

УДК 57.085.23

КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ РЕДКИХ И ИСЧЕЗАЮЩИХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ

Т.Т. ДОАН¹, Е.А. КАЛАШНИКОВА¹, О.И. МОЛКАНОВА²

(¹ РГАУ-МСХА имени К. А. Тимирязева,² ГБС имени Н.В. ЦицинаРАН)

Рассматривается вопрос о влиянии гормонального состава питательной среды на морфогенетический потенциал изолированных эксплантов диоскореи японской, диоскореи кавказской и бересклета карликового. Установлено, что для диоскореи с целью получения стабильного коэффициента размножения и формирования растений с правильной морфологией целесообразно в питательную среду в качестве цитокинина добавлять препарат дроп в концентрации 0,5 мг/л в сочетании с НУК 0,5 м/л, а для бересклета — препарат цитодеф в концентрации 0,5 мг/л. Для формирования микроклубней необходимо присутствие в питательной среде ИМК в концентрации 3 мг/л.

Ключевые слова: диоскорея, бересклет, морфогенез, микроразмножение, адвентивные почки, пазушные почки, микроклубни, изолированные экспланты, *in vitro*.

В настоящее время сохранение биоразнообразия растений и создание генетических банков *in vitro* является одним из перспективных направлений биотехнологии, в частности, метод клонального микроразмножения, который позволяет в кратчайшие сроки получить большое количество растений при недостатке исходного материала и потомство, генетически идентичное исходному виду или форме. Стратегия сохранения биоразнообразия отражена в различных нормативных документах, таких как «Национальная стратегия по сохранению биоразнообразия России» (2001) и «Стратегия ботанических садов России по сохранению биоразнообразия растений» (2003). Задачами этих программ являются: формирование единого банка данных; инвентаризация редких видов и разработка системы критериев для их выявления и определения уровня их охраны; изучение биологических особенностей редких видов и механизмов действия на них лимитирующих факторов; разработка биологических принципов и способов сохранения редких видов; разработка единых методик работы с редкими и исчезающими видами растений при проведении популяционных исследований, интродукции и культивировании *in vitro* [5].

К редким относятся растения из семейства *Dioscoreaceae* и *Celastraceae*, в частности, диоскорея японская, диоскорея кавказская, а также бересклет карликовый, которые занесены в Красную книгу РФ. Кроме того, диоскорея является ценной лекарственной культурой, богатой биологически активными веществами, например, диосгенином, который накапливается в различных тканях и органах этих растений и обладает противоопухолевым действием, снижает содержание холестерина в крови, а также усиливает устойчивость растений к действию стрессовых абиотических и биотических факторов окружающей среды и др. [1, 3, 4, 7].

Цель исследования — изучить влияние гормонального состава питательной среды на морфогенетическую активность изолированных эксплантов и разработать регламент клонального микроразмножения изучаемых растений.

Методика

Объектами исследований служили растения диоскореи японской (*Dioscorea nipponica*), диоскореи кавказской (*Dioscorea caucasia*) и бересклета карликового (*Euonymus nana Bieb.*). В качестве первичного экспланта использовали молодые побеги длиной 1 см, содержащие одну или две пазушные почки. Стерилизацию растительного материала проводили в растворе КМп04 в течение 20 мин, промывали в дистиллированной воде, после чего помещали в 0,1%-й раствор сулемы на 7 мин, а затем трижды промывали стерильной дистиллированной водой. Экспланты культивировали на модифицированной питательной среде, содержащей минеральные соли по прописи Мурашига и Скуга, витамины — по Гамборгу, а также сахарозу — 3%, агар — 0,7%. Изучали влияние гормонального состава питательной среды на индукцию образования пазушных побегов, адвентивных почек и микроклубней. В качестве веществ с цитокининовой активностью использовали препараты дропп, цитодеф и 21р в концентрациях 0,5 и 1,0 мг/л в сочетании с НУК 0,5 мг/л. Экспланты культивировали при температуре 24 °С, 16-часовом фотопериоде, освещении белыми люминесцентными лампами с интенсивностью 3 тыс. лк.

Пересадку микрокультуры осуществляли с подбором оптимального времени культивирования для вида растений, которое определялось скоростью роста микро-растений.

Опыты проводили в четырехкратной повторности. Данные экспериментов представлены в виде $x \pm t_{05}S_x$, где x — среднее значение, S_x — ошибка средней, t_{05} — значение критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Исследования показали, что гормональный состав питательной среды приводит к изменению морфофизиологических процессов, которые проявлялись: 1) в формировании каллусной ткани в основании первичного экспланта с одновременной регенерацией растений; 2) в индукции развития существующих в растении меристем; 3) в формировании почек или микроклубней *de novo*.

Экспериментально установлено, что для диоскореи японской и диоскореи кавказской из всех изучаемых цитокининов наибольшей стимулирующей активностью индуцировать образование клубней и побегов обладал препарат дропп. В этих вариантах учитываемый показатель находился в пределах 3-4 шт., в то время как в вариантах с присутствием в питательной среде 21р или препарата цитодеф частота образования клубней в среднем составила 1-2 шт. на один эксплант. Показано, что с увеличением концентрации цитокининов в питательной среде (с 0,5 до 1,0 мг/л во всех вариантах) коэффициент размножения увеличивался, однако при этом наблюдалось формирование мелких клубней и небольших по размеру побегов.

Исследования показали, что гормональный состав питательной среды оказывает существенное влияние на процесс формирования микро клубней [2, 6, 8], который зависит от исследуемого генотипа. Так, для диоскореи японской было характерно формирование микроклубней двух типов: 1) у основания стебля (рис. 1 а), 2) воздушные клубни в пазухе листьев (рис. 1 б). У диоскореи кавказской формирование микроклубней, как правило, происходило у основания побега (рис. 1 в, г).

Известно, что формирование клубней находится под контролем ауксинов. Поэтому представлялся интерес изучить влияние этих гормонов на индукцию образования микроклубней *de novo* в условиях *in vitro*. В работе испытывали ИУК и ИМК в различных концентрациях (3-7 мг/л). В результате исследований были установле-

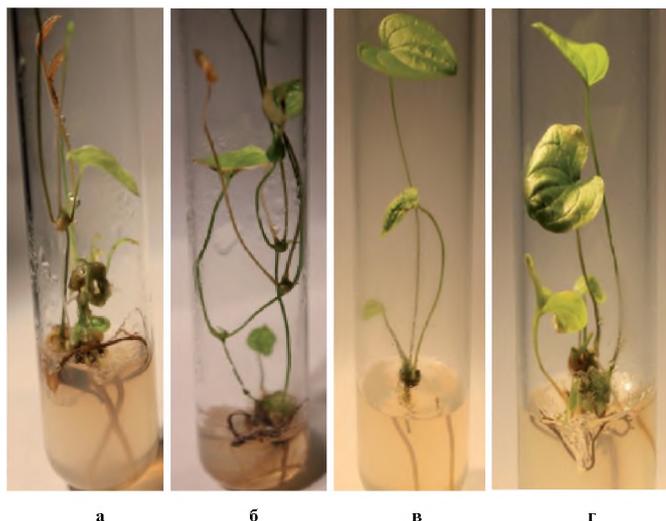


Рис. 1. Формирование микроклубней *in vitro*: а, б — диоско-
рея японская, в, г — диоскорея кавказская

ны некоторые закономерности: 1) с увеличением концентрации изучаемых ауксинов в питательной среде до 5 мг/л повышалась способность эксплантов формировать микроклубни; 2) дальнейшее увеличение концентрации ауксинов до 7 мг/л приводило к снижению учитываемого показателя; 3) присутствие в питательной среде ИУК оказывало влияние на формирование воздушных микроклубней в пазухе листьев, а ИМК — у основания стебля.

Таким образом, для получения стабильного коэффициента размножения и формирования растений с правильной морфологией, целе-

сообразно в питательную среду в качестве цитокинина добавлять препарат дропп в концентрации 0,5 мг/л в сочетании с НУК 0,5 м/л, а для формирования микроклубней — ИМК в концентрации 3 мг/л.

Аналогичные исследования по влиянию гормонального состава питательной среды на морфогенетическую активность изолированных эксплантов были проведены и с бересклетом карликовым. Исследования показали, что гормональный состав питательной среды приводит к изменению морфофизиологических процессов, которые проявлялись: 1) в формировании каллусной ткани в основании первичного экспланта с одновременной регенерацией растений; 2) в индукции развития существующих в растении меристем; 3) в формировании вторичных боковых побегов (см. таблицу).

Экспериментально установлено, что оптимальной средой на первом этапе клонального микроразмножения бересклета карликового была среда, содержащая препарат цитодеф в изучаемых концентрациях. В этих условиях наблюдали формирование на одном экспланте от 3 до 5 шт. побегов, которые развивались из существующих

Влияние гормонального состава питательной среды на морфогенетическую активность изолированных эксплантов бересклета карликового

Препарат, мг/л	Среднее количество побегов на 1 эксплант, шт.	Средняя высота побегов, см	Формирование каллусной ткани
21р 1,0	2,3 ± 0,3	1,9 ± 0,1	±*
Дропп 0,5	12,1 ± 2,4	0,1 ± 0	+
Дропп 1,0	18,3 ± 3,0	0,3 ± 0,1	+
Цитодеф 0,5	3,6 ± 0,2	2,3 ± 0,2	-
Цитодеф 1,0	4,1 ± 0,5	2,5 ± 0,3	+

* + сильное образование каллусной ткани; ± среднее образование каллусной ткани; - отсутствие образования каллусной ткани.

меристем первого и второго порядка, средняя высота которых составляла 2,3-2,5 см (рис. 2 а, б).

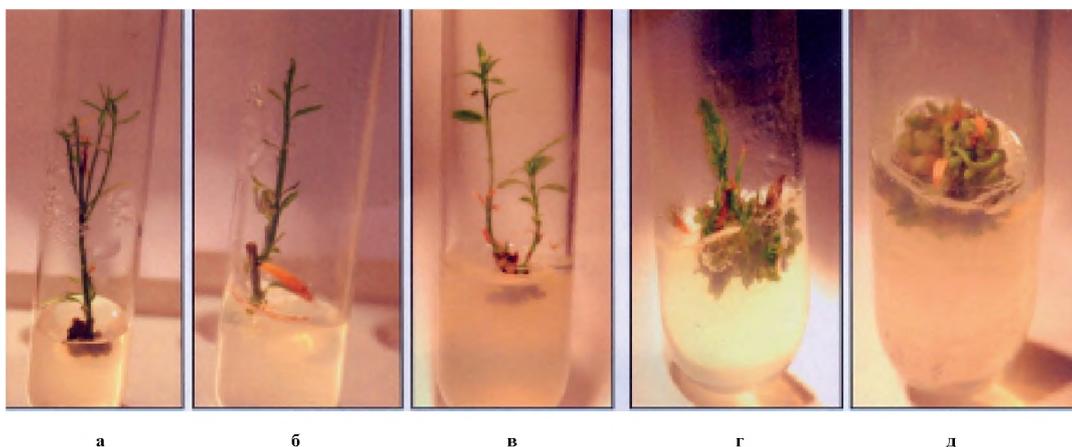


Рис. 2. Формирование пазушных и адвентивных почек на среде МС, содержащей различные цитокинины: а — цитодеф 0,5 мг/л, б — цитодеф 1,0 мг/л, в — 21р 1,0 мг/л, г — дропп 0,5 мг/л, д — дропп 1,0 мг/л

В вариантах, в состав которых входил 21р, развитие побегов второго порядка нами не было отмечено. Как правило, побеги формировались из существующих меристем первичного экспланта, и средняя высота этих побегов не превышала 2 см (рис. 2 в). В основании побега было отмечено формирование каллусной ткани средней интенсивности.

Особо следует отметить вариант питательной среды, в состав которой входил препарат дропп. Уже на 14-е сут. с начала культивирования было отмечено сильное формирование каллусной ткани не только в основании экспланта, помимо этого клетки сегментов стебля из дифференцированного состояния переходили в дедифференцированное. Причем сформировавшаяся каллусная ткань зеленела на свету и имела плотную консистенцию. Кроме того, в хорошо пролиферирующей каллусной ткани под действием препарата дропп наблюдали массовое образование адвентивных почек, среднее число которых составило от 12 до 19 шт. на один эксплант (рис. 2 г, д). Развитие адвентивных почек происходило медленно, и лишь через 4 нед. было отмечено формирование укороченных побегов, размер которых не превышал 3 мм.

Таким образом, оптимальные условия, обеспечивающие повышение коэффициента размножения и формирование хорошо развитых микропобегов бересклета карликового, предусматривают присутствие в питательной среде препарата цитодеф в концентрации 0,5 мг/л.

Заключение

Исходя из представленных экспериментальных данных, можно сделать вывод о том, что с увеличением концентрации изучаемых цитокининов в питательной среде (с 0,5 до 1,0 мг/л во всех вариантах) коэффициент размножения увеличивается, однако при этом формируются мелкие клубни (растения диоскореи) и множество адвентивных почек (растения бересклета). Установлено, что реализация морфогенетического потенциала растений зависела от генотипических особенностей растения-донора и соответствующей оптимизации питательной среды по гормональному составу.

Библиографический список

1. Васильева И.С., Пасеутиченко В.Л. Стероидные гликозиды растений и культуры клеток диоскореи, их метаболизм и биологическая активность // Успехи биологической химии. 2000. Т. 40. С. 153-204.
2. Грубишич Д., Чулафич Д., Боевич Д.-Цветич. Проявление признака образования воздушных корней у реликтовых видов диоскореи балканской (*Dioscorea balcanica Kosanin*) и диоскореи кавказской (*Dioscorea caucasica Lipsky*) // Физиология растений. 1993. Т. 40. № 2. С. 283-287.
3. Крылова ЯД *Dioscorea caucasica lipsky*. Ареал, морфология, биология и эколого-ценотическая характеристика. Материал Растительных ресурсов. 1996. Вып. 4. Т. 32. С. 1-13.
4. Лещантца В.В., Лукатмм А. С. Выращивание диоскореи nipponской (*Dioscorea nipponica Makino*) в культуре *in vivo* и *in vitro* // Актуальная проблема инноваций с нетрадиционными растительными ресурсами и создание функциональных продуктов / Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева. Саранск, 2001. С. 109-113.
5. Молканова О.И., Стахеева ТА, Василева О.Г., Коновалова Л.Н., Сучкова Н.К. Использование биотехнологических методов для размножения и сохранения редких и ценных видов растений // Ботанические сады как центры сохранения биоразнообразия и рационального использования растительных ресурсов: матер. Межд. науч. конф., поев. 60-летию Главного ботанического сада им. Н.В. Цицина РАН. М., 2005. С. 354-356.
6. Орешиникова А.В., Носов А.М., Манаков М.Н. Физиологические особенности культивируемых клеток *Dioscorea deltoidea wall*, при выращивании в режиме закрытого протока // Физиология растений. 1994. Т. 41. № 6. С. 918-922.
7. Торшилова А.А. Репродуктивная биология *Dioscorea nipponica Makino* (*Dioscoreaceae*): автореф. дис.... канд. биол. наук. СПб, 2007. 20 с.
8. Чулафич Л. Клональное микроразмножение диоскореи балканской- эндемичного вида флоры Югославии // Биология культивируемых клеток и биотехнология растений. М., 1991. С. 209-212.

Рецензент — д. с.-х. н. О.Н. Аладина

CLONAL MICROPROPAGATION OF RARE AND ENDANGERED SPECIES OF PLANTS

DOAN THU THUY¹, E.A. KALASHNIKOVA¹, O.I. MOLKANOVA²

(Russian State Agrarian University — RTSAU
named after K.A. Timiryazev, Moscow, Russia)

Tsytzin Main Botanical Garden of Academy of Sciences, Moscow, Russia)

*This article deals with the influence of nutrient medium hormonal composition on morphogenetic potential of isolated explants *Dioscorea nipponica*, *Dioscorea caucasica* and *Euonymus nana*. It has been established that the *Dioscorea* obtains stable coefficient of reproduction and formation of plants with correct morphology, it is advisable to add Dropp preparation as a cytokinin to nutrient medium at concentration of 0.5 mg/l in combination with NAA 0.5 mg/l, and for wahoo (*Euonymus nana*) — Tsitodef preparation at concentration of 0.5 mg/l. For the formation of micro-tubers there should be IBA in nutrient medium at concentration of 3 mg/l.*

Key words: dioscorea, euommus, morphogenesis, micro-propagation, adventitious buds, auxiliary buds, micro-tubers, isolated explants, in vitro.

Доан Тху Тхуи — аспирант кафедры генетики и биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49. Тел.: 8 (499) 976-40-72; e-mail: doanthuy@yahoo.com).

Калашникова Елена Анатольевна — д. б. н., профессор кафедры генетики и биотехнологии РГАУ-МСХА имени К. А. Тимирязева. E-mail: kalashnikova@timacad.ru.

Молканова Ольга Ивановна — к. б. н., ГБС им. Н.В. Цицина (127276. г. Москва, ул. Ботаническая, 31. Тел.: (495) 618-06-49; e-mail: molkanova@mail.ru).