

КЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ РЕДКИХ ВИДОВ ФЛОРЫ КРЫМА IN VITRO: ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Теплицкая Л.М., Бугара А.М., Скляренко Д.А., Сидякин А.И.

Показана перспективность использования различных приемов микроклонального размножения для сохранения генофонда редких и исчезающих видов флоры Крыма. Для ряда видов разработаны эффективные способы размножения в культуре *in vitro* и создана коллекция пересадочных культур.

Ключевые слова: культура тканей *in vitro*, микроклональное размножение, каллусная культура

Длительное время приоритетными объектами биотехнологических исследований были различные виды, сорта и гибриды культурных растений [1 – 3]. Виды дикорастущей флоры в меньшей степени привлекались для подобных исследований. В последнее десятилетие в мире наметилась тенденция к использованию для охраны растительных ресурсов биотехнологических методов, основанных на культивировании клеток, тканей и органов растений в контролируемых условиях *in vitro*. Эти методы становятся составляющей общей стратегии сохранения генофонда растений. Клонирование и размножение наиболее редких и ценных в хозяйственном отношении дикорастущих видов, создание генетических банков на основе пересадочных культур и криобанков, получение биомассы, как источника ценных биологически активных веществ – все это различные направления биотехнологии, позволяющие сохранить генофонд растительных ресурсов [1, 4, 5]. Однако, эти методы пока не нашли применение для сохранения биоразнообразия растительных ресурсов крымского полуострова. Главная причина такого положения заключается в недостаточной изученности биологических особенностей дикорастущих видов, их жизненных репродуктивных стратегий, а также ряда теоретических и методических аспектов, связанных с моделированием и регуляцией морфогенетических процессов в культуре тканей и органов *in vitro*. При этом главной проблемой является подбор оптимального типа экспланта и создание условий для реализации его морфогенетического потенциала в условиях *in vitro*, экспериментальное моделирование процесса регенерации и получения жизнеспособных растений.

Другой аспект использования биотехнологии для сохранения растительных ресурсов связан с проблемой замены дикорастущих растений (лекарственного сырья) на биомассу культивируемых *in vitro* клеток. Преимуществами использования культивируемых клеток являются: возможность получения биологически активных веществ исчезающих и эндемичных видов, получение высокопродуктивных клеточных штаммов, экологически чистых с заданными параметрами роста и метаболизма. Клеточные технологии внедрены во многих странах мира, а также в Украине. В настоящее время на уровне лабораторных и промышленных регламентов получают гликозиды, алкалоиды, нафтохиноновые и

другие соединения, представляющие ценность для медицины, пищевой и парфюмерно-косметической промышленности [9].

Разработка биотехнологических методов в целях сохранения и рационального использования дикорастущих видов флоры Крыма проводится в ТНУ им. В.И. Вернадского, на базе биотехнологического центра и кафедры физиологии растений и биотехнологии.

При выборе объектов исследований мы ограничились видами первой и второй категории редкости, внесенными в Красную книгу Украины и в списки международной Конвенции по торговле представителями дикой флоры и фауны [6 – 8].

Среди существующих биотехнологических подходов наиболее важное значение имеют методы размножения растений, основанные на использовании техники *in vitro*.

В связи с этим целью работы была разработка методов клонирования (размножения) некоторых редких и исчезающих видов флоры Крыма и создание банка клеточных культур для сохранения генофонда и как потенциального источника ценных биологически активных соединений.

Объектами исследования служили редкие, исчезающие и лекарственные виды растений флоры Крыма, относящиеся к различным семействам: Fabaceae (*Onobrychis pallasii* M. Bieb. и *Anthyllis taurica* Juss.), Asteraceae (*Artemisia dracunculus* L.), Orchidaceae, Rosaceae (*Crataegus pojarkovae* Kossyeh.), а также Ranunculaceae (*Clematis vitalba* L.).

В результате проведенных исследований 2003-2007 гг. разработан биотехнологический способ микроклонального размножения редкого вида крымской флоры *Artemisia dracunculus* L. на основе культуры изолированных меристем. Установлено, что оптимальной питательной средой для индукции множественного побегообразования являлась питательная среда Мурасиге и Скуга, дополненная 1,0 мг/л БАП и 0,2 мг/л ИУК. Через три недели культивирования наблюдалось побегообразование, при этом растения имели 3-4 пары настоящих листьев. Для индукции корнеобразования на втором этапе размножения была использована модифицированная питательная среда Мурасиге и Скуга, содержащая 0,5 мг/л БАП и 1,0 мг/л ИУК. Укорененные растения пересаживали в субстрат (торф 1:песок 2) и адаптировали к условиям *in vivo*. Коэффициент размножения составлял 1:7.

При разработке способа микроклонального размножения эндемичного вида флоры Крыма *Onobrychis pallasii* на основе изолированных меристем было показано, что индукция множественного побегообразования происходит на модифицированной среде Мурасиге и Скуга, дополненной 2,0 мг/л БАП и 0,5 мг/л ИМК (рис. 1).



Рис.1. Множественное побегообразование в культуре изолированных почек *Onobrychis pallasii*.

Коэффициент размножения при этом составил 1:24. Для укоренения микропобегов использована модифицированная питательная среда Мурасиге и Скуга, содержащая 1,0 мг/л ИМК. Подобраны условия для адаптации растений, полученных *in vitro* к обычному режиму выращивания. Показано, что оптимальным субстратом при адаптации растений являлась смесь песка, садовой земли и мела (1:2:1), при этом приживаемость растений составляла 75-80 %. Растения *Onobrychis pallasii*, адаптированные к условиям *in vivo*, были высажены на экспериментальном участке Ботанического сада ТНУ им. В.И. Вернадского, с целью создания искусственной популяции данного вида.

Для микроклонального размножения эндемичных видов *Anthyllis taurica* и *Crataegus rojarkovae* оптимальными эксплантами являются изолированные зародыши, выделенные из зрелых семян. Установлено, что для культивирования зародышей *Anthyllis taurica* лучшей средой является среда Уайта, дополненная 0,5 мг/л ИУК и 2,0 мг/л кинетина. При культивировании изолированных зародышей на данной питательной среде в течение 24 дней формировались жизнеспособные сеянцы, имеющие 3-4 пары настоящих листьев. Полученные сеянцы были адаптированы к условиям *in vivo*, при этом, в качестве субстрата использовалась смесь садовой земли и торфа (1:1).

На основе культуры изолированных зародышей из зрелых семян разработан способ размножения эндемичного редкого вида *Crataegus rojarkovae*. В культуре *in vitro* изолированных зародышей на питательной среде Кнудсона через 5-7 суток наблюдалось позеленение семядолей и начало морфогенеза (рис.2). Решающую роль в этом играло использование предварительной холодной стратификации семян при +4⁰ С в течение 3-5 суток. Развитие проростков в условиях *in vitro* составляло 40-45 суток. По сравнению с естественным развитием в открытом грунте питомника, где первые проростки были получены через 16 месяцев развитие сеянцев боярышника Поярковой в условиях *in vitro* ускорялось в 7-8 раз.

На основе культуры *in vitro* вегетативных и генеративных почек, семядолей витрорастений получены каллусные ткани. Экспериментально было показано, что длительно пассируемая каллусная культура боярышника Поярковой сохраняет

высокий морфогенетический потенциал и может быть использована в качестве резерва для микроразмножения этого вида [10].

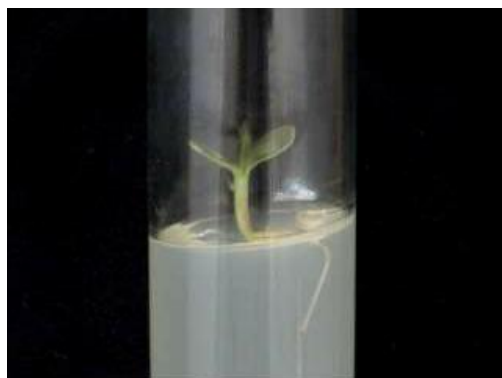


Рис. 2. Сеянцы *Crataegus rojarkovae* на 5-7 сутки культивирования.

Биотехнологический способ размножения редких и исчезающих видов семейства *Orchidaceae* основан на использовании приемов семенного асимбиотического, а также симбиотического размножения *in vitro*. Материалом исследования были виды: *Neottia nidus-avis*, *Cephalanthera domasonium*, *C. longifolia*, *C. rubra*, *Platanthera bifolia*, *Himantoglossum caprinum*, *Anacamptis pyramidalis*, *Orchis simis*, *Orchis militaris*, *O. purpurea*, *O. tridentata*, *Dactylorhiza romana*, *D. incarnata*, *Steveniella satyrioides*, *Ophris taurica*. В результате проведенных исследований были выявлены для каждого вида оптимальные стадии развития семян для введения в культуру *in vitro*, разработаны способы предварительной обработки семян биологически активными веществами (гумат калия, янтарная кислота) позитивно влияющими на скорость и энергию их прорастания. Подобраны составы оптимальных питательных сред и специфические условия культивирования сеянцев *in vitro*. На примере *Cephalanthera domasonium* разработана модель симбиотического размножения видов *Orchidaceae* в культуре *in vitro*. Выделена чистая монокультура симбиотического гриба, даны ее основные биотехнологические характеристики и разработаны способы инфицирования *in vitro* [11]. Разработанные экспериментальные подходы позволили получить сеянцы, адаптированные к естественной среде обитания и почвенной микрофлоре (рис.3).

Для получения пересадочных клеточных культур *Clematis vitalba* L в качестве эксплантов использовали вегетативные апексы, ювенильные растения, а также сегменты листовых пластинок. Максимальная частота каллусогенеза (40-90%) наблюдалась на модифицированной среде Гамборга и Эвелега, дополненной 0,4 мг/л БАП, 2,5 мг/л 2,4-Д и 1,0 мг/л ИУК. Получены штаммы каллусных культур с различной способностью к морфогенезу и отличающиеся по количеству фракций тритерпеновых гликозидов. При химическом анализе морфогенных штаммов выявлена фракция гликозидов, не обнаруженная ранее в интактных растениях.

В неморфогенных штаммах, полученных из листовых эксплантов, обнаружены основные фракции гликозидов, характерных для интактных растений.

Получены первичные и пассируемые каллусные культуры *Fatsia japonica* Decne et Planch. и *Hedera helix* L., отобраны наиболее перспективные штаммы клеточных культур, содержащие тритерпеновые гликозиды.



Рис.3. Адаптация семян *Anthyllis taurica*(а) и *Cephalanthera domasonium* (б) к почвенной культуре.

Таким образом, в результате проведенных исследований по клонированию редких и исчезающих видов флоры Крыма были разработаны этапы клонального микроразмножения *Onobrychis pallasii* и *Arthemisia dracunculoides* на основе культуры изолированных меристем. Разработаны биотехнологические способы размножения видов семейства *Orchidaceae*, трудно размножающихся в естественных условиях на основе семенного асимбиотического и симбиотического размножения *in vitro*. Создана искусственная популяция *Onobrychis pallasii* и *Cephalanthera domasonium* в Ботаническом саду ТНУ. На основе культуры изолированных зародышей *in vitro* получены жизнеспособные семена эндемичных видов флоры Крыма *Anthyllis taurica* и *Crataegus rojarkovae*, которые адаптированы к условиям выращивания *in vivo*. Для ряда видов (*Crataegus rojarkovae*, *Clematis vitalba*), получены каллусные культуры, которые проявляют высокий морфогенетический потенциал и могут быть резервным материалом для микроклонального размножения изученных видов. Проведенные исследования показывают перспективность использования биотехнологических приемов для размножения редких исчезающих и ценных дикорастущих видов флоры Крыма с целью их сохранения, а также как потенциальных продуцентов ценных биологически активных веществ.

Список литературы

1. Бутенко Р.Г., Гусев М.В., Кидкин А.Ф. и др. Биотехнология. Клеточная инженерия.- М.: Высшая Школа, 1987. – 127 с.
2. Мельничук М.Д., Новак Т.В., Кунах В.А. Біотехнологія рослин: підручник.-К.: Поліграф-консалтинг, 2003.- 520с.
3. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технологии микроклонального размножения растений. – К.: Наукова думка. 1992. – 232 с.

-
4. Mitrofanova J.V., Lesnikova N.P., Shishkin V.A. Conservation in vitro of plant genetic resources in Nikitskiy botanical garden // Biotechnology app. for explanation and preservation of plant resources 26-31 May 2002. Yalta, Ukraine abstracts.- P. 60-61.
 5. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биотехнологии растений. – К.: Наукова думка.- 1980.- 488с.
 6. Червона книга України. Рослинний світ/ Ред. Шеляг-Сосонко / К.: Українська енциклопедія,- 1996. – 680 с.
 7. Голубев В.Н., Биологическая флора Крыма. – Ялта, 1996.- 86с.
 8. Материалы к Красной книге Крыма. Вопросы развития Крыма, научно-праактический сборник. Симферополь, Таврия плюс. – 1999.- 164с.
 9. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. – К.: Логос, 2005.- 750с.
 10. Попкова Л.Л., Теплицкая Л.М. Сохранения уникального генотипа боярышника Поярковой (*Crataegus rojarkovae* Kossyuh.) методом каллусных культур // Экосистемы Крыма, их оптимизация и охрана.-Симферополь,-2005ю.-№15. с.41-46.
 11. Теплицкая Л.М. Моделирование симбиоза в культуре семян *Sephalanthera domasonium* (Mill.) Druce in vitro // Ученые записки ТНУ им.В.И. Вернадского, т.19 (59). 2006., №1.- с.93-100.

Теплицкая Л.М., Бугара О.М., Скияренко Д.О., Сидякин А.И. Клональное размножение редких видов флоры Крыма in vitro: проблемы та перспективи // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2008. – Т. 21 (60). – № 2. – С. 127-132.

Показано перспективність різних прийомів мікроклонального розмноження для збереження генофонду рідкісних та зникаючих видів флори Криму. Для деяких видів розроблено ефективні способи розмноження в культурі in vitro та створено колекцію пересадочних культур.

Ключові слова: культура тканин in vitro, мікроклональне розмноження, калусна культура

Teplitskaya L.M., Bugara A.M., Sklyarenko D.A., Sidiyakin A.I. Clonal propagation of rare species of Crimean plants in vitro: problems and perspectives // Uchenye zapiski Tavricheskogo Natsionalnogo Universiteta im. V. I. Vernadskogo. Series «Biology, chemistry». – 2008. – V.21 (60). – № 2. – P. 127-132.

The perspective of different methods of microclonal propagation for preserving genofond of rare and extincting crimean species was shown. Effective propagation methods for in vitro culture for some species were elaborated and long term of grow collection was made.

Keywords: in vitro culture, microclonal propagation, callus culture.

Пост упила в редакцію 20.05.2008 г.
