

***Hedysarum razoumovianum* Fisch. et Helm. ex DC.
в культуре Волгоградского регионального ботанического сада**

***Hedysarum razoumovianum* Fisch. et Helm. ex DC.
in culture of Volgograd regional botanical garden**

Малаева Е. В.^{1,2}, Супрун Н. А.^{1,2}

Malaeva E. V.^{1,2}, Suprun N. A.^{1,2}

¹ Волгоградский региональный ботанический сад, г. Волгоград, Россия. E-mail: e.malaeva@mail.ru

¹ Volgograd Regional Botanical Garden, Volgograd, Russia

² Волгоградский государственный социально-педагогический университет, г. Волгоград, Россия

² Volgograd State Social and Pedagogical University, Volgograd, Russia

Реферат. Наряду с традиционными способами сохранения растений *ex situ* все большее значение приобретает использование для этих целей культуры изолированных тканей и органов. Установлены особенности гормональной регуляции морфогенеза *in vitro* копеечника Разумовского. Подобраны оптимальные концентрации регуляторов роста в питательной среде для этапов индукции развития эксплантов, регенерации микропобегов и их укоренения. Разработка эффективных методов воспроизводства растений является основой работ по сохранению генофонда.

Ключевые слова. Волгоградская область, клональное микроразмножение, копеечник Разумовского, эксплант, *in vitro*.

Summary. The application of isolated plant tissue and organs is getting more and more actual along with traditional plant *ex situ* conservation methods. The peculiarities of hormone regulation of morphogenesis have been established for a *Hedysarum razoumovianum* cultivation. Optimal concentrations of growth regulators for stages of induction of explant development, microshoots regeneration and their rooting have been chosen. The development of reproduction plants methods is the basis of gene pool preservation.

Key words. Clonal micropropagation, explants, *Hedysarum razoumovianum*, *in vitro*, Volgograd region.

На территории Волгоградской области произрастают три вида рода *Hedysarum* L. – *H. grandiflorum* Pall., *H. cretaceum* Fisch. и *H. razoumovianum* Fisch et Helm. ex DC. – все виды занесены в Красную книгу Российской Федерации и Красную книгу Волгоградской области (Демина, Никитина, 2008; Плаксина, 2008; Масленников, Масленникова, 2008; Супрун, 2017; Попов, Супрун, 2017).

На территории Волгоградской области ежегодно проводятся флористические наблюдения, в ходе которых проводится инвентаризация флоры и изучается ее видовой состав. В ходе таких исследований в 2013 г. была обнаружена популяция *H. razoumovianum* на территории Природного парка «Шербаковский», вблизи слияния балок Даниловская и Воднобуерачная, на границе с Саратовской областью, которая является единственным местом произрастания указанного вида для Волгоградской области (Красная книга Волгоградской области, 2017).

Ближайшее местонахождения популяций *H. razoumovianum* в Саратовской области на правом берегу Волги (Вольский, Красноармейский и Хвалынский р-ны) и на левом берегу на границе с Казахстаном (Озинский р-н) (Плаксина, 2001).

Указанная популяция *H. razoumovianum* находится на территории ООПТ и влияние антропогенных факторов здесь ниже, чем на других участках. *H. rasoumovianum* на обнаруженном месте произрастает на холмистых и плакорных участках с выходами карбонатных пород, а также по каменистым склонам оврага южной экспозиции с явными чертами мезофитизации. Особи приурочены к щелнистым осыпям. Популяция малочисленная и насчитывает около 200–300 генеративных особей. Растения проходят весь

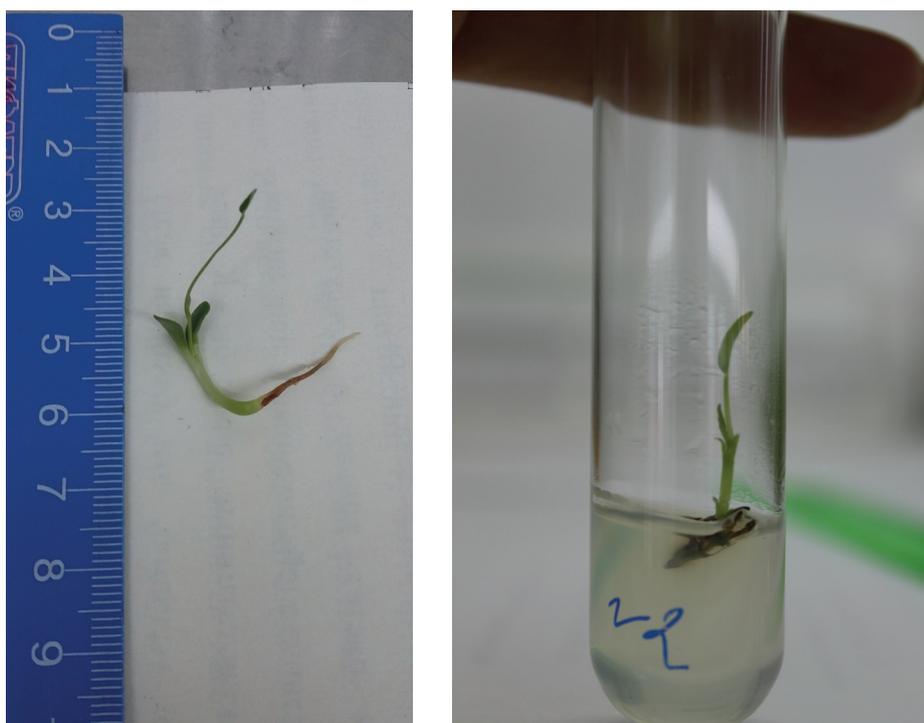


Рис. 1, 2. Стерильные проростки *H. razoumovianum* на этапе введения в культуру *in vitro* (фото Е. В. Малаевой).

жизненный цикл, цветут и образуют семена.

С целью комплексного сохранения данной популяции *H. razoumovianum*, вид культивируется на интродукционном участке ботанического сада и сохраняется в банке стерильных культур в условиях лаборатории биотехнологии. Многие авторы подчеркивают важнейшее значение использования биотехнологического метода как дополнительного варианта сохранения видов *ex situ*, выступающего в качестве их страхового фонда (Андреев, Горбунов, 2000; Benson et al., 2000; Молканова, 2017; Molkanova et al., 2020).

Хранение *in vitro* ценных форм растений является высокоэффек-

тивным и актуальным способом для содержания коллекций растений и сохранения их биологического разнообразия.

В качестве первичных эксплантов для введения в культуру *in vitro* *H. razoumovianum* мы использовали семена, собранные на территории Природного парка «Щербаковский».

Методика биотехнологических исследований базировалась на общепринятых классических приемах с культурами изолированных тканей и органов растений (Бутенко, 1999). Экспланты предварительно обрабатывали 95%-м этиловым спиртом в течение 50–60 секунд. В качестве стерилизатора использовали различные концентрации хлорамина (действующее вещество – натриевая соль хлорамида бензосульфокислоты), гипохлорида натрия в составе бытовой белизны и Лизоформин® 3000 (действующее вещество – глутаровый альдегид, глиоксаль и дидецилдиметиламмоний хлорид) с различной временной экспозицией.

После многократного промывания в стерильной дистиллированной воде экспланты высаживали на безгормональную питательную среду с минеральной основой по прописи Мурасиге-Скуга (Murashige, Skoog, 1962). При оценке оптимального режима стерилизации учитывали количество заросших и количество проросших семян. В условиях *in vitro* растения культивировали в чашках Петри и биологических пробирках при освещении с интенсивностью 3–5 клк, при 16-часовом фотопериоде, температуре 24 °С и относительной влажности воздуха 70 %. Все опыты проводили трижды, повторность в каждом варианте 10-кратная. Полученные стерильные проростки *H. razoumovianum* делили на фрагменты и пересаживали на модифицированные питательные среды для получения пролиферирующей культуры (рис. 1, 2).

Обработку данных проводили с использованием пакета программ Microsoft Office Excel. Полученные данные достоверны при $p < 0,05$.

Правильный выбор стерилизующего вещества заключается в том, чтобы нейтрализовать эпифитную микрофлору и не повредить ткань растения. Именно подбор оптимального режима стерилизации имеет решающее значение для дальнейшего введения вида в культуру *in vitro* (табл. 1).

Использование препарата Лизоформин® 3000 позволило получить максимальный выход стерильных эксплантов *H. razoumovianum*. Оптимальным режимом стерилизации является 5%-й раствор Лизоформин® 3000 в течение 7 минут. В данном случае был получен самый большой процент стерильных эксплантов – 90 %.

Таблица 1

Влияние различных режимов стерилизации на получение стерильных эксплантов *Hedysarum razoumovianum*

Стерилизующий агент	Концентрация стерилизующего агента, %	Количество стерильных эксплантов, %		
		Время экспозиции		
		5 мин	7 мин	10 мин
Лизоформин® 3000	3	33 ± 0,4	55 ± 0,3	45 ± 1,3
	5	80 ± 0,6	90 ± 1,2	65 ± 0,9
	7	35 ± 0,4	55 ± 0,7	35 ± 1,1
Гипохлорид натрия в составе бытовой белизны	10	18 ± 1,2	30 ± 2,1	36 ± 1,9
	20	16 ± 1,3	57 ± 2,4	40 ± 1,8
	30	20 ± 0,6	25 ± 1,4	34 ± 1,0
Хлорамин	7	9,0 ± 0,9	11 ± 1,7	18 ± 0,9
	10	15 ± 0,3	20 ± 4,8	53 ± 7,3
	20	26 ± 1,1	34 ± 0,5	40 ± 1,4

Примечание: заливкой отмечен оптимальный режим стерилизации эксплантов *Hedysarum razoumovianum*.

Следует отметить, что с увеличением времени экспозиции и концентрации увеличивается процент стерильных эксплантов, но в то же время уменьшается процент проросших семян.

Также были исследованы всхожесть и динамика прорастания в зависимости от состава питательной среды. Семена *H. razoumovianum* начали прорастать на 9 день после введения в культуру *in vitro*. Причем наблюдалось заметное отличие динамики прорастания семян на жидкой и твердой питательной среде МС в сравнении с лабораторной всхожестью. В процентном соотношении процент проросших семян на твердой, жидкой питательной среде составил – 30, 60 и 70 % соответственно.

Наш опыт культивирования редких видов растений показал наличие положительного эффекта при совместном использовании 6-БАП и ИУК (Малаева, 2019). На предварительном этапе работы, с целью подбора оптимального сочетания гормонов, было использовано 34 варианта среды с различными комбинациями ауксинов и цитокининов. Максимальный коэффициент размножения на средах, содержащих только 6-БАП, составил 28 (концентрация 6-БАП – 2,5 мг/л), при совместном использовании 6-БАП и ИУК максимальный коэффициент размножения составил 31 (табл. 2). Таким образом, использование более высоких концентраций цитокининов (6-БАП ≥ 1,0 мг/л) способствовало значительному увеличению коэффициента размножения у *H. razoumovianum*.

Таблица 2

Влияние концентрации 6-БАП и ИУК на коэффициент размножения *H. razoumovianum*

6-БАП (мг/л)	Концентрация ИУК (мг/л)					
	0	0,01	0,03	0,05	0,07	0,1
0	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1
0,1	2,0 ± 0,9	7,0 ± 0,3	5,0 ± 1,3	4,0 ± 0,9	5,0 ± 0,7	3,0 ± 0,4
0,3	8,0 ± 0,4	9,0 ± 0,3	6,0 ± 0,7	9,0 ± 1,9	8,0 ± 0,5	5,0 ± 0,4
0,5	10,0 ± 1,3	7,0 ± 0,2	19,0 ± 0,8	19,0 ± 0,8	19,0 ± 1,1	4,0 ± 0,5
0,7	17,0 ± 1,0	14,0 ± 0,8	17,0 ± 0,3	15,0 ± 1,2	16,0 ± 0,5	11,0 ± 1,7
1,0	12,0 ± 0,5	31,0 ± 1,1	-	20,0 ± 1,0	-	-

Примечание: заливкой отмечено оптимальное соотношение 6-БАП и ИУК для размножения *Hedysarum razoumovianum* в культуре *in vitro*.

Однако появлялись обводненные (витрифицированные) побеги аномальной морфологии.

В результате проведенных исследований, было подобрано оптимальное соотношение ауксинов и цитокининов (6-БАП 0,1 мг/л и ИУК 0,01 мг/л). При этом формировались побеги нормальной морфологии, а коэффициент размножения для *H. razoumovianum* при этом составил 7,0 ± 0,3.



Рис. 3. *H. razoumovianum* на этапе микроразмножения (фото Е. В. Малаевой).

На питательных средах с низкой концентрацией 6-БАП (0,1-0,5 мг/л) у 80–90 % растений отсутствовали аномальные побеги, и отмечалась стимуляция развития пазушных почек.

Для *H. razoumovianum* максимальный коэффициент размножения ($7,0 \pm 0,3$) наблюдали на 4–5 пассаже.

Дальнейшее культивирование на питательной среде МС, дополненной 6-БАП в концентрации 0,5 мг/л приводило к значительному снижению коэффициента размножения и появлению морфологических изменений побегов: укорочение междоузлий, уменьшение размеров и формы листьев, а также появление витрифицированных побегов. В ходе экспериментов разработана следующая схема культивирования *H. razoumovianum*: 4 пассажа на оптимальной питательной среде (6-БАП 0,1 мг/л и ИУК 0,01 мг/л), затем 1 пассаж на питательной среде МС, не содержащей фитогормонов или $\frac{1}{2}$ МС.

Указанная схема чередования сред обеспечивает максимальных коэффициент размножения и длительное сохранение культуры. Результаты экспериментов по подбору сред на этапе укоренения показывают значительные отличия процента укоренения в зависимости от концентрации ауксинов, применяемых для индукции ризогенеза.

В ходе работы изучали влияние ИУК и ИМК на процесс ризогенеза у *H. razoumovianum*. Укореняемые побеги *H. razoumovianum* высаживали на питательные среды, минеральную основу которых составляла $\frac{1}{2}$ МС с добавлением 20 г/л сахарозы, 6,5 г/л агара и набора витаминов как в основной среде.

Наш опыт по укоренению *H. razoumovianum* показал, что при использовании полной минеральной основы МС требуются более высокие концентрации ауксинов – от 1,0 мг/л. Использование питательной среды $\frac{1}{2}$ МС позволяют снизить концентрацию ауксинов – от 0,3 до 0,5 мг/л. Выход адаптированных растений-регенерантов *H. razoumovianum* составил от 30 до 40 %.

Создание коллекций *in vitro* можно рассматривать как одну из форм охраны растений природной флоры и как эффективный метод сохранения их биоразнообразия *ex situ*, что составляет часть общей стратегии охраны растений, направленной на сохранение видов в природе.

При организации работ с редкими видами растений следует использовать комплексный подход, который позволит эффективно планировать и реализовывать программы по сохранению биоразнообразия.

ЛИТЕРАТУРА

Андреев Л. Н., Горбунов Ю. Н. Сохранение редких и исчезающих растений *ex situ*: достижения и проблемы // Изучение и охрана разнообразия фауны, флоры и основных экосистем Евразии: Материалы междунар. конф. – М., 2000. – С. 19–23.

Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: учебное пособие. – М.: ФБК-Пресс, 1999. – 160 с.

Демина О. Н., Никитина С. В. Копеечник крупноцветковый (*Hedysarum grandiflorum* Pall.) // Красная книга Российской Федерации (растения и грибы) / под ред. Л. В. Бардунова, В. С. Новикова. – М.: изд-во, 2008. – С. 240–241.

Красная книга Волгоградской области Т. 2. Растения и другие организмы / под ред. О. Г. Барановой, В. А. Сагаляева. – Воронеж: ООО «Издат-Принт», 2017. – С. 255.

- Малаева Е. В.** Сохранение редких видов растений в коллекции *in vitro* Волгоградского регионального ботанического сада // Проблемы Южной Сибири и Монголии, 2019. – № 18. – С. 606–610. DOI: 10.14258/pbssm.2019127
- Масленников А. В., Масленникова Л. А.** Копеечник Разумовского (*Hedysarum razoumovianum* Fisch. et Helm. // Красная книга Российской Федерации (растения и грибы) / под ред. Л. В. Бардунова, В. С. Новикова. – М.: изд-во, 2008. – С. 242–243.
- Молканова О. И.** Использование биотехнологических методов для размножения и сохранения редких видов растений // Бюл. ГБС, 2017. – № 1(203). – С. 42–48.
- Плакцина Т. И.** Конспект флоры Волго-Уральского региона. – Самара: Изд-во СГУ, 2001. – 388 с.
- Плакцина Т. И.** Копеечник меловой (*Hedysarum cretaceum* Fisch.) // Красная книга Российской Федерации (растения и грибы) / под ред. Л. В. Бардунова, В. С. Новикова. – М.: изд-во, 2008. – С. 238–239.
- Попов А. В., Супрун Н. А.** Копеечник Разумовского (*Hedysarum razoumovianum* Fisch. et Helm. // Красная книга Волгоградской области Т. 2. Растения и другие организмы / под ред. О. Г. Барановой, В. А. Сагалаева. – Воронеж: ООО «Издат-Принт», 2017. – С. 137.
- Супрун Н. А.** Копеечник крупноцветковый (*Hedysarum grandiflorum* Pall.) // Красная книга Волгоградской области. Т. 2. Растения и другие организмы / под ред. О. Г. Барановой, В. А. Сагалаева. – Воронеж: ООО «Издат-Принт», 2017. – С. 136.
- Супрун Н. А.** Копеечник меловой (*Hedysarum cretaceum* Fisch.) // Красная книга Волгоградской области Т. 2. Растения и другие организмы / под ред. О. Г. Барановой, В. А. Сагалаева. – Воронеж: ООО «Издат-Принт», 2017. – С. 135.
- Benson E. E., Danaher J. E., Pimbley I. M., Anderson C. T., Wake J. E., Daley S., Adams L. K.** *In vitro* micropropagation of *Primula scotica*: a rare Scottish plant // Biodiversity and conservation, 2000. – Vol. 9. – P. 711–726.
- Molkanova O. I., Shirnina I. V., Konovalova T. Yu.** Biotechnological methods of Rare plant species cultivation // Skvortsovia: International Journal of Salicology and Plant Biology, 2020. – Vol. 6, № 2. – С. 65–66.
- Murashige T., Skoog F.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Phsiol. lant., 1962. – Vol. 15, № 3. – P. 473–497.