

УДК: 582.594.2:581.143.6

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕХНИКИ *IN VITRO* ДЛЯ РАЗМНОЖЕНИЯ НЕКОТОРЫХ РЕДКИХ И ИСЧЕЗАЮЩИХ РАСТЕНИЙ ФЛОРЫ КРЫМА

Скляренко Д.А., Бугара А.М.

Актуальность

Охрана редких видов растений – одно из основных направлений сохранения биологического разнообразия природы в целом. В настоящее время численность растений в природе неуклонно сокращается главным образом из-за хозяйственной деятельности человека – распашки земель, вырубки лесов, мелиорации, промышленных и сельскохозяйственных загрязнений [2,5,8].

В условиях нарастающего антропогенного воздействия наиболее чувствительными к нему становятся редкие эндемичные и малочисленные виды, что обусловлено их эколого-биологическими и ценотическими особенностями [3,5]. Сегодня на Крымском полуострове наблюдаются самые высокие в Украине темпы генетической эрозии. Так, за последние десятилетия флора Крыма потеряла 31, а по другим оценкам – 39 видов, причем 21 из них придется вычеркнуть и из флоры Украины [5].

Чтобы остановить надвигающуюся экологическую катастрофу, в первую очередь необходимы меры, направленные на защиту природы от загрязнения и вредных воздействий на места обитания представителей различных видов, разработка национальных программ сохранения флоры, организация флористических заказников и биосферных заповедников [8].

Однако для того, чтобы сохранить некоторые виды растений, уже недостаточно охранных мероприятий, а необходимы меры по их защите и восстановлению, такие как разведение видов под контролем человека, создание клеточных коллекций и генных банков [2,9,10].

Используя свойство тотипотентности растительных клеток – явление, когда практически любая растительная клетка способна в определенных условиях и на соответствующих питательных средах регенерировать полноценные растения, - можно создавать и длительно поддерживать коллекции растительных клеток и тканей [1,2,4].

Метод микроклонального размножения *in vitro* уже играет важную роль для ускоренного клонирования плодовых, ягодных, клубнеплодных, декоративных видов растений и древесных пород, но также может быть применен и к дикорастущим видам, нуждающимся в охране [1,2,4,10].

Получение культуры *in vitro*, а в дальнейшем растений-регенерантов редких и исчезающих видов флоры Крыма позволит сохранить имеющийся генофонд растений и решить проблему сокращения биоразнообразия, а также восполнить растительные ресурсы тиражированием редких и исчезающих видов в результате клонального микроразмножения и возврата их в природу или коллекции ботанических садов [6,9,11].

Целью данной работы была разработка оптимальных способов культивирования и размножения в условиях *in vitro* некоторых редких и исчезающих растений флоры Крыма с целью последующей репатриации полученных растений в естественные биоценозы.

Материалы и методы

Материалом для исследований служили ткани и органы растений *Crataegus pojarkovae* Kossyich, *Onobrichis pallasii* (Bieb.) Willd, а также *Sorbus domestica* L., произрастающих в естественных фитоценозах.

Crataegus pojarkovae – исчезающий реликтовый эндемик третичного периода из семейства Rosaceae, занесенный в “Европейский Красный список животных и растений, находящихся под угрозой исчезновения” (1991) и “Красную книгу Украины” (1996). Большая научная и практическая ценность *Crataegus pojarkovae* обуславливается его реликтовостью и эндемичностью, ограниченной численностью особей в популяции, целебными и пищевкусовыми качествами его плодов, большой засухоустойчивостью, кальцефильностью и большими декоративными достоинствами.

В настоящее время на Крымском полуострове несколько представителей рода *Sorbus* являются редкими или исчезающими [5]. В первую очередь это относится к видам *Sorbus roopiana* и *S. Pseudolatifolia*. В качестве модельного объекта в настоящей работе использовали вид *Sorbus domestica*.

Onobrichis pallasii – эндем Крыма, реликт третичного времени. Местонахождения его часто страдают из-за хозяйственной деятельности человека, растение нуждается в охране, поэтому стоит вопрос о сохранении данного вида и разработке различных мероприятий по его охране и размножению. Материалом для проведения исследований служили растения *Onobrichis pallasii*, произрастающие на меловых склонах в западной части г. Симферополя.

Для проведения исследований по микроразмножению *in vitro* *Crataegus pojarkovae* и *Sorbus domestica*, а также эмбриокультуре *Onobrichis pallasii* использовали методы, общепринятые в исследованиях по культуре тканей растений [4]. В качестве инициальных эксплантов *Crataegus pojarkovae* и *Sorbus domestica* использовали вегетативные почки и апикальные меристемы. С целью получения асептической культуры клеток почки поверхностно стерилизовали в 100% растворе препарата “Брадофен” с последующей промывкой в стерильной дистиллированной воде. Апикальные меристемы извлекали с помощью препаравальных игл и скальпеля под микроскопом МБС-10 и эксплантировали на поверхность агаризованной

питательной среды Мурасиге – Скуга, дополненной фитогормонами. Асептическая культура семян *Onobrichis pallasii* была получена путем поверхностной стерилизации в 70% растворе спирта и последующим промыванием в стерильной дистиллированной воде. Культивирование проводили в химических пробирках с 10 мл питательной среды. Культуральные сосуды помещали в условия термостатированного помещения (+26 – +28°C), с относительной влажностью воздуха 60 – 70% и освещенностью 3000 – 4000 люкс.

Результаты и обсуждение

Установлено, что для пролиферации эксплантов *Crataegus pojarkovae* оптимальными являлись модифицированные питательные среды Мурасиге-Скуга, дополненные различными концентрациями фитогормонов. Наилучшие результаты были получены на среде, содержащей кинетин – 0,5 мг/л, 6-бензиламинопурин (6-БАП) – 0,5 мг/л и нафтилуксусную кислоту (НУК) – 0,1 мг/л. На средах, содержащих только индолилуксусную кислоту (ИУК) в концентрации от 0,5 до 1 мг/л и 6-БАП в концентрации от 1,0 до 1,5 мг/л были также получены положительные результаты, однако с более низким процентом активно развивающихся почек (табл. 1).

В большинстве случаев пролиферация вегетативных почек и меристем наблюдалась через 14 – 16 дней после посадки на питательную среду.

Таблица 1
Влияние различных фитогормонов и их концентраций на пролиферацию почек *Crataegus pojarkovae* в условиях *in vitro*

№ варианта	Содержание фитогормонов, мг/л				Количество пролиферирующих почек на 14-16 дни культивирования, (%)
	Кинетин	НУК	ИУК	6-БАП	
1	0,5	0,1	-	0,5	100,0%
2	-	-	0,5	1,0	64,7%
3	-	-	1,0	1,5	42,5%

Внесение более высоких концентраций фитогормонов приводило к изменению направленности процесса развития экспланта и образованию каллуса.

В результате проведенных исследований были получены микропобеги *Crataegus pojarkovae*.

В процессе культивирования изолированных меристем *Sorbus domestica* было обнаружено, что пролиферация почек быстрее всего (на 12 – 14 дни культивирования) происходила на жидкой питательной среде Мурасиге-Скуга, содержащей ИУК в концентрации 1 мг/л и 6-БАП – в концентрации 2 мг/л. После 20 дней культивирования произвели пересадку почек, имеющих 2 – 3 пары хорошо развитых листьев, на

питательную среду, содержащую ИМК (2 мг/л) и 6-БАП (1 мг/л). При этом на местах раневых срезов начинал формироваться каллус и происходило образование новых микропобегов.

В результате проведенных исследований по клональному микроразмножению в условиях *in vitro* получены микропобеги *Sorbus domestica*, а также редкого эндемичного растения *Crataegus pojarkovae*. В настоящее время проводятся исследования по подбору оптимального соотношения фитогормонов для дальнейшего субкультивирования и укоренения полученных микропобегов.

Изолированные зародыши *Onobrichis pallasii* эксплантировали на поверхность агаризованной питательной среды Уайта, не содержащей фитогормоны и дополненной 6-БАП (1,0 мг/л) и ИУК (0,5 мг/л).

При эксплантации зародышей на питательную среду первые признаки развития обнаруживались уже через один день культивирования. Зародыши набухали, увеличивались в размерах, наблюдался активный рост главного корня. На третьи сутки были окончательно сформированы и раскрыты семядольные листья. Появление первой пары настоящих листьев отмечалось на пятый день культивирования. На 7 – 10 день проростки имели развитый стебель с двумя парами настоящих листьев и хорошо ветвящийся главный корень (табл.2).

Таблица 2
Влияние фитогормонов на основные показатели роста *Onobrichis pallasii* после трех недель культивирования в условиях *in vitro*

№ варианта	Содержание фитогормонов, мг/л		Длина корня сеянцев, см	Высота микропобега с тремя парами листьев, см
	6-БАП	ИУК		
1	-	-	7,0-11,5	5,0-6,8
2	1,0	0,5	5,0-6,5	4,5-5,6

В зависимости от варианта опыта наблюдались некоторые различия в длине корня, его разветвленности, высоте микропобега. На среде, содержащей 6-БАП и ИУК, формировались короткие и утолщенные корни, значительно замедлялось образование боковых корней. На среде без фитогормонов рост корня и формирование боковых корешков происходило быстрее, однако они становились более тонкими и хрупкими.

Через три недели культивирования зародышей были получены проростки с двумя – тремя парами настоящих листьев и хорошо развитой корневой системой. Полученные сеянцы были успешно пересажены в субстрат, и в настоящее время проводятся работы по подготовке полученных *in vitro* растений для репатриации в естественные фитоценозы, что позволит создать искусственные популяции *Onobrichis pallasii* и изучить особенности адаптации растений к естественным условиям обитания.

Изложенные результаты дают возможность говорить о целесообразности разработки биотехнологических методов для размножения редких и эндемичных растений флоры Крыма. Биотехнологические методы культуры тканей *in vitro* открывают большие перспективы рационального ресурсопользования редких, исчезающих и хозяйственно-ценных видов растений, а также интродукции их в естественные фитоценозы. Дальнейшая перспектива таких исследований видится в создании генетического банка клеточных культур с целью сохранения генофонда исчезающих видов. По мере разработки методов восстановления природных экосистем эти банки будут использованы для реинтродукции типичных растений в природные местообитания.

Список литературы

1. Атанасов А.И. Биотехнология в растениеводстве. Новосибирск, 1993. – 242с.
2. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе: Учеб. пособие. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
3. Ена А.В. Эндемики во флоре Крыма // Вопросы развития Крыма: Научно-практический дискуссионно-аналитический сборник. Выпуск 1: Биологическое и ландшафтное разнообразие Крыма: проблемы и перспективы. Ред. А.А. Прусаков. – Симферополь: “Сонат”, 1999. – С. 65 – 68.
4. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – Киев: Наукова думка, 1980. – 488с.
5. Вопросы развития Крыма: Научно-практический дискуссионно-аналитический сборник. Выпуск 13. Материалы к Красной книге Крыма. Симферополь: “Таврия-плюс”, 1999. – С.8 – 9.
6. Попкова Л.Л., Теплицкая Л.М. Перспективы сохранения редких растений флоры Крыма // Мат. XI съезда Укр. ботан. общества. – Харьков, 2001. – С.302 – 303.
7. Попкова Л.Л. Сохранение редкого крымского эндемика *Crataegus pojarkovae* Kossyeh методом размножения в условиях *in vitro* // Заповедники Крыма. Материалы II научной конф. – Симферополь, 2002. – С. 191 – 193.
8. Редкие и исчезающие растения и животные Украины: Справ. – Чопик В.И., Щербак Н.Н., Ардамацкая Т.Б. и др. – Киев: Наук. думка, 1988. – 256 с.
9. Склярєнко Д.А. Пути сохранения и защиты исчезающих видов растений флоры Крыма // Вісник Харківського аграрного університету ім. В.В. Докучаєва. – 2002. – №4. – С. 114 – 115.
10. Kotkas K., Vasar V., Vaasa A. The application of biotechnological methods on preservation of plant biological diversity in Estonia // Biotechnology approaches for exploitation and preservation of plant resources. – Yalta, 2002. – P. 58 – 59.
11. Teplitskaya L.M. Cloning methods development for rare and vanishing plants of Crimean flora / Euro conference “Modern Analytical Methods for Food and Beverage Authentication” Lednice, Czech republic, 2002. – P. 31.

Поступила в редакцию 7.03.2003 г.