

ИЗУЧЕНИЕ И СОХРАНЕНИЕ РЕДКИХ И ЦЕННЫХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ МЕТОДАМИ БИОТЕХНОЛОГИИ

Е.В. Малаева^{1,2}

¹ГБУ ВО «Волгоградский региональный ботанический сад»,
г. Волгоград, Россия, e.malaeva@mail.ru

²ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный социально-педагогический университет»,
г. Волгоград, Россия

В статье представлена информация по совершенствованию технологии клонального микроразмножения и особенностях размножения *in vitro* редких и ценных видов растений. Работа по созданию коллекции *in vitro* Волгоградским региональным ботаническим садом ведется с 2005 года. Коллекция редких и ценных видов растений насчитывает более 100 наименований, в том числе редких видов, занесенных в Красную книгу РФ и Красную книгу Волгоградской области - 50 видов, относящихся к 19 семействам и разным эколого-фитоценотическим группам. В результате исследований проведена оптимизация условий культивирования редких и ценных видов растений на разных этапах клонального микроразмножения. Максимальный коэффициент размножения для редких видов $4,9 \pm 0,7$ зафиксирован на питательной среде, содержащей 6-БАП в концентрации 0,5 мг/л и ИУК 0,01 мг/л. Наибольший коэффициент размножения актинидии (9,02) установлен при культивировании на среде, содержащей 6-БАП в концентрации 0,5 мг/л и ИУК 0,05 мг/л. В результате проведенных исследований подобраны оптимальные условия для длительного сохранения растений-регенерантов. Растения *in vitro* хранятся в климатической камере SANYO MRL-351H на питательной среде $\frac{1}{2}$ МС дополненной 6-БАП 0,2 мг/л, сахарозой (20-30 мг/л), t (3-7°C) и освещенность (500–1200 лк).

Ключевые слова: клональное микроразмножение, коэффициент размножения, пролиферация, регуляторы роста, редкие и ценные растения.

Растения являются важнейшим мировым биологическим ресурсом. Их объем и численность популяции из года в год значительно изменяется. В результате, все больше число видов имеет статус, нуждающихся в охране, а проблема сохранения биологического разнообразия сегодня признана одной из ключевых. Традиционно работы по сохранению генофонда растительного мира ведут ботанические учреждения многих стран мира. Работа по формированию и изучению коллекции редких и ценных видов растений в ГБУ ВО «Волгоградский региональный ботанический сад» (далее ВРБС) ведется с 2005 года.

В настоящее время она насчитывает более 100 наименований, в том числе редких видов, занесенных в Красную книгу РФ и Красную книгу Волгоградской области - 50 видов, относящихся к 19 семействам и разным эколого-фитоценотическим группам. Данная коллекция в культуре *in vitro* является самой динамичной. Это связано со сложностью введения редких видов в культуру и с неустойчивостью многих из них, поэтому состав коллекции постоянно меняется.

В настоящее время возникает потребность в выращивании культур, которые содержат в большом количестве витамины и биологически активные вещества. К таким культурам по праву можно отнести коллекцию видов, сортообразцов и дикорастущих форм актинидии. Коллекция данной культуры *in vitro* представлена 36 наименованиями.

Актинидия – дальневосточный эндем, который является ценным источником витаминов, кахетинов, пектинов, дубильных и красящих веществ, флавоноидов, алкалоидов и множества других соединений. Кроме того, актинидия – ценная культура и с экологической точки зрения.

Она отличается высокой устойчивостью к болезням и вредителям, что позволяет ее выращивать без применения высоких доз инсектицидов и фунгицидов [3]. Из 40 видов актинидии наибольшее распространение в России получили растения самых зимостойких видов *Actinidia kolomikta* (Rupr. Et Maxim.) Maxim., *A. arguta* Planch., и *A. polygama* (Sieb. Et Zucc.) Maxim.

В качестве эксплантов использовали апикальные и латеральные меристемы, сегменты стерильных проростков, выращенных из семян, для актинидии – одноглазковые черенки и меристематические участки апикальных и латеральных почек. Методика исследований основана на общепринятых классических методах работы *in vitro* [1] и приемах, оптимизированных в условиях лаборатории биотехнологии ВРБС [8].

В условиях *in vitro* растения культивировали в чашках Петри и биологических пробирках при освещении с интенсивностью 3-5 клк, при 16-часовом фотопериоде, температуре 24⁰С и относительной влажности воздуха 70%.

Все опыты проводили трижды, повторность в каждом варианте 10-кратная. Поверхностная стерилизация осуществлялась 95% этиловым спиртом в течение 50-60 секунд, затем 5 % раствором Лизоформина 3000, при этом время экспозиции составляло 5 и 7 минут. Оптимальный режим стерилизации определяли по жизнеспособности первичных эксплантов и наличию инфекции.

На этапе микроразмножения использовали минеральную основу питательной среды Мурасига Скуга (МС) (Murashige, Skoog, 1962), Уайта (White, 1943) или ½ питательной среды Мурасига Скуга (½МС) [2]. В качестве цитокининов использовали: 6-бензиламинопурин (6-БАП) в концентрации 0,1-4,0 мг/л, цитодеф (ЦФ) 0,1-1,0 мг/л, кинетин (К) 0,5-1,0 мг/л, тидиазурон (TDZ) 0,1-1,0 мг/л, 2-изопентиладенин (2-иР) 0,5-1,0 мг/л, зеатин (Z) 3,0-5,0 мг/л, в том числе дополненные β-индолилуксусной кислотой (ИУК) в концентрации от 0,01-0,5 мг/л.

При этом отмечали следующие показатели: коэффициент размножения (Кр), побегов/эксплант, среднее число побегов, шт, среднюю длину побега, см и количество аномальных (витрифицированных) растений, %. Результаты экспериментальных данных обрабатывались статистически с помощью компьютерной программы Excel лицензионного пакета Microsoft Office 2007. Полученные данные достоверны при $p < 0,05$.

Среди факторов, оказывающих наибольшее влияние на морфогенетические процессы в культуре тканей и органов, в первую очередь необходимо выделить таксономическую принадлежность, генетические особенности растений-регенерантов, физиологическое состояние маточных растений, инициального экспланта, состав питательной среды, условия культивирования [5-7]. Один из путей повышения коэффициента размножения *in vitro* является использование препаратов с высокой цитокининовой активностью.

Перспективными регуляторами роста являются TDZ (тидиазурон), 2иР (2-изопентиладенин), Z (зеатин) и К (кинетин). Эффект TDZ (тидиазурана) был изучен на актинидии и других культурах [4, 9]. На этапе размножения, микрочеренки редких видов помещались на питательную среду МС с добавлением 6-БАП, ЦФ и TDZ в концентрации 0,1-1,0 мг/л. При этом отмечали и рассчитывали коэффициент размножения (Кр) (побегов/эксплант) и количество аномальных (витрифицированных) растений (%) (табл. 1).

В процессе исследований для *Hedysarum grandiflorum* и *H. cretaceum* наибольший Кр наблюдали на питательной среде, содержащей 6-БАП в концентрации 0,5 мг/л и 1,0 мг/л - (3,0±0,3) и (4,6±0,8) соответственно. При концентрации 6-БАП 0,1 мг/л Кр значительно меньше - 2,5±0,4, но все растения нормальной морфологии. Увеличение концентрации 6-БАП значительно увеличивает Кр, но в тоже время увеличивается процент аномальных побегов, достигая 50% при концентрации 6-БАП 1,0 мг/л.

При использовании ЦФ в концентрации 0,1-1,0 мг/л Кр не превысил 2,9±0,7. В то же время во всех вариантах не наблюдали витрификации, побеги были нормальной морфологии. Таким образом, использование цитокинина ЦФ на этапе микроразмножения вполне эффективно.

Таблица 1

Влияние типа и концентрации цитокинина на коэффициент размножения и развитие микрочеренков *Hedysarum grandiflorum* Pall. и *H. cretaceum* Fisch.

Цитокинин	Концентрация, мг/л	Коэффициент размножения, побегов/эксплант	Аномальных (витрифицированных) растений, %	Коэффициент размножения, побегов/эксплант	Аномальных (витрифицированных) растений, %
		<i>H. cretaceum</i>		<i>H. grandiflorum</i>	
Контроль б/г	-	1,2 ± 0,3	0	1,2 ± 0,5	0
6-БАП	0,1	2,5±0,4	5	1,2±0,2	0
	0,5	3,0±0,3	10	3,8±0,5	10
	1,0	4,6±0,8	50	2,2±0,3	30
ЦФ	0,1	2,0±0,2	0	2,0±0,4	0
	0,5	2,9±0,7	0	2,5±0,5	0
	1,0	2,8±0,2	0	2,5±0,4	0
TDZ	0,1	10±1,1	10	5,1±1,0	60
	0,5	12±1,3	20	4,2±0,9	90
	1,0	22±0,8	50	8,3±1,1	100

Для представителей рода *Actinidia* Lindl. установлено что все исследованные фитогормоны (за исключением кинетина) в целом обеспечивали увеличение коэффициента размножения (рис. 1).

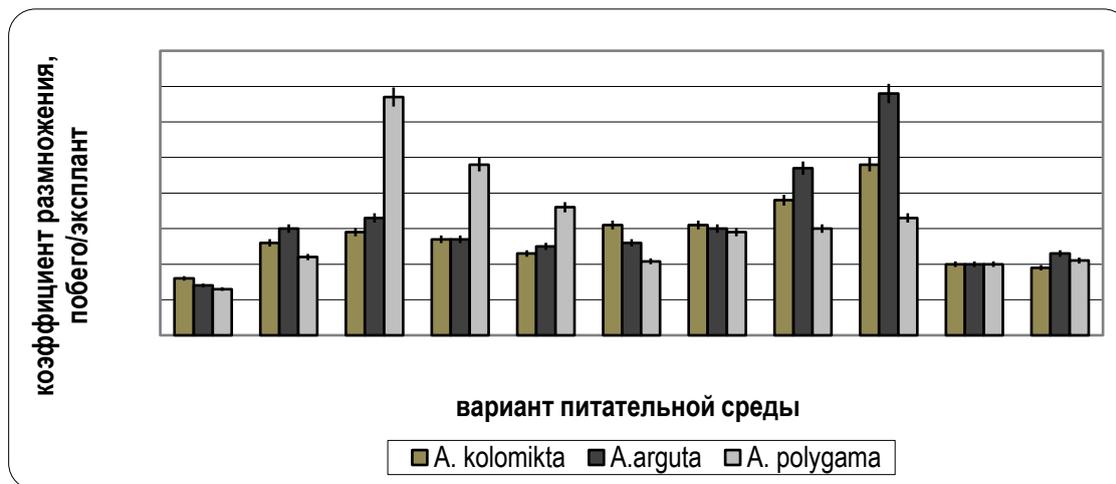


Рис. 1. Влияние регуляторов роста на коэффициент размножения некоторых представителей рода *Actinidia*.

Условные обозначения: 1. контроль, без гормонов. 2. Z (зетин) 3,0 мг/л. 3. Z (зетин) 5,0 мг/л 4. 6-БАП (6-бензиламинопурин) 0,5 мг/л. 5. 6-БАП (6-бензиламинопурин) 1,0 мг/л. 6. TDZ (тидиазурон) 0,5 мг/л. 7. TDZ (тидиазурон) 1,0 мг/л. 8. 2iP (2-изопентиладенин) 0,5 мг/л. 9. 2iP (2-изопентиладенин) 1,0 мг/л. 10. К (кинетин) 0,5 мг/л. 11. К (кинетин) 1,0 мг/л.

Сравнительный анализ изучения влияния различных цитокининов показал, что при использовании 2iP коэффициент размножения *A. kolomikta* и *A. arguta*, существенно превышали значение этих показателей на средах с 6-БАП. Коэффициент размножения варьировал от 3,1±0,4 до 4,8±0,7 для *A. kolomikta* и от 4,7±0,9 до 6,8±0,3 - для *A. arguta*. Для *A. polygama* отмечены максимальные показатели коэффициента размножения на среде, содержащей Z (5 мг/л) и 6-БАП (0,5 мг/л). Показатели варьировали от 3,9±0,5 до 6,7±0,4. Для всех исследуемых видов не отмечено положительного эффекта при использовании тидиазурана. На среде содержащей тидиазурон наблюдалось развитие аномальных листьев и сильно укороченных побегов, а использованием концентрации 1,0 мг/л приводило к витрификации микропобегов.

Содержание в среде зеатина увеличивало коэффициент размножения у всех исследуемых образцов актинидии, одновременно стимулируя образование каллуса, что в последствии незначительно затрудняло адаптацию растений - регенерантов *in vivo*. По данным некоторых авторов и наш опыт культивирования показал наличие положительного эффекта при совместном использовании 6-БАП и ИУК для многих культур [10].

Так для редких видов растений, максимальный коэффициент размножения на средах, содержащих только 6-БАП, составил $4,6 \pm 0,8$ (концентрация 6-БАП – 1,0 мг/л), при совместном использовании 6-БАП и ИУК максимальный коэффициент размножения составил $10,2 \pm 0,5$, но при этих концентрациях процент витрифицированных растений достигал 50%. Таким образом, оптимальным соотношением 6-БАП и ИУК для редких видов является 0,1:0,01 и 0,5:0,05 (мг/л). При этом наблюдали увеличение коэффициента размножения по сравнению со средами, содержащими только 6-БАП с $2,5 \pm 0,4$ до $3,5 \pm 1,2$ и $3,0 \pm 0,3$ до $4,9 \pm 0,7$ соответственно (табл. 2).

Таблица 2.

Влияние состава питательной среды на коэффициент размножения *Astragalus dasyanthus* Pall.

Вариант питательной среды		Коэффициент размножения, побегов/эксплант	Витрифицированных растений, %
6-БАП мг/л	ИУК мг/л		
0	0	$1,1 \pm 0,1$	0
0,1	0,01	$3,5 \pm 1,2$	0
0,5	0,05	$4,9 \pm 0,7$	0
1,0	0,1	$5,3 \pm 0,8$	10
1,5	0,3	$7,0 \pm 1,1$	30
2,0	0,5	$10,2 \pm 0,5$	50

В результате проведенных экспериментов для актинидии установлена эффективность совместного использования цитокининов и ауксинов (табл. 3).

Таблица 3

Влияние состава питательной среды на морфометрические показатели представителей рода *Actinidia*

Вариант питательной среды		Среднее число побегов, шт	Средняя длина побегов, см	Коэффициент размножения
6-БАП мг/л	ИУК мг/л			
0,5	0,05	1,63	3,12*	9,02*
1,0	0,05	1,60	1,95	7,31
2,0	0,05	1,51	2,04	6,40
4,0	0,05	1,26*	1,69	5,34*
НСР _{0.05}		0,54	4,33	1,59

Так под действием 0,5 мг/л 6-БАП и 0,05 мг/л ИУК длина развивающихся побегов (3,12 см), а также среднее число междоузлий на побег (потенциальный коэффициент размножения) существенно превышали значения этих показателей, полученных при более высоких концентрациях 6-БАП. Дальнейшее увеличение концентрации этого гормона приводило к появлению аномальных побегов. Важно отметить, что число побегов на один эксплант также уменьшается при увеличении концентрации 6-БАП с 1,63 шт. на среде при 0,5 мг/л БАП до 1,26 на среде с содержанием 4,0 мг/л 6-БАП (табл. 3).

Максимальный коэффициент размножения актинидии (9,02) установлен при культивировании на среде, содержащей 6-БАП в концентрации 0,5 мг/л и ИУК 0,05 мг/л. Важным показателем при культивировании редких и ценных видов растений является количество субкультивирований. Установлено, что коэффициент размножения растений-регенерантов актинидии существенно менялся в процессе культивирования. Отмечена общая для всех изучаемых видов тенденция: на первых пассажах коэффициент размножения

постепенно возрастал, достигая наибольших значений на 5-7 пассаже, снова снижаясь на 8-10 пассажах. Максимальный коэффициент размножения *A. polygama* - на 5 пассаже, а для *A. kolomikta* и *A. arguta* отмечен на 7 субкультивировании.

Для редких видов темпы развития эксплантов в зависимости от количества субкультивирований существенно отличались. Так, если для *Lepidium meyeri* Claus и *Mathiola fragrans* Bunge (представителей семейства *Brassicaceae*) максимальные значения коэффициента размножения ($12 \pm 0,7$ и $10,5 \pm 0,3$) были зафиксированы на этапе введения в культуру и при первых субкультивированиях, а для представителей семейства *Fabaceae* (*Hedysarum grandiflorum*, *Hedysarum cretaceum*, *Astragalus dasyanthus*) характерна другая закономерность. Максимальный коэффициент размножения ($4,8 \pm 0,5$) наблюдали на 4-5 пассаже.

Наш опыт по укоренению редких видов растений показал, что при использовании полной минеральной основы МС требуются более высокие концентрации ауксинов – от 1,0 мг/л. Использование обедненных питательных сред – Уайта, $\frac{1}{2}$ МС позволяют снизить концентрацию ауксинов – от 0,5 до 1,0 мг/л. В результате проведенных исследований по сокращению беспересадочного периода редких видов растений подобраны оптимальные условия для длительного сохранения растений-регенерантов. Основная часть коллекции растений *in vitro* хранится в климатической камере (SANYO MRL-351H) на питательной среде $\frac{1}{2}$ МС дополненной 6-БАП 0,2 мг/л, сахара (20-30 мг/л), t (3-7°C) и освещенность (500-1200 лк).

Подобраны оптимальные среды для микроразмножения редких и ценных видов растений. На средах с концентрацией 6-БАП от 0,1 до 0,5 мг/л у 90 – 100% растений отмечено отсутствие аномальных побегов и стимуляция развития пазушных почек с образованием 4 – 12 пазушных побегов на одно растение. Установлено увеличение коэффициента размножения при совместном использовании 6-БАП и ИУК. Оптимальное соотношение 6-БАП и ИУК для редких видов является 0,1:0,01 и 0,5:0,05 (мг/л). Из испытанных индукторов ризогенеза наиболее эффективным оказалась ИУК в концентрации 0,5 мг/л и 1,0 мг/л.

Библиографический список

1. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе. учеб. пособие – М.: ФБК-Пресс, 1999. – 160с.
2. Калинин Ф. Л., Кушнир Г. П., Сарнацкая В. В. Технология микрклонального размножения растений. Киев: Наукова думка, 1992. – 488 с.
3. Колбасина Э.И. Актинидии и лимонник в России. М., 2000. – 264с.
4. Крахмалева И.Л., Молканова О.И., Малаева Е.В. Использование клонального микроразмножения для разных форм перспективных сортов *Actinidia kolomikta* (Rupr. et Maxim) Maxim // Бюллетень Государственного Никитского ботанического сада, 2019. – Вып. 133. – С. 80-86.
5. Малаева Е. В. Сохранение редких видов растений в коллекции *in vitro* Волгоградского регионального ботанического сада // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии: Материалы XVIII Междунар. науч.-практ. конф. - Барнаул, 2019. – С. 606 – 610. DOI: 10.14258/pbssm.2019127
6. Молканова О.И. Использование биотехнологических методов для размножения и сохранения редких видов растений // Бюл. ГБС, 2017. – №1(203). – С. 42-48.
7. Молканова О.И., Горбунов Ю.Н., Ширнина И.В., Егорова Д.А. Применение биотехнологических методов для сохранения генофонда редких видов растений // Бот. журн., 2020. – Т. 105. - №6. – С.610-619.
8. Самарская В.О., Малаева Е.В., Постнова М.В. Аспекты клонального микроразмножения и сохранения растений *in vitro* // Природные системы и ресурсы, 2019. – Т.9. – №3. – С.13-22.
9. Семенова Д. А., Крахмалева И. Л., Мишанова Е. В., Молканова О. И., Митрофанова И. В. Особенности регенерации перспективных сортов *Actinidia arguta* в культуре *in vitro* // Таврический вестник аграрной науки, 2023. – № 1(32). – С. 93–103. DOI: 10.5281/zenodo.7898485. EDN: ESJQQT
10. Malaeva E. V., Molkanova O. I. Regeneration peculiarities of *in vitro* berry cultures // Acta Horticulturae, 2021. – Vol. 1324. – P. 89-94. DOI: 10.17660/ActaHortic.2021.1324.13