

Сборник статей по материалам

III Всероссийской
научно-практической конференции

«Биотехнология как инструмент
сохранения биоразнообразия
растительного мира»



Волгоград
4—6 августа 2010

Издательство AVATARS
России, Волгоград, 400078, пр-т. Ленина, д. 100
www.avatars.ru

УДК 577:58
ББК 28.5

Сборник статей по материалам III Всероссийской научно-практической конференции «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира», Волгоград, 4–6 августа 2010 – Волгоград: Изд-во AVATARS, 2010. – 370 с.

ISBN 978-5-905045-01-1

В сборнике представлены статьи III Всероссийской научно-практической конференции «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира». Рассмотрены теоретические и прикладные основы биотехнологии как инструмента сохранения биоразнообразия растительного мира по четырём направлениям: современные методы исследования и сохранения редких и исчезающих видов растений; создание коллекций культур клеток и тканей растений и методы сохранения генофонда; микрклональное размножение растений: научные и практические аспекты; молекулярно-генетические методы в изучении биоразнообразия растений.

УДК 577:58
ББК 28.5

Всю ответственность за достоверность предоставленных в сборнике материалов несут авторы соответствующих статей. Печатается без корректуры. Авторская орфография и пунктуация сохранены. Иллюстрации предоставлены авторами статей.

ISBN 978-5-905045-01-1

© Государственное учреждение «Волгоградский региональный ботанический сад», 2010

© Оформление: Изд-во AVATARS, 2010

© Илл. обложки: Vladimir Nikitin

Клональное микроразмножение *Eremogone saxatilis* (L.) Ikonn

В настоящее время создание генетических банков *in vitro* растений является одним из перспективных направлений сохранения биоразнообразия растений, которые позволяют разрабатывать эффективные методики сохранения по конкретным видам растений. Особенно актуально это для растений, представляющих практическую ценность либо требующих принятия особых мер охраны.

На данный момент не существует универсальной технологии культивирования *in vitro*, которая была бы пригодной для всех растений. Для каждого вида требуется разработка специфических приемов, обеспечивающих формирование растений регенерантов в культуре тканей. В связи с этим в 2009 году нами начаты первые эксперименты по микрораспространению некоторых видов местной флоры Удмуртии. В качестве одного из объектов исследований нами был выбран декоративный многолетник *Eremogone saxatilis* (L.) Ikonn., основной ареал которого охватывает лесостепные и степные районы Евразии. В Удмуртии он находится на северном пределе своего распространения и включен в Красную книгу Удмуртской Республики [7] с категорией 3.

Предпосылкой успешного культивирования того или иного вида растения *in vitro* является учет особенностей его экологии и биологии размножения *in vivo*, а также особенностей жизненной формы [5]. Нами

были проведены исследования *Eremogone saxatilis* в условиях культуры в ботаническом саду Удмуртского государственного университета. Эксперименты по интродукции и размножению показали, что данный вид не размножается самосевом, имеет низкую семенную продуктивность и невысокую всхожесть семян, однако энергично возобновляется вегетативным путем [2, 3].

Одним из основных моментов при создании коллекции *in vitro* является разработка приемов введения растительного материала в стерильную культуру, что предусматривает как выбор экспланта, так и подбор эффективных условий стерилизации. В наших экспериментах при введении в культуру *in vitro* *Eremogone saxatilis* в качестве основных первичных эксплантов для получения стерильных растений были подземные почки возобновления. Основным недостатком данного типа эксплантов является их высокая инфицированность, поэтому получение стерильного и жизнеспособного материала из почек возобновления представляет большую трудность. В связи с этим при работе нами использована ступенчатая стерилизация, при которой применялась методика предварительной подготовки эксплантов с последующей их стерилизацией, предложенная в работах М.М. Ишмуратовой [4, 5], которая позволяет уменьшить процент инфицированности эксплантов. Стерилизацию сред, материала и работу в асептических условиях проводили согласно имеющимся рекомендациям [6].

Для удаления поверхностных загрязнений перед стерилизацией экспланты предварительно промывали в проточной воде в течение 2 часов. Затем в условиях ламинарного бокса экспланты подвергали ступенчатой стерилизации. Первые два этапа стерилизации включали в себя последовательную обработку 70 % спиртом (1 мин.) и раствором 3 % перекиси водорода (5 мин.). На третьем этапе стерилизации экспланты переносили в раствор третьего стерилизующего агента с последующим трехкратным промыванием в стерильной дистиллированной воде в течение 45 мин. В качестве третьего стерилизующего вещества использовали растворы хлорамина Б и гипохлорита натрия. На основании проведенных экспериментов по стерилизации, установлено, что для почек возобновления лучшим вариантом является последовательное выдерживание в 3% растворе перекиси водорода (экспозиция 5 мин), 70% этаноле (1 мин) и в 1 % растворе гипохлорита натрия (5 мин). При

данной схеме удастся достичь максимального числа жизнеспособных (45 %) эксплантов.

Известно, что для индукции регенерационных процессов в питательные среды необходимо добавлять стимуляторы роста (цитокинин в определенных сочетаниях с ауксином или гиббереллином) [1]. У многих растений можно добиться регенерации побегов в присутствии одного стимулятора – цитокинина, воздействие которого определяется его концентрацией. В ходе работы нами было изучено влияние 6-бензиламинопурина (БАП) на регенерационную способность *Eremogone saxatilis*.

После стерилизации экспланты помещали на агаризованную (0,35 %), безгормональную питательную среду, приготовленную по прописи Т. Murashige and F. Scoog (MS). Культуру содержали при температуре воздуха 25 ± 2 °C, на свету белых люминесцентных ламп при 16-часовом фотопериоде. Через 12 – 14 дней, тронувшиеся в рост экспланты, пересаживали на питательные среды MS содержащие витамины и (БАП) в концентрации 1 – 2 мг/л. В качестве контроля использовали безгормональную питательную среду MS. Пересаживание эксплантов на свежую питательную среду того же состава производили каждые 2 – 3 недели.

Анализ полученных данных по изучению влияния БАП на регенерационный потенциал эксплантов показал, что добавление в питательные среды цитокинина способствует увеличению коэффициента размножения, а также более интенсивному росту молодых побегов. У эксплантов, помещенных на среду с БАП, в базальной части происходила регенерация почек, число которых зависело от концентрации в питательной среде цитокинина (табл.).

На безгормональной среде MS образование дополнительных побегов не отмечалось. Розетки росли и увеличивались в размере, у них отмечалось формирование корней. Было установлено укоренение (20% от общего числа) у тех растений, экспланты которых при введении в культуру отличались большими размерами. Из них за 2,5 – 3 месяца культивирования формировались полноценные растения высотой до 73,5 мм, имеющие до 10 шт. корней на одно растение.

На среде с добавлением 6-бензиламинопурина в концентрации 1 мг/л отмечалось средняя степень образования новых побегов (от 3 до 6

шт. / эксплант). Наибольшее количество побегов (5 – 12 шт. / эксплант) регенерировало на питательной среде в присутствии 2 мг/л 6-бензиламинопурина (табл).

Показатели	Вариант питательной среды		
	MS	MS + 1 мг/л БАП	MS + 2 мг/л БАП
Количество побегов, шт. / эксплант	0	3–6	5–12
Средняя высота побегов, мм.	6,5–8,8	12,5–23,5	15,5–29,5

Таблица 1. Влияние БАП на регенерационные процессы *Eremogone saxatilis*.

Однако на данной среде (MS + 2 мг/л БАП) отмечались такие нежелательные для клонального микроразмножения явления как видоизменения побегов и образование каллуса на базальной части побегов.

Исходя из полученных результатов оптимальной питательной средой является MS + 1 мг/л БАП. Несмотря на сравнительно невысокий коэффициент размножения, полученный при использовании данной питательной среды, именно такую концентрацию цитокинина необходимо использовать на этапе размножения пустынницы узколистной, так как на этой питательной среде формируются нормально развитые побеги, не развивается каллус и размножение происходит за счет развития имеющихся боковых почек розетки.

Для получения полностью сформированных растений побеги высотой 3 – 5 см высаживались на среду укоренения (разбавленная вдвое среда Мурасиге-Скуга, с пониженным содержанием сахарозы – 15 г/л). В качестве индуктора ризогенеза вводили ИМК. Наиболее оптимальной оказалась среда с добавлением ИМК в концентрации 1 мг/л, обеспечивающая достаточно высокую укореняемость (85 %) и мощное развитие корневой системы у растений. Среднее число корней на одно растение составило $6,8 \pm 0,5$; а средняя длина корней $11,8 \pm 2,1$ см. Развитие корневой системы отмечалось в течение трех недель.

Растения-регенеранты высаживали в пластиковые сосуды, заполненные почвенным грунтом, и накрывали полиэтиленовой пленкой, которую через 20 суток убирали. Приживаемость регенерантов составила 75 %.

Таким образом, показана возможность успешного клонального микроразмножения *Eremogone saxatilis* на всех этапах культивирования *in vitro*. Полученный *in vitro* материал может использоваться в дальнейшем при необходимости для восстановления вида в полевых генетических банках и в естественных местообитаниях.

Работа выполнена при финансовой поддержке № РНП. 2.2.3.1. 3997 ведомственной целевой программы «Развитие научного потенциала высшей школы (2006-2008 годы)» и № РНП 2.2.3.1/3578 ведомственной целевой программы «Развитие научного потенциала высшей школы (2009 – 2010)».

Список литературы

1. Высоцкий В.А., Упадышев М.Т. Регенерация вегетативных органов листовыми дисками и другими эксплантами рода *Rubus in vitro* // Физиология растений. 1992. Т. 39. С. 584–590.
2. Дедюхина О.Н. Начальные этапы онтогенеза *Eremogone saxatilis* (L.) Иконн. при интродукции в ботаническом саду Удмуртского государственного университета // Биоразнообразие: проблемы и перспективы сохранения: Материалы международной научной конференции. Пенза, 2008. Ч. II. С. 25–26.
3. Дедюхина О.Н., Баранова О.Г. Опыт создания искусственных популяций *Eremogone saxatilis* (L.) Иконн. в ботаническом саду Удмуртского университета // Интродукция растений: теоретические, методические и прикладные проблемы: Материалы международной конференции. Йошкар-Ола, 2009. С. 22–25.
4. Ишмуратова М.М. Особенности культивирования *in vitro* растений различных экологических групп на примере видов рода *Iris* L. // Растительные ресурсы. 1999. Вып. 4. С. 67–73.
5. Ишмуратова М.М., Зарипова А.А. Особенности морфогенеза *Polemonium caeruleum* L. *in vitro* и *in vivo* // Растительные ресурсы. 2000. Вып. 3. С. 106–114.
6. Катаева Н.В., Бутенко Р.Г. Клональное микроразмножение растений. М.: Наука, 1983. 96 с.
7. Красная книга Удмуртской Республики: Сосудистые растения, лишайники, грибы. Ижевск: изд. дом «Удмуртский университет», 2001. 290 с.