

ЧАРКОВА А.А

РЕДКИЕ И ИСЧЕЗАЮЩИЕ ВИДЫ РАСТЕНИЙ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Аннотация: Данная статья посвящена сохранению редких и исчезающих видов растений с помощью применения метода микроклонального размножения.

Ключевые слова: *in vitro*, микроклональное размножение, редкие растения, стерилизация, эксплант.

CHARKOVA A.A

RARE AND ENDANGERED SPECIES OF PLANTS *IN VITRO*

Abstract: This article presents data on the conservation of rare and endangered plant species using the microclonal propagation method.

Keywords: *in vitro* microclonal propagation,, rare plants, sterilisation, explant.

Сохранение биологического разнообразия в настоящий момент является проблемой мирового масштаба. Наряду с такими способами защиты и сохранения растений, как занесение растений в Красную книгу, создание особо охраняемых природных территорий, используется и метод микроклонального размножения растений. Клональное размножение – это использование техники *in vitro* для быстрого получения неполовым способом растений, идентичных исходному [1,6].

В настоящее время многие ученые занимаются микроклональным размножением редких растений: Т.И. Новикова, А.Ю. Набиева, Т.В. Полубоярова (*Gueldenstaedtia monophylla* Fisch.); А.В. Сидоров, О.А. Маракаев (*Dactylorhiza incarnata* L.); Е.П. Емельянова (*Vaccinium uliginosum* L.); Л.М. Теплицкая, И.В. Ляхова (*Anthyllis taurica* Juss.); Л.Л. Попкова, Л.М. Теплицкая (*Crataegus pojarkovae* Kossyach.); О.О. Жолобова, О.И. Коротков, Г.Н. Сафронова, А.В. Буганова, О.А. Сорокопудова (*Bulbocodium versicolor* (Ker-Gawl.) Spreng.).

В качестве первичных эксплантов для введения в культуру *in vitro* при работе с редкими и исчезающими видами растений используют семена (*G. monophylla*, *D. incarnata*, *A. taurica*), отрастающие побеги (*V. uliginosum*), изолированные зародыши (*C. pojarkovae*) или сегменты лукович (*B. versicolor*).

Обязательным условием введения исходного материала в культуру *in vitro* является его стерилизация, поэтому для обеззараживания первичных эксплантов проводят поверхностную стерилизацию. Стерилизацию необходимо производить с особой тщательностью, поскольку от этого зависит, будет ли эксплант развиваться или погибнет от инфекции [10].

Так, поверхностную стерилизацию семян *G. monophylla* проводили в растворе 70% этанола (20 сек) и 0,15% растворе HgCl_2 (2 мин) [5]. Неповрежденные коробочки *D. incarnata* стерилизовали в течение 15 минут в 20% растворе хлорамина [9]. Побегов *V. uliginosum* в течение 30 минут стерилизовали в 0,2% растворе сулемы [2]. Семена *A. taurica* стерилизовали 70% этиловым спиртом и 50% препаратом «Брадофен» (10–15 мин) [4]. Зародыши *C. pojarkovae* стерилизовали последовательно – 50% препаратом «Брадофен» (1 мин), 80% раствором этанола (30 сек), 3% раствором перекиси водорода [8]. Сегменты лукович *Bulbocodium versicolor* после 70% спирта помещали в 1–3%-ный раствор лизоформина (5–7 мин) [3]. После инкубирования эксплантов в стерилизующих растворах их промывали тремя порциями стерильной дистиллированной воды.

Важное значение для успешного перевода нестерильных растений в культуру *in vitro* является правильный подбор питательной среды. Она должна включать все необходимые растениям макроэлементы (азот, фосфор, калий, кальций, магний, серу, железо) и микроэлементы (бор, марганец, цинк, медь, молибден и др.), а также витамины, углеводы, фитогормоны или их синтетические аналоги. Некоторые питательные среды содержат гидролизат казеина, аминокислоты. Кроме того, в состав питательных сред входит ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) или ее натриевая соль, которые улучшают доступность железа для клеток. Для получения каллусной ткани в отдельных случаях к питательной среде добавляют жидкий эндосперм кокосового ореха (кокосовое молоко), каштана и др.[7].

Углеводы являются необходимым компонентом питательных сред для культивирования изолированных клеток и тканей, так как в большинстве случаев последние не способны к автотрофному питанию. Чаще всего в качестве углевода используют сахарозу или глюкозу в концентрации 2–3%.

Фитогормоны необходимы для дедифференцировки клеток и для индукции клеточных делений. Поэтому для получения каллусных тканей и индукции органогенеза в состав питательных сред должны обязательно входить ауксины, вызывающие клеточную дедифференцировку, и цитокинины, индуцирующие деление клеток.

Для приготовления твердых питательных сред используют агар-агар, который представляет собой полисахарид, получаемый из морских водорослей [11].

Для введения в культуру *in vitro* *G. monophylla* использовали среду Мурасига-Скуга, содержащую 0,1 мг/л α -нафтилуксусной кислоты (НУК) и 0,2 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП) [5]. Для *D. incarnata* использовали питательную среду Кнудсона с активированным углем, гуматом натрия и микроэлементами [9]. Для *V. uliginosum* применяли среду Андерсона, дополненную β -индолилуксусной кислотой (ИУК) и 6- γ,γ -ди-

метилаллиламинопурином (2 iP) в соотношении 1:5 [2]. Для *A. taurica* была использована среда Уайта, дополненная 0,5 мг/л ИУК (β -индолилуксусная кислота) и 2,0 мг/л кинетина [4]. *C. pojarkovae* культивировали на питательных средах Мурасиге-Скуга и Гамборга [8]. Для *B. versicolor* использовали среду Мурасиге-Скуга дополненную кинетином (0,5; 1,0; 2,5; 5,0 мг/л); 6-БАП (0,1-0,7; 1,0; 2,5; 5 мг/л), тидиазуромом, зеатином, и ИУК [3].

Для успешного культивирования изолированных клеток и тканей необходимо подбирать не только состав среды, но и условия культивирования (температура, свет, влажность) [11].

Так, культивирование эксплантов *G. monophylla* проводили при освещении белыми люминесцентными лампами с интенсивностью 6000 люкс и 16 часовом фотопериоде [5], а культивирование эксплантов *D. incarnata* проводили в темноте при температуре 22–24°C. [9]. Индукцию органогенеза у эксплантов *V. uliginosum* осуществляли в условиях 16/8 часового фотопериода при освещенности – 2000–3000 лк и температуре – 24±1 °C. [2]. Экспланты *A. taurica* также культивировали при 16-часовом фотопериоде, но при температуре 26–28°C, освещенности 3000–4000 люкс и относительной влажности 60–70% [4]. При работе с *C. pojarkovae* органогенез индуцировали при температуре 22–25°C, освещенности 1500–2000 лк и относительной влажностью воздуха 60–70% [8].

В последующем сформировавшиеся растения-регенеранты либо оставляли на депонирование и поддержание коллекций *in vitro*, либо переносили в почвенный субстрат с последующей реинтродукцией в места их естественного произрастания [7].

Таким образом, к наиболее важным моментам при переводе редких и исчезающих растений в культуру *in vitro*, являются: 1) выбор объекта исследования; 2) подбор стерилизующего агента и алгоритма стерилизации в зависимости от материала исследования; 3) выбор питательной среды, состав которой должен содержать полный состав питательных веществ, необходимых для жизнедеятельности данного конкретного объекта исследования; 4) подбор оптимальных условий культивирования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бутенко Р.Г. Биология высших клеток растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. – М., 1999. – 160 с.
2. Емельянова Е.П. Влияние ауксинов на укоренение *in vitro* сортов *Vaccinium uliginosum* L. // Известия Алтайского государственного университета. Биологические науки. – 2010. – Вып. 3-2(67). – С. 25-28.
3. Жолобова О.О., Коротков О.И., Сафронова Г.Н., Буганова А.В., Сорокопудова О.А. Сохранение редких и исчезающих видов растений при помощи методов

- биотехнологии // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – №1. – URL: www.science-education.ru/101-5341 (дата обращения: 26.11.2013).
4. Ляхова И.В., Теплицкая Л.М. Изучение морфологических особенностей семян язвенника крымского (*Anthyllis taurica* Juz.) и процесса их прорастания в условиях *in vitro* // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – Т. 23 (62). – 2010. – №4. – С. 137-144.
 5. Майстренко Г.Г., Новикова Т.И., Селютина И. Ю, Сидорова К.К. Клональное микроразмножение редкого сибирского вида *Gueldenstaedtia monophylla* Fisch. // Сборник научных трудов Никит. ботан. сада. – 2009. – Т. 131. – С. 50-54.
 6. Мокшин Е.В., Лукаткин А.С. Изучение способности *Adonis vernalis* L. к морфогенезу в культуре *in vitro* // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология. IX Межд. конф. Звенигород, 8-12 сентября 2008 г. – М., 2008. – С.264-265.
 7. Мокшин Е. В. Культура клеток и тканей растений : учеб. пособие / Е. В. Мокшин, А. С. Лукаткин. – Саранск, 2012. – 104 с.
 8. Попкова Л.Л., Теплицкая Л.М. Сохранение уникального генотипа боярышника Поярковой (*Crataegus pojarkovae* Kossyach) методом каллусных культур // Тематический сборник научных трудов «Экосистемы Крыма, их оптимизация и охрана». – Вып. 15. – 2005. – С. 147-152.
 9. Сидоров А.В., Маракаев О.А. Морфотипы сеянцев *Dactylorhiza incarnate* (L.) Soo (*Orchidaceae*) в культуре *in vitro* // Modern Phytomorphology. – 2012. – Vol. 2. – P. 243-245.
 10. Стерилизация растительного материала. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://bio-x.ru/articles/sterilizaciya-rastitelnogo-materiala>
 11. Шевелуха В.С. Сельскохозяйственная биотехнология. – М., 2008. – 710 с.