatiana A. Makarova**, CSc (Bio), Associate Professor, Associate Professor at the Department of Biology and Biotechnology, Surgut State University (1 Lenina Ave., Surgut, 628400, Russian Federation; phone: (3462) 76–31–54; e-mail: makarova\_ta@surgu.ru)

**Zoya A. Samoylenko**, CSc (Bio), Associate Professor, Associate Professor at the Department of Biology and Biotechnology, Surgut State University (1 Lenina Ave., Surgut, 628400, Russian Federation; phone: (3462) 76–31–54; e-mail: samojlenko\_za@surgu.ru)

**Natalia M. Gulakova**, Engineer at the Department of Biology and Biotechnology, Surgut State University (1 Lenina Ave., Surgut, 628400, Russian Federation; phone: (3462) 76–31–54; e-mail: gulakova\_nm@surgu.ru)