

Особенности обработки семян редких и исчезающих видов растений Якутии к культивированию *in vitro*

Features of seed treatment of rare and endangered species of plants of Yakutia for *in vitro* cultivation

Охлопкова Ж. М.¹, Охлопкова Т. М.¹, Гуляев И. Р.², Якименко А. С.², Кучарова Е. В.¹

Okhlopkova Z. M.¹, Okhlopkova T. M.¹, Gulaev I. R.², Yakimenko A. S.², Kucharova E. V.¹

¹ Северо-Восточный федеральный университет, г. Якутск, Россия
E-mails: zhm.okhlopkova@s-vfu.ru, tay29it@gmail.com, oleneek@mail.ru
¹ North-Eastern Federal University, Yakutsk, Russia

² МОБУ СОШ №20, г. Якутск, Россия. E-mails: igorgulaev44509@gmail.com, playchel20@gmail.com
² MEBI Secondary School N20, Yakutsk, Russia

Реферат. Целью исследования является разработка эффективных протоколов стерилизации семян редких и исчезающих видов растений Якутии для введения их в культуру *in vitro*. Объектами исследования являются *Dracocephalum jacutense*, *Krascheninnikovia lenensis*, *Phlojodicarpus sibiricus*, *Lilium pilosiusculum* и *Artemisia martjanovii*. Семена объектов исследования были собраны во время экспедиционных работ на территории районов Западной, Восточной, Центральной и Южной Якутии. Семена после сушки и камеральной обработки хранились в условиях холодильника. Изучены линейные размеры, форма и состояние поверхности семян. Для каждого вида растения были разработаны и апробированы разные протоколы поверхностной обработки семян. В качестве стерилизующих агентов были использованы гипохлорид натрия, этиловый спирт, перекись водорода, раствор дезинфицирующего средства «Доместос», раствор перманганата калия и др. После апробации разных способов поверхностной обработки семян объектов исследования отобраны эффективные протоколы подготовки и стерилизации семян. Получены стерильные проростки редких и исчезающих видов растений Якутии. Проростки доведены до развития 4–5 настоящих листьев и использованы для получения разных эксплантов к введению объектов исследования в культуру *in vitro*.

Ключевые слова. Поверхностная обработка, редкие и исчезающие виды растений, семена, Якутия.

Summary. The aim of the study is to develop effective sterilization protocols for seeds of rare and endangered plant species of Yakutia for their introduction into *in vitro* culture. The objects of the study are *Dracocephalum jacutense*, *Krascheninnikovia lenensis*, *Phlojodicarpus sibiricus*, *Lilium pilosiusculum* and *Artemisia martjanovii*. The seeds of the objects of the study were collected during expeditionary work in the regions of Western, Eastern, Central and Southern Yakutia. After drying and treatment, the seeds were stored in a refrigerator. The linear dimensions, the shape and condition of the seed surface were studied. For each plant species, different protocols for surface treatment of seeds were developed and tested. Sodium hypochlorite, ethyl alcohol, hydrogen peroxide, Domestos disinfectant solution, potassium permanganate solution, etc. were used as sterilizing agents. After testing different methods of surface treatment of the seeds of the objects under study, effective protocols for seed preparation and sterilization were selected. Sterile sprouts of rare and endangered plant species of Yakutia were obtained. The sprouts were brought to the development of 4–5 true leaves and used to obtain different explants for introducing the objects of study into *in vitro* culture.

Key words. Rare and endangered plant species, seeds, surface treatment, Yakutia.

Введение. Сокращение биоразнообразия видов стало основой одного из ключевых вопросов протокола современного мира. Чрезмерная антропогенная нагрузка, развитие и расширение технологических процессов и видов промышленности зачастую с несоблюдением экологических норм и требований, наносят урон природным растительным ресурсам, сокращая естественный ареал и численность редких, исчезающих, эндогенных, лекарственных и еще до конца не изученных, в меру своей малой численности, растений. Особую нагрузку испытывают северные и арктические территории, где идут ускоренные темпы освоения и заложения новых видов промышленной и хозяйственной деятельности.

Красная книга Республики Саха (Якутия) (2017) включает 249 видов покрытосеменных растений, 3 вида голосеменных, 1 – плауновидных, 13 – папоротниковидных, 21 – мхов, 17 – печеночников, 21 – лишайников, 11 – грибов, 1 вид водоросли. Внесенные в Книгу растения являются крайне редкими видами и подвидами, реликтами, обладают узким ограниченным ареалом, сокращены в численности в результате чрезмерного использования их человеком, находятся под угрозой исчезновения (Красная книга ..., 2017).

Методы биотехнологии растений *in vitro* позволяют преодолеть трудности традиционных способов размножения, позволяя получить качественный посадочный материал, а также решить проблему сохранения редких видов.

Целью настоящего исследования является разработка эффективных протоколов стерилизации семян редких и исчезающих видов растений, занесенных в Красную книгу Якутии (2017) для введения их в культуру *in vitro*.

Материалы и методы. Сбор семян объектов исследования произведен в разные годы во время экспедиционных работ на территории районов Западной, Восточной, Центральной и Южной Якутии (табл. 1). Семена собирались в соцветиях и (или) цветках в пакетики из крафтовой и кальковой бумаги с указанием видового названия растения, места и даты сбора. После транспортировки семена сушили на горизонтальной поверхности в присутствии потока воздуха в течение нескольких дней, после сушки семена обратно упаковывали в пакетики и хранили при 4–6 °С в условиях холодильника до использования в разных экспериментах.

Таблица 1

Объекты исследования: категория редкости видов, место и дата сбора семян

№	Видовое название на латинском языке	Видовое название на русском языке	Категория и статус редкости вида в Якутии	Место сбора семян	Дата сбора семян
1	<i>Dracocephalum jacutense</i> Peschkova	Змееголовник якутский	1	Кобяйский район РС(Я), окр. п. Сангар	22.07.2022; 04.08.2023
2	<i>Krascheninnikovia lenensis</i> (Kumin.) Tzvel.	Крашенинниковия ленская	2 а	Хангаласский район РС(Я), окр. с. Немюгюнцы	17.09.2023
3	<i>Phlojodicarpus sibiricus</i> Fisch. ex Spreng (Koso-Pol.)	Вздутоплодник сибирский	2 б	Олекминский район РС(Я), каменная гора по р. Чара в 20 км от п. Бэс-Кюель	26.07.2018
4	<i>Lilium pilosiusculum</i> (Freyn) Miscz.	Лилия кудреватая	2	Нюрбинский район РС(Я), окр. с. Жархан	15.08.2022
5	<i>Artemisia martjanovii</i> Krasch. ex Poljakov	Полынь Мартянова	3 д	Хангаласский район РС(Я), окр. с. Еланка	17.09.2023

Результаты и обсуждение. Семена редких и исчезающих видов растений Якутии были рассмотрены под биноклем на фоне миллиметровой бумаги для изучения их линейных размеров (табл. 2). При этом семена рассматривали с разных сторон меняя их положение с помощью пинцета. Полученные данные вместе с характеристиками семян других видов растений, произрастающих в разных районах Якутии, собранных в разные годы экспедиционных работ, были включены в базу данных (Федотова и др., 2023).

Таблица 2

Линейные размеры семян объектов исследования

№	Видовое название	Линейные размеры семян		
		Длина (мм)	Ширина (мм)	Диаметр (мм)
1	<i>Dracocephalum jacutense</i>	2,7–3,2	1,5–1,6	1,4–1,5
2	<i>Krascheninnikovia lenensis</i>	4,2–4,5	3,5–3,7	3,3–3,5
3	<i>Phlojodicarpus sibiricus</i>	4,0–4,1	2,2–2,3	0,7–0,9
4	<i>Lilium pilosiusculum</i>	6,2–6,4	4,8–5,0	0,7–1,1
5	<i>Artemisia martjanovii</i>	1,1–1,2	0,9–1,0	0,8–0,9

Форма семян *Dracoscephalum jacutense* удлинненно-овальная, темно-коричневые с продольными прерывистыми бороздками на поверхности. Семена *Krascheninnikovia lenensis* треугольные опушенные, беловато-светло-желтые. Семена *Phlojodicarpus sibiricus* овальные, уплощенные, светло-желтые с темно-зелеными полосками, по краям светлые, поверхность – шероховатая. Семена лилии кудреватой округло-треугольной формы с пленчатыми краями светло-коричневой и коричневой окраски, плоские гладкие. Семена *Artemisia martjanovii* немного округленные, темно-коричневые, гладкие.

Для каждого вида растения были разработаны и апробированы разные протоколы поверхностной обработки семян (стерилизации семян). В качестве стерилизующих агентов были использованы гипохлорид натрия, этиловый спирт, перекись водорода, раствор дезинфицирующего средства «Доместос», раствор перманганата калия и др. Перед поверхностной обработкой семена всех рассмотренных редких видов растений промывали проточной водой в течение 1,5 ч. Затем приступали к протоколам стерилизации.

К примеру, для стерилизации семян змееголовника якутского было разработано и апробировано шесть протоколов с сочетанием разных стерилизующих агентов и разной продолжительности обработки. При применении протоколов №1–5 семена объекта исследования имели определенный процент контаминации либо не прорастали, либо появившиеся проростки погибали в течение последующих нескольких дней (табл. 3).

Таблица 3

Протоколы №1–5 для поверхностной обработки семян змееголовника якутского

№	Стерилизующий агент	Концентрация, в %	Время выдержки, в мин
Протокол №1			
1	Гипохлорид натрия	2	5
2	Автоклавированная дистиллированная вода		Полоскание 3 раза
3	Этиловый спирт	95	5
4	Автоклавированная дистиллированная вода		Полоскание 3 раза
5	Сушка в потоке воздуха		10
Протокол №2			
1	Гипохлорид натрия	2	10
2	Автоклавированная дистиллированная вода		Полоскание 3 раза
3	Этиловый спирт	95	5
4	Автоклавированная дистиллированная вода		Полоскание 3 раза
5	Сушка в потоке воздуха		10
Протокол №3			
1	Гипохлорид натрия	2	6
2	Автоклавированная дистиллированная вода		Полоскание 3 раза
3	Этиловый спирт	70	5
4	Автоклавированная дистиллированная вода		Полоскание 3 раза
5	Сушка в потоке воздуха		10
Протокол №4			
1	Стратификация в течение 3-х суток		
2	Перекись водорода	3	45
3	Автоклавированная дистиллированная вода		Полоскание 3 раза
4	Сушка в потоке воздуха		15–20
Протокол №5			
1	Перекись водорода	3	45
2	Автоклавированная дистиллированная вода		Полоскание 3 раза
3	Этиловый спирт	70	5
4	Автоклавированная дистиллированная вода		Полоскание 3 раза
5	Сушка в потоке воздуха		15–20

При применении протокола №6 семена змееголовника якутского помещали в конические пробирки на 15 мл с крышками и после добавления стерилизующего агента пробирки вставляли в платформы ротатора для пробирок Multi RS-60 (BioSan, Латвия) и вращали в течение определенной продолжительности времени, также поступали и при ополаскивании семян автоклавированной дистиллированной водой после применения каждого стерилизующего агента (табл. 4).

Таблица 4

Протокол №6 для поверхностной обработки семян змееголовника якутского

№	Стерилизующий агент	Концентрация, в %	Время выдержки, в мин
1	Дистиллированная вода		40
2	Гипохлорид натрия	2	20
3	Автоклавированная дистиллированная вода		10
4	Перекись водорода	3	15
5	Автоклавированная дистиллированная вода		10
6	Этиловый спирт	70	2
7	Автоклавированная дистиллированная вода		10
8	Сушка в потоке воздуха ламинарного бокса		20–25

Семена змееголовника якутского, обработанные по протоколу №6, после посадки на безгормональную питательную среду МС были без контаминации (рис. 1).

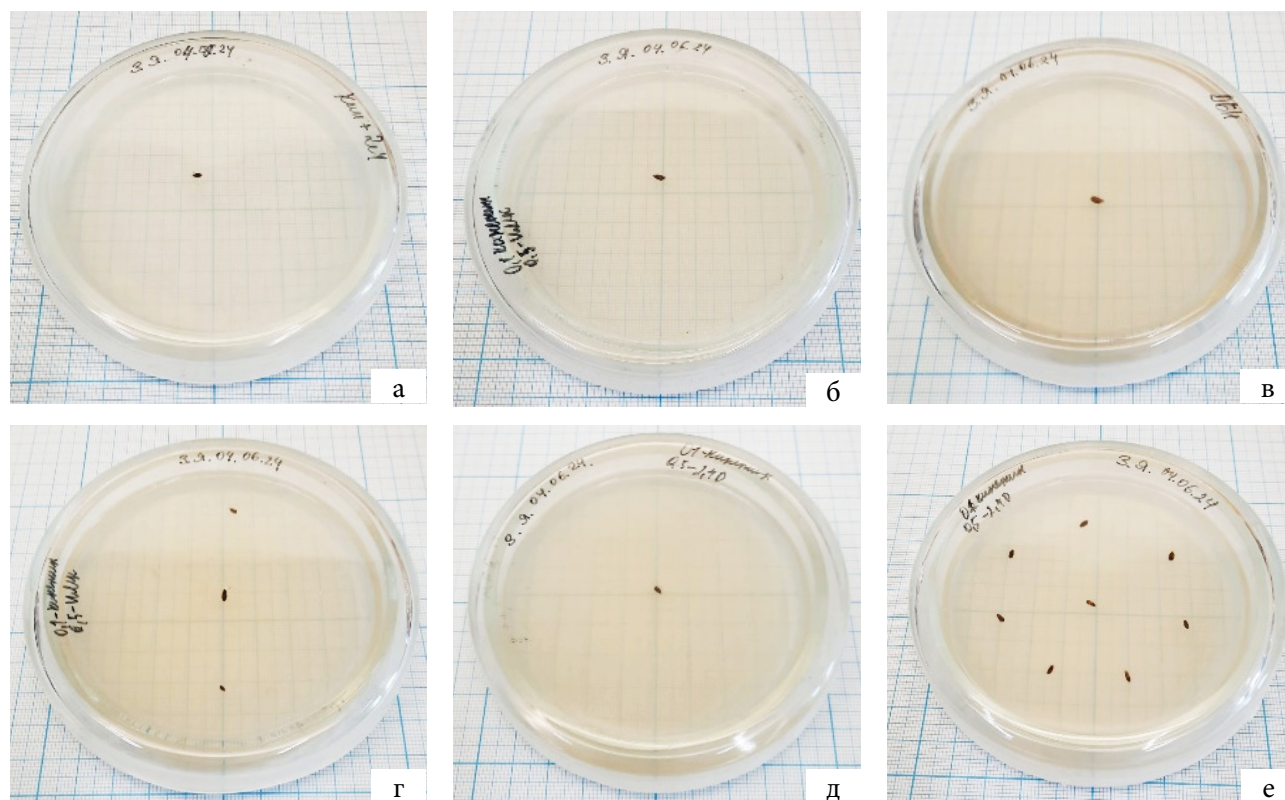


Рис. 1. Проверка эффективности обработки семян змееголовника якутского по протоколу №6 на третьи сутки (а, б, в, г, д, е – повторности посадок семян на безгормональную питательную среду МС).

При проращивании семян змееголовника якутского на 7-ые сутки наблюдали проклевывание семян, после которого каждое семя переносили в конические колбы на 100, 250 мл и банки на 200 мл с новой питательной средой МС без добавления гормонов. Развитие стерильных проростков змееголовника якутского на 14-ые сутки показано на рисунке 2.

Заключение. Для введения в культуру *in vitro* объектов исследования ключевую роль играет подготовка и обработка семян к получению стерильных проростков. На подготовку и обработку семян

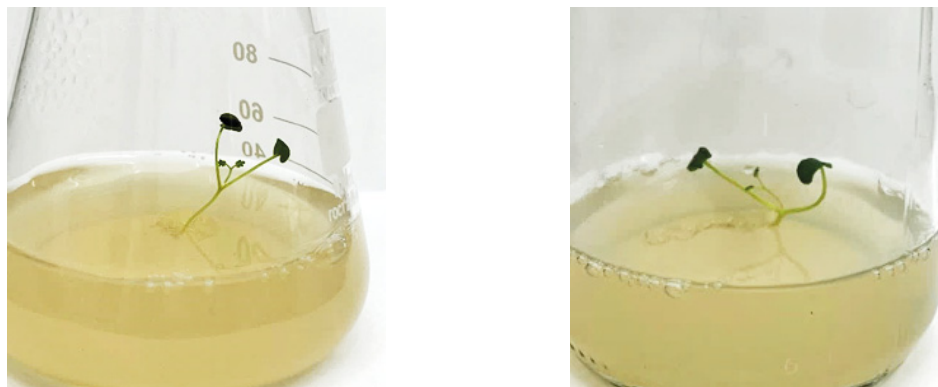


Рис. 2. Стерильные проростки змееголовника якутского на 14-ые сутки проращивания на питательной среде МС без гормонов в условиях фитостеллажа.

влияют особенности морфологического строения семян. После апробации разных способов поверхностной обработки семян объектов исследования отобраны эффективные протоколы подготовки и стерилизации семян. Получены стерильные проростки редких и исчезающих видов растений Якутии. Проростки доведены до развития 4–5 настоящих листьев и использованы для получения разных эксплантов к введению объектов исследования в культуру *in vitro*.

Финансирование. Исследование выполнено в Северо-Восточном федеральном университете за счет гранта Российского научного фонда №22–14–20031, <https://rscf.ru/project/22-14-20031/>.

ЛИТЕРАТУРА

Красная книга Республики Саха (Якутия). Т. 1: Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды растений и грибов / Отв. ред. Н. С. Данилова. – М.: Изд-во «Реарт», 2017. – 412 с.

Федотова К. С., Охлопкова Т. М., Егоров Ю. А., Кучарова Е. В., Антонова Е. Е., Охлопкова Ж. М. Свидетельство о государственной регистрации базы данных РФ №2023622085 «База данных коллекции семян дикорастущих растений Якутии». Дата выдачи 23.06.2023 г.