

О. К. Таварткиладзе,
Н. А. Вечернина

O. Tavartkiladze,
N. Vechernina

**МЕТОДЫ IN VITRO ДЛЯ РАЗМНОЖЕНИЯ И СОХРАНЕНИЯ
FRITILLARIA MELEAGRIS L. И FRITILLARIA VERTICILLATA WILD.**

**IN VITRO METHODS FOR MICROPROPAGATION AND
KEEPING OF FRITILLARIA MELEAGRIS L. AND FRITILLARIA
VERTICILLATA WILD.**

Все чаще из-за изменения естественных мест обитания происходит потеря популяций многих видов растений. К проблеме сохранения таких видов существует два подхода: сохранить *in situ* образцы необходимых видов или разработать какие-то средства сохранения материала *ex situ*, например, путем создания разнообразных коллекций генофонда, в том числе в огромной сети ботанических садов. Не является исключением и Южно-сибирский ботанический сад. Одно из важнейших направлений научно-исследовательской деятельности которого состоит в решении проблемы сохранения редких и исчезающих видов флоры Алтая, интродукции их в ботанический сад с целью изучения биологии развития и дальнейшей реинтродукции.

Растения, собранные в коллекции ЮСБС, оценены на перспективность для дальнейшего введения в культуру и распределены в три основные группы: очень перспективные, перспективные и мало перспективные для интродукции (Голяков, 1995; Александрова, Голяков, 1995). Если для первых двух групп растений не возникает особых сложностей при выращивании их в коллекции ботанического сада, то для третьей группы обычные методы хранения живой ткани в вегетативной форме лимитируются трудностями создания оптимальных условий для их произрастания, а семена их, как правило, теряют всхожесть при хранении.

Третья, малоперспективная для интродукции группа, представлена в основном редкими и исчезающими видами. Поэтому актуальным является разработка альтернативных подходов к проблеме сохранения этих растений.

Существует несколько способов хранения биологических объектов, суть их сводится либо к хранению, не нарушая процессов роста, либо к хранению при остановке роста. Альтернативой обычным методам сохранения генофонда растений может стать система *in vitro*. Она имеет преимущества перед обычными методами хранения генофонда: отпадает необходимость в большой площади земли и регулярном уходе за посадками, кроме того, исключается возможность потери растений из-за заболеваний (Уизерс, 1987).

Альтернативный метод хранения генофонда должен удовлетворять ряду требований. Одним из важнейших требований является сохранение генетической стабильности. Генетическая нестабильность в неорганизованных культурах клеток и тканей может быть результатом трех факторов: генетической изменчивости клеток экспланта, мутационного действия условий культивирования *in vitro* и давления отбора *in vitro* (Хеншоу, О Хара, 1987). Относительная степень влияния каждого из этих факторов различается в зависимости от вида растений и условий культивирования. Организованные культуры, в которых размножение основано на образовании стеблевых меристем, являются более пригодными для длительного хранения генофонда растений. Кроме того, в целях экономии материальных затрат и уменьшения трудоемкости, связанной с частыми пересадками культур, организованные структуры могут храниться при пониженной положительной температуре до одного года. Для их хранения достаточно обычного холодильника.

Основным этапом в этой работе является получение в достаточном количестве

организованных структур, то есть овладение процессами регенерации. Поэтому необходимо для каждого вида разработать методы культивирования, способствующие регенерации и микроразмножению растений в культуре *in vitro*. Особенностью работы с редкими и исчезающими видами растений является их малое количество и, в связи с этим, особая тщательность и осторожность в подборе условий для введения различных их частей в асептическую культуру.

Рябчик шахматный (*Fritillaria meleagris* L.) рябчик мутовчатый (*Fritillaria verticillata* Willd.) являются одними из представителей обширного списка видов, находящихся в настоящее время в угрожаемом состоянии. Это декоративные, раноцветущие растения, внесенные в региональную Красную книгу для местной флоры (1980). В природе популяции этих видов сокращаются в результате систематического сбора на букеты и из-за уничтожения естественных мест обитания. В коллекции ЮСБС эти виды отнесены к группе малоперспективных для интродукции.

Рябчик шахматный и рябчик мутовчатый - луковичные геоэфемероиды. Луковицы ювенильных растений мелкие, одночешуйные. Виргинильные растения на второй год жизни формируют двухчешуйную луковицу. У генеративных растений луковицы округлые, слегка сплюснутые с боков, до 17 мм в диаметре, заглубленные в почву. И уже в период цветения внутри материнской луковицы сформирована дочерняя с полностью дифференцированным побегом будущего года. Монокарпический побег формируется два года, в генеративную фазу растения вступают на 5-6 год жизни. Семенная продуктивность от 130 до 170 семян на один побег. Семена, попавшие в благоприятные условия, прорастают в мае следующего года, а другие - частично сохраняют всхожесть и прорастают через год, то есть спустя два года после созревания семян. При хранении в лабораторных условиях, семена быстро теряют всхожесть (Лубягина, Ершова, 1987; 1990).

Для экспериментов и разработки методов регенерации и микроразмножения рябчика шахматного и рябчика мутовчатого в середине июня было взято по одной луковице каждого вида. Луковицы в течение месяца выдерживали в холодильнике, а затем вводили в культуру *in vitro*. Так как мы были ограничены в количестве растительного материала с учетом того, что все подземные части растений очень сильно загрязнены разнообразной микрофлорой, каждую луковицу делили на три части и подбирали режимы поверхностной стерилизации отдельно для каждой из этих частей. Стерилизацию проводили 0.1% раствором сулемы. Время выдерживания растительного материала (экспозиция) варьировала от 7 до 30 минут. По окончании стерилизации раствор сулемы сливали, а части луковиц четырежды промывали стерильной водой, затем каждую часть делили на 20 небольших фрагментов и помещали на безгормональную питательную среду Гамборга с 3% сахарозой, 0.8% агаром и дополненную 1000 мг/л гидролизатом казеина - для более быстрого развития микрофлоры. Через неделю проводили наблюдения. Результаты введения фрагментов луковиц двух видов рябчика представлены в таблице 1.

Таблица 1

Влияние экспозиции 0.1% раствора сулемы на выход жизнеспособных эксплантов
луковиц рябчика шахматного и рябчика мутовчатого (n=20)

Экспозиция, мин.	<i>F.meleagris</i> L.		<i>F.verticillata</i> Willd.	
	Инфицированность шт./%	Жизнеспособность шт./%	Инфицированность шт./%	Жизнеспособность шт./%
7	20/100	0/0	20/100	0/0
15	12/60	7/88	10/50	10/100
30	4/20	13/81	6/30	12/86

Данные таблицы продемонстрировали, что оптимальная экспозиция - 30 минут, хотя % жизнеспособных эксплантов уменьшался из-за токсического действия сулемы на растительные

ткани, общий выход жизнеспособных эксплантов был выше за счет увеличения количества неинфицированных эксплантов.

Все жизнеспособные экспланты в 1-пассаже помещали на питательные среды с различным соотношением регуляторов роста ауксиновой и цитокининовой природы. Культивировали в условиях фотопериода 16/8 свет/темнота. При повышенном содержании ауксина 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) по сравнению с цитокинином 6-бензиламинопурином (БАП) (10 и 0.5 мкМ, соответственно), развивался каллус, характеризующийся медленными темпами роста, неморфогенный. Морфология каллуса и его темпы роста у двух видов рябчика были схожи.

Использование в составе питательной среды только цитокинина БАП (5 мкМ) или более высокое содержание БАП по сравнению с ауксинами 2,4-Д или нафтилуксусной кислоты (НУК) (5 и 2 мкМ, соответственно) индуцировало развитие меристематических клеток экспланта, то есть происходила прямая регенерация микролуковичек. Характер ответа эксплантов двух изучаемых видов был одинаков. Но частота ответа была выше для эксплантов р. шахматного (3-4 шт./экспл.), чем для эксплантов р. мутовчатого (1-2 шт./экспл.). На характер ответа не оказала влияние природа использованных ауксинов, большее значение имело повышенное содержание в питательной среде цитокинина по сравнению с ауксином. Так как на одних и тех же питательных средах типы ответов у двух изучаемых видов были одинаковы то только различным количеством меристематических клеток в тканях эксплантов можно объяснить разницу в количестве регенерированных микролуковичек.

Во 2-пассаже микролуковички отделяли и культивировали на питательной среде с 5 мкМ БАП + 5 мкМ НУК. Часть микролуковичек культивировали в условиях темноты, другую часть - в условиях фотопериода. Независимо от условий культивирования и видовой принадлежности, микролуковички увеличивались в размере в 3-4 раза от первоначального. Их развитие больше зависело от гормонального состава среды, чем от условий освещения. К концу второго пассажа наблюдали заложение и развитие 3-4 адвентивных микролуковичек на базальной части луковичек-регенерантов, которые в 1-пассаже регенерировали на среде, содержащей только регулятор роста цитокининовой природы (БАП). Адвентивные луковички при отделении и пассировании их на ту же среду продолжали увеличиваться в размере. Пересадка микролуковичек (3-пассаж) на свежую безгормональную среду способствовало дальнейшему росту и увеличению размеров: в 10 раз от первоначального. Некоторые микролуковички к концу 2-го пассажа, остальные к концу 3-го пассажа, становятся слегка сплюснутыми с боков, рыхлыми, распадающимися на 2 чешуи, имеют меристематическую верхушку побега. Если такие луковички продолжать культивировать, то может развиваться побег. Микролуковички, имеющие размеры в 10 раз большие от первоначального, можно хранить в холодильнике в нерастущем состоянии. Часть таких луковичек-регенерантов помещена на хранение, с другой частью продолжают эксперименты.

Таким образом, не смотря на ограниченное количество растительного материала, подобран режим поверхностной стерилизации и введены в культуру *in vitro* два вида рябчика - шахматный и мутовчатый. Изучены и особенности регенерации и размножения микролуковичек, установлена зависимость этого процесса от наличия в среде БАП. Регенерированные микролуковички ускоренно развивались и после трех пассажей становились морфологически схожи с луковицами генеративных растений. Хранящиеся микролуковички в нерастущем состоянии позволят снизить частоту мутаций и по мере надобности могут вновь культивироваться и регенерировать полноценные растения этих редких видов.

ЛИТЕРАТУРА

Александрова О. В., Голяков П. В. Об итогах интродукции травянистых многолетников

- Алтая//Флора и растительность Алтая. - Барнаул, 1995. - С. 141-147.
- Голяков П. В. Некоторые итоги интродукции растений на теневом участке ЮСБС//Флора и растительность Алтая. - Барнаул, 1995. - С. 131-133.
- Лубягина Н. П., Ершова Э. А. Рябчик шахматный на Алтае//Исчезающие, редкие и слабо изученные растения и животные Алтайского края и проблемы их охраны. - Барнаул, 1987. - С. 14-15.
- Лубягина Н. П., Ершова Э. А. Рябчик шахматный - растение, нуждающиеся в охране// Бюлл. Гл. Бот. сада. - М.:Наука, 1990.- вып. 154. - С. 30-34.
- Редкие и исчезающие растения Сибири. - Новосибирск: Наука, 1980. - 224 с.
- Уизерс Л. А. Хранение ткани при биотехнологии растений//Биотехнология сельскохозяйственных растений. - М.: ВО Агропромиздат, 1987. - С. 176-204.
- Хеншоу Г. Г., О Хара Дж. Ф. Методы in vitro для сохранения и использования мирового генофонда растений//Биотехнология сельскохозяйственных растений. - М., 1987. - С. 205-224.

SUMMARY

The results of in vitro regeneration and micropropagation of two rear and disappear species (*Fritillaria meleagris* L. and *Fritillaria verticillata* Wild.) are demonstrated.