

УДК 582.594+606

БИОТЕХНОЛОГИЯ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ *LUDISIA DISCOLOR* (KER GAWL.) A. RICH

В.В. Назаров¹, Е.Ю. Семёнова¹, В.О. Климентова¹, Л.А. Хасанова², Р.З. Нуриманов³,
З.М. Хасанова²

¹ Крымский федеральный государственный университет имени В.И. Вернадского, Симферополь, Россия

² Академия наук Республики Башкортостан, Уфа, Россия

³ Башкирский государственный педагогический университет имени М. Акмуллы, Уфа, Россия

Наземное орхидное *Ludisia discolor* (Ker Gawl.) A. Rich., как и подавляющее большинство других представителей этого семейства, находится под угрозой исчезновения в тропических лесах Юго-Восточной Азии и Индонезии. Одновременно две причины способствуют уничтожению природных популяций. Уникальные особенности окраски, текстуры и неповторимой мозаичности рисунка листьев у *L. discolor* делают эти растения из категории так называемых «драгоценных орхидей» самыми популярными среди коллекционеров. Помимо этого, *L. discolor* интенсивно собирают на родине в качестве ценного лекарственного сырья для традиционной медицины [1].

Ситуацию может улучшить только разработка эффективной методики массового размножения *Ludisia discolor* при помощи современной технологии клонального микроразмножения *in vitro*. Она поможет сделать сбор этих орхидных из природных популяций нерентабельным и сохранить все разнообразие их генофонда. В этой связи исследовались технологии культивирования трех вариаций *L. discolor* в условиях *in vitro* (рис. 1).

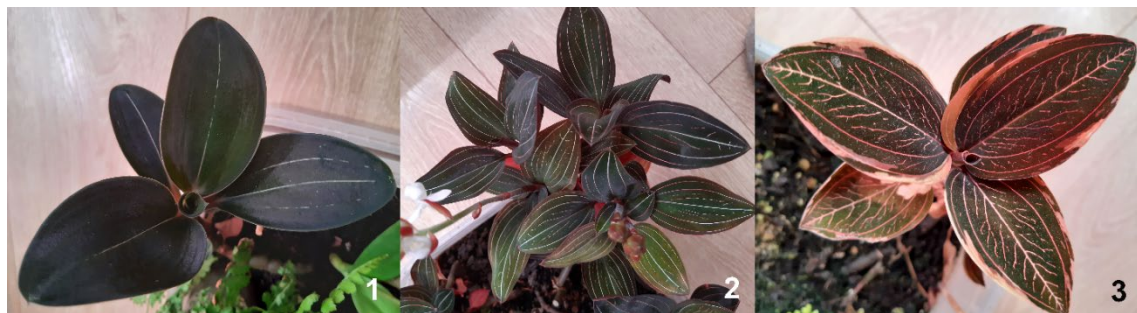


Рис. 1. Изменчивость изученных форм Лудисии двуцветной по окраске, текстуре и мозаичности рисунка листьев: 1 – *Ludisia discolor* var. *nigrescens*, 2 – *Ludisia discolor* var. *dawsoniana*, 3 – *Ludisia discolor* var. *dawsoniana* f. *variegata*.

В течение двух лет проводили эксперименты по введению в культуру *in vitro* трех вариаций *Ludisia discolor* при помощи различных эксплантов: выводковых почек, апикальных побеговых меристем и семян. В качестве среды использовали половинное количество компонентов среды Мурасиге и Скуга с концентрацией сахарозы 15 г./л и различным сочетанием фитогормонов [2]. В результате сравнительных исследований было установлено, что традиционные методы введения в культуру *in vitro* этого орхидного при помощи выводковых почек и апикальных меристем были значительно менее эффективны для массового размножения, чем при помощи семян. В частности, подтверждены ранее полученные данные о том, что индукция развития выводковых почек у *L. discolor* в условиях *in vitro* протекает не всегда успешно и зависит от оптимальной концентрации фитогормонов в питательной среде [3]. Введение в культуру *in vitro* выводковых почек, которые располагаются у *L. discolor* обычно под поверхностью субстрата, часто сопровождалось развитием грибной и бактериальной посторонней микрофлоры несмотря на жесткую обработку эксплантов различными стерилизантами (например, 15 % раствором гипохлорита натрия и перекиси водорода). Использование апикальных побеговых меристем в качестве эксплантов позволяло не только значительно уменьшить вероятность контаминации культуры, но и приводило к длительной стагнации в развитии целого вегетативного побега (включая боковые выводковые почки), с которого срезался эксплант.

Для получения семян мы проводили гейтеногамное опыление между цветками в пределах одного соцветия. Полное созревание плодов у всех изученных вариаций *Ludisia discolor* в условиях оранжереи наступало примерно одновременно – на 30–35 день. Зрелые семена *L. discolor* имели микроскопические размеры.

Поэтому для их посева на питательную среду использовалась специально разработанная технология стерилизации и посадки. В ее основе лежал способ, который был разработан Е.В. Андроновой для стерилизации зрелых микроскопических семян орхидных химическим раствором при помощи шприца и специальной улавливающей мелкой металлической сетки (персональное сообщение). Мы не использовали металлическую сетку для улавливания семян. Семена *L. discolor* помещались в фильтр-пакеты (бумажные пакетики из кофейного фильтра). Пакетики предварительно формовались внутри пустого шприца того же диаметра. Это обеспечивало плотное прилегание пакетика к стенкам шприца при стерилизации. Внутри такого пакетика засыпалась порция сухих зрелых семян и они накрывались круглым бумажным кружком с номером. Диаметр кружка был чуть меньше диаметра поршня шприца. Плотное прилегание и наличие бумажного кружка по размеру поршня способствовали хорошему перемешиванию содержимого пакетика со стерилизующей жидкостью при движении поршня. Готовый пакетик завязывался белыми нитками и помещался в шприц. На дно шприца предварительно укладывался небольшой пластиковый цилиндр, сделанный из колпачка от шприца. Он препятствовал закупорке выпускного отверстия шприца пакетиком при резком выдавливании стерилизующей жидкости.

В качестве стерилизанта использовалась смесь дистиллированной воды и 10 % раствора гипохлорита натрия в пропорции 1:1. Стерилизация продолжалась 20 минут. При этом каждые 5 минут проводилась интенсивная прокачка шприца стерилизантом в течение 1 минуты. В результате такой стерилизации окраска у интины семян полностью исчезала. Процедура отмывки семян от стерилизанта проходила аналогичным образом в дистиллированной воде 2 раза по 10 минут. Затем пакетик со стерильными семенами помещался в стерильную сухую чашку Петри.

Стерильными ножницами у пакетика отрезали хвостовую часть вместе с нитками, а его головная часть полностью разворачивалась и переносилась в чашку Петри с питательной средой. Применялось несколько методик перенесения семян с поверхности пакетика на поверхность среды: развернутый пакетик переворачивали семенами к среде и оставляли на ней; развернутый пакетик поочередно приклеивался семенами к разным участкам среды; развернутый пакетик прикладывали семенами к среде и осторожно перемещали волоком по поверхности среды до полной адгезии к ней всех семян из пакетика.

Посадка *Ludisia discolor* зрелыми семенами из уже раскрывшихся коробочек оказалась технически трудоемкой операцией. Поэтому мы испытали технологию посадки этого орхидного на стерильную питательную среду при помощи незрелых семян из еще нераскрывшихся коробочек. Стерилизация коробочек и способ посадки незрелых семян на питательную среду проводили согласно методике Р.И. Kauth et al. [4].

На первом этапе от *Ludisia discolor* var. *dawsoniana* были взяты разновозрастные коробочки, чтобы определить оптимальную для посадки стадию в развитии семян. В этих исследованиях использовались 15, 20 и 25-дневные коробочки с момента стартового опыления. Все коробочки высаживали на среду из одной колбы. Чашки Петри с высаженными семенами содержали первые 60 дней в темном термостате при 18–20° С. Наилучшую всхожесть показали семена из 25-дневных коробочек (рис. 2.1). Вначале зародыши семян набухали и приобретали бело-молочную окраску. Примерно через месяц после посадки протокормы массово разрывали семенную оболочку у семян и в базальной части у них образовывались первые корневые волоски (рис. 2.2). Через 2 месяца у протокормов образовывался апикальный валик будущего первого листа. Базальная часть к этому времени была уже покрыта несколькими рядами корневых волосков (рис. 2.3).

По истечении 60-и дней с момента посадки протокормы переносились в климатическую камеру с 8-часовым периодом освещения и температурой 25° С. Спустя 5 дней наблюдалось массовое позеленение протокормов (рис. 3.1). Еще через 5 дней из апикального валика начинала формироваться листовая пластинка первого листа (рис. 3.2). Примерно через месяц содержания посевов на свету у проростков наблюдалось развитие 2–3 стеблевых метамеров с корневыми волосками (рис. 3.3).

Семена из 20-дневных коробочек прорастали значительно хуже. В темновом термостате на 20-й день после посева только около 20 % из высеванных семян набухли или образовали протокормы. По размеру протокормы были мельче протокормов от 25-дневных семян. Относительная задержка в развитии сеянцев сохранялась и при содержании в климатической камере. Семена от 15-дневных коробочек не проявили признаков прорастания за весь период наблюдений в темновом термостате и климатической камере.

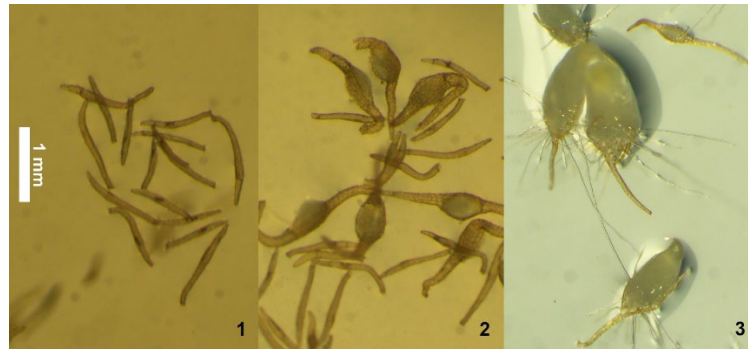


Рис. 2. Прорастание семян и гемморизогенез протокормов у *Ludisia discolor* var. *dawsoniana* в темновой фазе: 1 – незрелые 25-дневные семена после высадки на питательную среду; 2 – массовое прорастание семян и выход протокормов из тесты, 40 дней; 3 – базальная часть протокормов покрыта несколькими рядами корневых волосков, в апикальной части закладывается валик будущего первого листа, 60 дней. Количество дней указано с момента посадки семян на питательную среду.

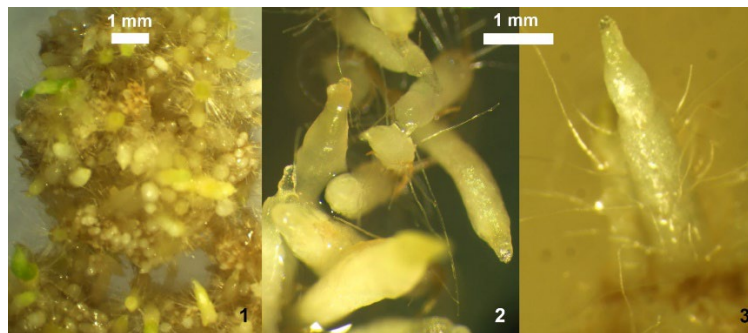


Рис. 3. Гемморизогенез у проростков *Ludisia discolor* var. *dawsoniana* в климатической камере при 8-часовом периоде освещения: 1 – позеленение протокормов и проростков, 65 дней; 2 – начало формирования листовой пластинки, 70 дней; 3 – метамеризация побега у проростков, 90 дней. Количество дней указано с момента посадки семян на питательную среду.

У остальных изученных вариаций *Ludisia* на посадку брались семена только от 25-дневных коробочек. Прорастание семян в темновой фазе и гемморизогенез в климатической камере происходили у них аналогично первой вариации.

В результате этих исследований установлена оптимальная стадия в развитии незрелых семян для посадки их на стерильную среду в условиях *in vitro*. Семена из 25-дневных коробочек показали массовую всхожесть у всех трех изученных вариаций.

Возможно, что семена из 27–29-дневных коробочек имеют еще более высокую всхожесть и лучшее развитие у протокормов, но на этой стадии развития створки коробочек соединены уже между собой слабо, и поэтому в них может попадать стерилизующая жидкость во время обработки перед эксплантацией на среду. Таким образом, успех методики посадки незрелыми семенами зависит от точной даты созревания коробочки, которая известна только при выполнении стартового опыления. При использовании коробочек, полученных в результате естественного опыления, необходимо проводить дополнительное исследование стадии развития семян в общем урожае, используя модельные коробочки с каждого отдельного соцветия. Если это невозможно, то лучше использовать для стерилизации полностью созревшие семена и технологию посева с применением фильтр-пакетов.

Литература

1. Ranjetta, P. Autofluorescence study and selected cyanidin quantification in the Jewel orchids *Anoetochilus* sp. and *Ludisia discolor* / P. Ranjetta, Z. Rahmad, M. Vikneswaran, S. Sreeramanan // PLoS One. – 2018. – Vol. 13, – P. 1–19.
2. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // Physiol Plant. – 1962. – Vol. 15, № 3. – P. 473–497.
3. Ying L. Effects of different factors on adventitious bud induction from stem explants of *Ludisia discolor* / L. Ying, L. Xiaohao, Ch. Jingye, X. Yingbin and Yinling Z. // E3S Web of Conferences. – 2021. – Vol 245, N. 03024. – P. 1–4.
4. Kauth P.J. A classroom exercise in hand pollination and in vitro asymbiotic orchid seed germination / P.J. Kauth, T.R. Johnson, S.L. Stewart // Plant Cell Tissue and Organ Culture. – 2008. – Vol. 93, N. 2. – P. 223–230.

ДОЗАЗАВИСИМЫЕ ЭФФЕКТЫ ДИХЛОРДИФЕНИЛТРИХЛОРЭТАНА НА ЭКСПРЕССИЮ ЙОДНЫХ КАНАЛОВ В КЛЕТКАХ

С.С. Обернихин, Н.В. Яглова, С.В. Назимова, В.В. Яглов

НИИ морфологии человека, Москва, Россия

Формирование и функционирование каналов, транспортирующих йодиды в клетки, является основой нормальной деятельности щитовидной железы и синтеза ее гормонов. В настоящее время происходит неуклонный рост числа тиреоидных заболеваний, что, по мнению ведущих специалистов, связано с воздействием эндокринных дисрапторов [5, 7]. Эндокринные дисрапторы – вещества антропогенного происхождения, оказывающие гормоноподобное действие или нарушающие синтез гормонов и их взаимодействие с рецепторами. Одним из наиболее распространенных дисрапторов на планете является дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ) [5]. Особенности развития щитовидной железы в условиях непрерывного воздействия различных нетоксических доз эндокринных дисрапторов мало изучены. Немаловажным аспектом проблемы является влияние эндокринных дисрапторов на йодаккумулирующую функцию щитовидной железы. Деятельность щитовидной железы реализуется посредством ионных каналов, в частности, работой натрий-йодного симпортера (НИС), гликопротеина, встроенного в мембрану тироцита, который и обеспечивает йодаккумулирующую функцию [3, 4]. По имеющимся данным, низкодозовое воздействие ДДТ, которому подвергается все население планеты, способен оказывать дисрапторное действие на щитовидную железу, а механизмы такого влияния требуют более тщательного изучения [1, 2, 6].

Цель настоящей работы – исследовать влияние различных доз и сроков воздействия эндокринного дисраптора ДДТ на продукцию НИС крыс.

Материалы и методы. Исследования выполнены на самцах крыс Вистар. Две экспериментальные группы (n=40) составили животные, которые потребляли вместо питьевой воды раствор о, п-ДДТ (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 20 мгк/л и 80 мгк/л. Таким образом, среднесуточное потребление ДДТ составило $1,87 \pm 0,86$ мгк/кг и $7,77 \pm 0,17$ мгк/кг, соответственно. Контрольной группой (n=20) служили животные потреблявшие водопроводную воду. Животных выводили из эксперимента через 6 и 10 нед. от начала воздействия ДДТ. Эксперимент выполнен с разрешения этической комиссии НИИ морфологии человека с соблюдением норм действующего законодательства.

Концентрацию НИС в сыворотке определяли методом иммуноферментного анализа с использованием набора реактивов (Cusabio, Китай). Доли щитовидной железы фиксировали в растворе Буэна, после стандартной гистологической проводки получали парафиновые срезы и окрашивали гематоксилином и эозином, проводили ШИК-реакцию. Диаметр фолликулов устанавливали при помощи компьютерной морфометрии с использованием программы ImageScope (Leica Microsystems, Германия).

Статистическую обработку проводили с помощью пакета прикладных программ STATISTICA 7.0 ("Statsoft Inc.", США). Сравнение независимых групп по количественному признаку проводили с помощью t-критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. Через 6 недель в обеих группах крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ наблюдалось значительное снижение концентрации НИС в сыворотке по сравнению с контролем, причем у крыс потреблявших ДДТ в дозе $1,87 \pm 0,86$ мгк/кг/сут это снижение было более выраженным, чем у крыс второй опытной группы, потреблявшей ДДТ в дозе $7,77 \pm 0,17$ мгк/кг /сут (рис. 1).

Через 10 недель потребления ДДТ у крыс первой опытной группы концентрация НИС возросла и превысила значения в контрольной группе. У крыс второй опытной группы, потреблявших ДДТ в более высокой концентрации, продукция НИС увеличилась по сравнению с предыдущим сроком исследования, но не превысила контрольных значений и была ниже значений группы, потреблявшей меньшую дозу ДДТ (рис. 1).

При гистологическом исследовании щитовидной железы крыс через 6 недель потребления раствора ДДТ выявлено увеличение размеров фолликулов, а через 10 недель выявлены структурные изменения, заключающиеся в уменьшении размеров фолликулов щитовидной железы в обеих экспериментальных группах, появлении множественных микрофолликулов (рис. 2).

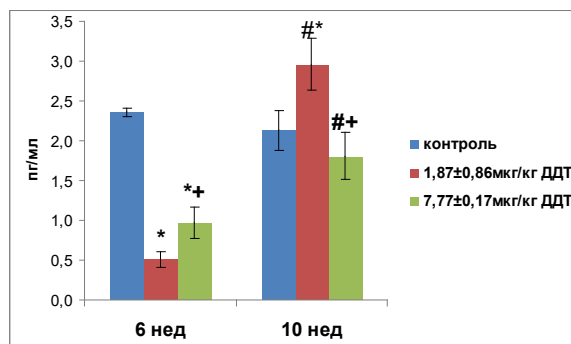


Рис. 1. Изменение концентрации НИС в сыворотке крови крыс, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ ($M \pm SD$).

Примечания. $p < 0,05$ при сравнении с контролем (*), предыдущим сроком исследования (#) и с группой, получавшей меньшую дозу ДДТ (+).

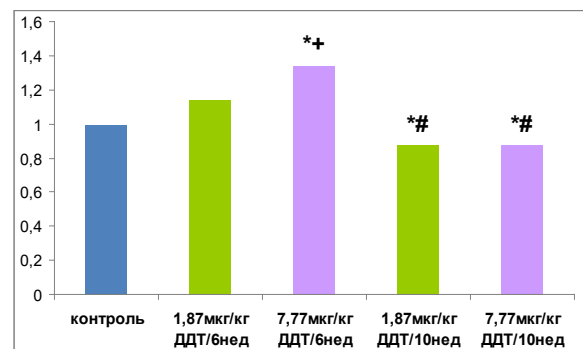


Рис. 2. Относительные изменения размеров фолликулов щитовидной железы крыс, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ.

Примечания. Значения контрольных групп для 6 и 10-недельного сроков приняты за единицу; $p < 0,05$ при сравнении с контролем (*), предыдущим сроком исследования (#) и с группой, получавшей меньшую дозу ДДТ (+).

Обсуждение

Результаты исследования показывают, что воздействие низких доз ДДТ подавляет продукцию НИС. Через 6 недель степень снижения концентрации НИС в сыворотке крови не демонстрировала зависимости от потреблённой дозы, хотя структурные изменения свидетельствовали о дозозависимом снижении активности секреторных процессов. Через 10 недель у крыс, подвергшихся воздействию эндокринного дисраптора, в более низких дозах происходило компенсаторное увеличение НИС, что связано с уменьшением размеров фолликулов щитовидной железы, то есть увеличением числа клеток-продуцентов, что указывает на необратимость ингибирующего действия дисраптора. Однако при потреблении ДДТ в более высоких концентрациях данного компенсаторного механизма оказалось недостаточно, что подтверждает выраженное дозозависимое действие эндокринного дисраптора на мембранные ионные каналы.

Выводы

Эндокринный дисраптор ДДТ ингибирует продукцию натрий-йодного симпортера и демонстрирует дозозависимый эффект на его экспрессию. Увеличение экспрессии йодных каналов достигается за счёт пролиферации клеток-продуцентов, что указывает на невозможность активации экспрессии НИС в клетках, находящихся под воздействием ДДТ.

Литература

- Яглова Н.В., Яглов В.В. Изменения тиреоидного статуса крыс при длительном воздействии низких доз дихлордифенилтрихлорэтана. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2013. Т.156. № 12. С. 720–722.
- Яглова Н.В. Нарушения секреторного цикла фолликулярных тироцитов и их коррекция тиреотропным гормоном при экспериментальном синдроме нетиреоидных заболеваний. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2011. Т.152. № 8. С. 215–219.
- Carrasco N. Iodide transport in the thyroid gland. Biochim. Biophys. Acta Rev. Biomembr. 1993. Vol. 1154. P. 65–82. DOI: 10.1016/0304-4157(93)90017-I
- Darrouzet E., Lindenthal S., Marcellin D., Pellequer J.L., Pourcher T. The sodium/iodide symporter: state of the art of its molecular characterization. Biochim. Biophys. Acta. 2014. Vol. 1838. P. 244–253. DOI: 10.1016/j.bbame.2013.08.013
- Leemans M., Couderq S., Demeneix B., Fini J. – B. Pesticides With Potential Thyroid Hormone-Disrupting Effects: A Review of Recent Data. Front. Endocrinol. 2019. Vol. 10. Art. 743. DOI: 10.3389/fendo.2019.00743
- Liu C., Shi Y., Li H., Wang Y., Yang K. p, p'-DDE disturbs the homeostasis of thyroid hormones via thyroid hormone receptors, transthyretin, and hepatic enzymes. Horm Metab Res. 2011. Vol. 43. P. 391–396. DOI: 10.1055/s-0031-1277135
- Zoeller R.T., et al.. Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: A statement of principles from The Endocrine Society. Endocrinology. 2012. Vol. 153. No. 9. P. 4097–4110. DOI: 10.1210/en.2012-1422