

УДК 582.475.4:581.143

## ОСОБЕННОСТИ РАЗМНОЖЕНИЯ РЕДКОГО КРЫМСКОГО ЭНДЕМИКА *CRATAEGUS POJARKOVAE* KOSSYCH В УСЛОВИЯХ IN VITRO

Попкова Л.Л., Крыжско А.В

Сохранение биологического разнообразия является приоритетным направлением охраны природы в целом, а самой ценной частью любого регионального фиторазнообразия являются эндемики. Из 2560 аборигенных видов флоры Крыма 250 составляют крымские эндемики, причем 62 вида эндемичных растений встречаются в пределах Карадагского природного заповедника [1,2].

Боярышник Поярковой (*Crataegus pojarkovae* Kossyeh) является одним из эндемиков Крыма и Карадага I категории редкости, занесенным в “Европейский Красный список животных и растений, находящихся под угрозой исчезновения” (1991) и “Красную книгу Украины” (1996). Данный вид боярышника отличается нетребовательностью к почвам, значительной засухоустойчивостью и крупными (до 2,5-3 см в диаметре) плодами желтой окраски [3]. В настоящее время природная популяция Боярышника Поярковой находится под угрозой исчезновения. Согласно данным инвентаризации 2000 года из 435 зафиксированных деревьев, лишь 17 растений (3,9%) являются молодыми 5 – 10 - летними особями. Всего на данный момент в популяции 74 растения (17%) находится на грани гибели и 70 растений (16,1%) погибли [4]. Растение боярышника Поярковой весьма декоративно и может использоваться в озеленении, а его плоды обладают ценными пищевыми и лекарственными свойствами. Однако возобновление популяции боярышника Поярковой крайне низкое. Лимитирующими факторами естественного возобновления являются нерегулярное плодоношение, низкая всхожесть семян и длительный период их прорастания (280-400 дней), уничтожение значительной части урожая плодов грызунами. Поэтому для сохранения уникального генотипа необходимо разработать методы его ускоренного размножения.

Целью данной работы являлось изучение различных способов размножения боярышника Поярковой в условиях *in vitro* для сохранения редкого вида с последующей репатриацией в природные фитоценозы.

### Материалы и методы

Материалом для проведения исследований служили семена боярышника Поярковой, собранные в 2000-2002 годах. Для установления выполненности семян после вскрытия твердой каменистой оболочки определяли количество и процентное соотношение семян без зародышей, с недоразвитым и нормальным, полноценным зародышем.

При проведении исследований по семенному размножению в условиях *in vitro* использовали общепринятые в биотехнологии методы [5,6]. Предварительно выделенные зародыши в асептических условиях подвергали ступенчатой стерилизации, изолировали от тонкой семенной кожуры и помещали на агаризованные питательные среды (MS, 1/2 MS, Knudson). Культуральные сосуды с эксплантатами содержались в фитолуминостате, где поддерживалась температура +22 +25°C, относительная влажность воздуха 60-70% и освещенность 1,5-2 клк. В процессе культивирования один раз в два-три дня подсчитывали количество развивающихся проростков, проводили их визуальный анализ, измеряли длину побега и корня. Для сравнительного анализа развития растений в условиях *in vitro* и *in situ* использовали метод контрольного посева семян в открытый грунт, проведенный в ноябре 2000 года.

### Результаты и обсуждение

Основным способом размножения боярышника в природных популяциях является семенной. Семена боярышника имеют твердую оболочку и относятся к труднопрорастающим. Имеются указания на необходимость специальной предпосевной обработки семян серной кислотой для получения всходов в первую весну. Предполагается проводить стратификацию в течение шести или четырех месяцев, в зависимости от размеров семян, с последующим посевом в теплицу или открытый грунт [7, 8].

Контрольный посев семян в естественный грунт питомника Никитского ботанического сада был произведен в ноябре 2000 года. Первые всходы боярышника Поярковой появились в начале марта 2002 года. Проростки имели две зеленые семядоли (0,5 см) с апикальной меристемой между ними. Высота проростков составляла 1,5 – 2 см. Длина темно-красного гипокотыля проростков составляла 1 – 1,5 см, а корешок достигал 4 см. Через две-три недели, когда общая высота проростков составляла 2,5 – 3 см, начинался процесс формирования настоящих листьев. Неразвернутые листочки достигали 5 – 8 мм длины, а их разворачивание завершалось в течение недели. Наблюдалось дальнейшее появление всходов боярышника Поярковой, но их развитие задерживалось. Проростки, высота которых была менее 2 см, не формировали настоящих листьев. В дальнейшем у проростков на протяжении апреля происходило развитие и разворачивание второй пары настоящих листочков. В конце мая сеянцы имели по две пары нормально развитых листочков, их общая высота составляла 4 – 5 см, а семядоли начинали желтеть и отмирать. До конца вегетационного сезона

продолжался процесс развития сеянцев, однако появления новых листьев не отмечено.

Таким образом, прорастание семян боярышника Поярковой в естественных условиях питомника составляет 14 – 17 месяцев, процесс формирования проростков длится еще 1 – 1,5 месяца, и около года происходит развитие сеянцев.

Эндокарпий семени боярышника Поярковой каменистый, поэтому для успешного прорастания, а также введения в условия *in vitro* таким семенам необходима скарификация. Из семян методом раскалывания эндокарпия в тисках выделяли зародыши. Как показали исследования, только 16 – 18%, иногда 20 – 22% семян средней пробы и 47 – 74% элитных семян (шириной 0,5-0,7 см) имеют нормально сформировавшийся зародыш. Очень часто у средних семян зародыш либо отсутствует (49 – 65%), либо недоразвит (23 – 28%). Анализ морфометрических показателей семян боярышника Поярковой (длины и ширины семени) показал, что наибольшее количество зародышей находится в семенах шириной не менее 0,5 см. Исследования элитных семян позволили установить зависимость наличия зародыша в семени от его массы при одинаковых размерах семян. Как видно из рисунка 1, у семян массой 120 мг и более встречается 87,5 % зародышей, тогда как при массе семян от 70 до 120 мг количество зародышей составляет 33,85%. Поэтому масса семени может служить надежным показателем выполненности семян.

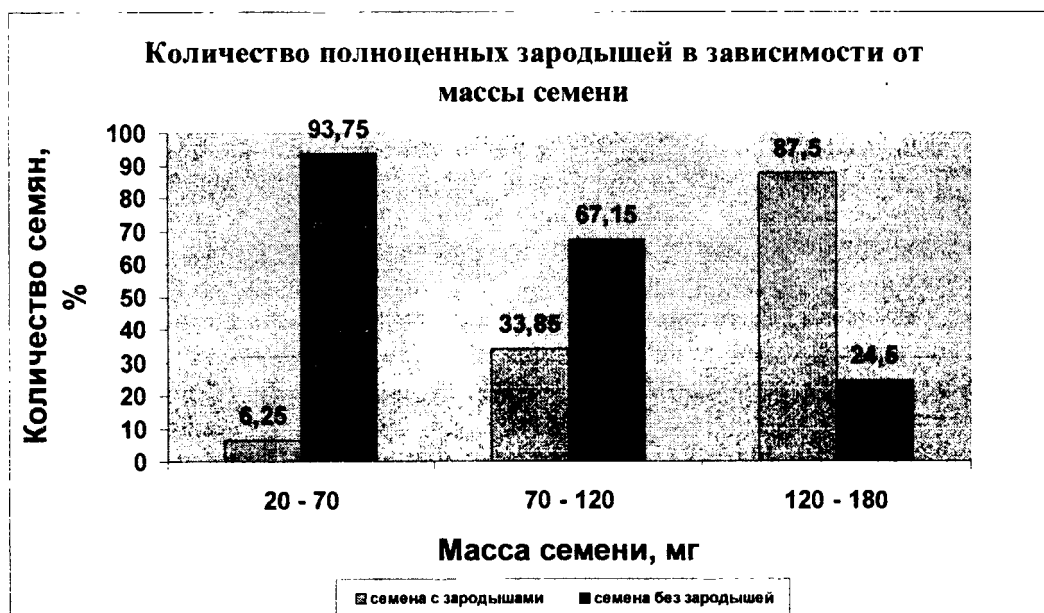


Рис. 1. Количество семян с зародышами у боярышника Поярковой в зависимости от массы семени.

Наиболее перспективным направлением повышения всхожести семян и получения жизнеспособных растений является применение методов биотехнологии, в частности культивирования изолированных зародышей или эмбриокультуры *in vitro*. Использование эмбриокультуры позволяет в условиях *in vitro* получать жизнеспособные растения даже из недоразвитых и аномальных семян [6].

Перед введением в условия *in vitro* семена боярышника Поярковой подвергали воздействию низких положительных температур и препарата неоселен, а выделенные зародыши – холодовой стратификации и обработке различными концентрациями (10, 25 и 50 мг/л) водных растворов ГК. Как видно из таблицы 1, все варианты предобработки семян оказывали стимулирующее действие на развитие зародышей. При этом позеленение семядолей в контроле отмечено на 33 сутки, а в опытных вариантах на 5 – 7 сутки.

Таблица 1  
Влияние различных способов предварительной обработки семян боярышника Поярковой на развитие зародышей

Способ обработки семян	Время позеленения семядолей, сут	Количество развивающихся зародышей, %
1. Выдерживание в дистиллированной воде 15-20 сут	6-7	42,1
2. Выдерживание в дистиллированной воде 15-20 сут+ холодовая стратификация выделенных зародышей при (t=0-4 <sup>0</sup> С, 5-7 сут)	5	50,8
3. Выдерживание в водном растворе препарата неоселен (концентрация Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> 5·10 <sup>-5</sup> мг/л) 10-20 сут	6-7	76,4
4. Выдерживание в дистиллированной воде 15-20 сут+ обработка выделенных зародышей раствором ГК (10, 25, 50 мг/л) в течение 10 ч	5-6	91,3
Контроль (сухие семена)	33	85,7

Оптимальным вариантом предобработки зародышей, выделенных из семян, подвергавшихся замачиванию в воде, являлась их непосредственная холодовая стратификация при температуре 0...+4<sup>0</sup>С в течение 3-5 суток. В этом варианте при помещении зародышей на свет через 5 суток наблюдалось позеленение семядолей. В дальнейшем только из зародышей с зелеными или фрагментарно позеленевшими семядолями были получены полноценные сеянцы. Результаты проведенных

экспериментов согласуются с литературными данными о том, что зародыши плодовых культур (черешни, персика, груши) нормально развиваются и формируют полноценные растения при воздействии положительных пониженных температур от 0 °С до 5 °С [7].

С целью получения асептических эксплантов перед помещением на питательные среды проводили ступенчатую стерилизацию зародышей 70%-ным этиловым спиртом и затем 0,8%-ным  $\text{AgNO}_3$  или 50%-ным раствором брадофена. Оптимальными экспозициями стерилентов оказались 70%-ный  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  – 1 мин, 0,8%-ный  $\text{AgNO}_3$  – 1,5 – 2 мин, 50%-ный брадофен – 5 – 7 мин, с последующей трехкратной промывкой в стерильной дистиллированной воде. Количество асептических эксплантов при этом составляло 65 – 90%.

Поскольку выделенные зародыши боярышника Поярковой были дифференцированными, их успешное развитие происходило на достаточно простых средах. Из трех питательных сред: MS, 1/2 MS, Knudson лучшей для развития проростков и самой простой по составу была питательная среда Knudson. Через 5 – 7 суток после введения в условия *in vitro* у зародышей со всеми вариантами предобработки семян наблюдалось позеленение семядолей и начинался морфогенез. В контроле, при введении в условия *in vitro* зародышей из сухих семян, позеленение семядолей у 85,7% зародышей отмечалось на 33 – й день. На 7-10 сутки после позеленения семядолей у проростков начинали развиваться первые настоящие листочки и наблюдался рост корешка. Причем на данном этапе развития проростки боярышника Поярковой оказались довольно требовательными к условиям освещения. Только у проростков на стеллажах с освещенностью не менее 2 клк наблюдалось появление темно-красной окраски гипокотилия и развивался корешок. Интересно отметить, что с аналогичными признаками: зелеными семядолями и темно-красным гипокотилем – проростки появлялись в контрольных условиях питомника. Требовательность к освещению проростков согласуется с биологическими особенностями вида - боярышник Поярковой – гелиофит, приуроченный к светлым полянам или открытым пространствам [1,3].

В течение следующих 7 – 10 суток происходил активный рост настоящих листочков и корня проростков. С момента разворачивания первой пары настоящих листьев проростки переходили в стадию сеянцев с полным автономным автотрофным питанием. У сформировавшихся сеянцев появлялась вторая пара настоящих листьев характерной для боярышника Поярковой формы. Активный рост и развитие сеянцев наблюдался в следующие 7 – 10 суток: отмечалось образование двух-трех междоузлий с двумя парами развернутых листьев, а длина корня в 4 – 5 раз превышала общую высоту побега. На 30 – 35 сутки культивирования, после перенесения на свежеприготовленную питательную среду, появлялись еще одна-две пары листочков, а сеянцы имели три-четыре междоузлия и достигали высоты 3 – 3,5 см.

Изучение особенностей развития проростков боярышника Поярковой в условиях

*in vitro* показало, что, помимо нормально развивающихся проростков с развитыми листьями и сформированным корнем, около 50% сеянцев корень не образуют. Такие сеянцы имели по два-три междоузлия и две пары нормально развитых листьев, однако на ранних стадиях проростки не формировали темно-красный гипокотиль и корешок. Для изучения укоренения и подбора оптимальных концентраций ауксинов сеянцы без корешков переносили на питательную среду Knudson, дополненную 0,5 мг/л ИМК. Сеянцы, имевшие нормально развитый корень были готовы для адаптации к условиям *in vivo* и пересаживались в стерильные почвенные субстраты из мест обитания боярышника. Из каждых 100 выделенных и помещенных в условия *in vitro* зародышей можно получить 40 – 50 сеянцев, из которых 50% имеют развитый корешок и минимум две пары настоящих листьев.

В результате экспериментов установлено, что развитие проростков и формирование сеянцев в условиях *in vitro* в среднем составляло 40-45 суток, а в контроле (без предобработки семян) не превышало двух месяцев. По сравнению с естественным развитием в открытом грунте питомника, где первые проростки с двумя развернутыми зелеными семядолями были получены через 16 месяцев, а сеянцы через 17 – 17,5 месяцев, развитие в условиях *in vitro* ускорилось в 7 – 8 раз.

Таким образом, период прорастания семян и развития сеянцев боярышника Поярковой в условиях *in situ* составлял 14-17 месяцев, тогда как в условиях *in vitro*, сеянцы были получены за два месяца. Полученные положительные результаты по размножению *in vitro* открывают перспективы сохранения и культивирования редкого крупноплодного вида боярышника.

### Список литературы

1. Голубев В.Н. Биологическая флора Крыма. – Ялта, 1996. – 86 с.
2. Дидух Я.П., Шеляг-Сосонко Ю.Р. Карадагский природный заповедник. – Киев, 1982. - 186 с.
3. Червона книга України. Рослинний світ. /Ред. Ю.Р. Шеляг-Сосонко./- К.:Українська енциклопедія, 1996. – 680 с.
4. Летухова В.Ю. Современный ареал исчезающего вида боярышника Поярковой // Труды Никит. Ботан. Сада. – 2001. – Т. 120. – С. 73 – 79.
5. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – Киев: Наукова думка. – 1980. – 488 с.
6. Бутенко Р.Г. Биология высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: учебное пособие. – М.: ФБК-Пресс, 1999. – 160 с.
7. Здруйковская-Рихтер А.И. Культура изолированных зародышей и генеративных органов как метод селекции плодовых растений // Тканевые и клеточные культуры в селекции растений. – М.: ВАСХНИЛ, 1979. – С. 57 – 70.
8. Косых В.М. О прорастании крымских видов боярышников // Бюлл. Главн. бот. сада. – 1972. – Вып. 84. – С.80 – 82.

Поступила в редакцию 9.04. 2003 г.