

отмечены изменения в морфологии листьев, что, возможно, связано с нестабильностью данного сорта.

### **Список литературы**

1. Кунах В.А. Генетическая изменчивость соматических клеток растений. 3. Каллусообразование *in vitro* // Биополимеры и клетка. – 1997. – Т. 13, № 5. – С. 362-366.
2. Набиева А.Ю., Дорогина О.В., Красников А.А. Размножение и сохранение в культуре *in vitro* двух редких видов лилий – *Lilium distichum* Nakai и *L. cernuum* Kom. // Раст. ресурсы. – 2008. – Т. 44, Вып. 2 – С. 23-29.
3. Швецов С.Г., Гамбург К.З. Поглощение и метаболизм 2,4-Д в суспензионной культуре клеток кукурузы и сои // Физиология растений. – 1980. – Т. 27, № 4. – С. 746-755.
4. Чурикова О.А. Изучение закономерностей функционирования верхушечной меристемы побега и особенностей морфогенетических процессов в культурах *in vitro* растений разных таксономических групп // Вестн. Моск. ун-та. Сер. Биология. – 2005. – № 3. – С. 52-64.
5. Nuclear fragmentation followed by mitosis as a mechanism for wide number variation in tissue culture; its implications for plant regeneration / D'Amato F., Bennici A., Cionini P.G., Barocelli S., Lupi M.C. // Plant Cell Culture: Results and Perspectives. – Amsterdam: Elsevier, 1980. – P. 62-72.
6. Heuser C.W., Apps D.A. *In vitro* plantlet formation from flower petal explants of *Hemerocallis* cv. Chipper Cherry // Can. J. Bot. – 1976. – V. 54. – P. 616-618.
7. Hussey G. Totipotency in tissue explants and callus of some members of the Liliaceae, Iridaceae and Amaryllidaceae // J. Exp. Bot. – 1975. – 26. – P. 253-262.
8. A method for inflorescence proliferation / Lin C.-S., Chen C.-T, Lin C.-C., Chang W.-C. // Plant Cell Rep. – 2003. – V. 21. – P. 838-843.
9. Lubomski M. Shoot multiplication and rooting of *Hosta sieboldiana* cv. Gold Standard using cultured shoot tips // Acta Hort. – 1989. – N 251. – P. 223-228.
10. Paek K.Y., Ma S.H. *In vitro* propagation of hosta using cultured shoot tips and somaclonal variability of regenerants // Acta Hort. – 1996. – N 440. – P. 576-581.
11. Papachatzi P.M., Hammer P.A., Hasegava P.M. *In vitro* propagation of *Hosta decorata* "Thomas Hogg" using cultured shoot tips // J. Am. Soc. Hort. Sci. – 1981. – V. 106, N 2. – P. 232-236.

### **КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ РЕДКОГО СИБИРСКОГО ВИДА *GUELDENSTAEDTIA MONOPHYLLA* FISCH.**

Г.Г. МАЙСТРЕНКО<sup>2</sup>, кандидат биологических наук;  
Т.И. НОВИКОВА<sup>1</sup>, доктор биологических наук;  
И.Ю. СЕЛЮТИНА<sup>1</sup>, кандидат биологических наук;  
К.К. СИДОРОВА<sup>2</sup>, доктор биологических наук

<sup>1</sup>Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, Новосибирск, Россия,

<sup>2</sup>Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

### **Введение**

Гюльденштедтия однолистная (*Gueldenstaedtia monophylla* Fisch.) семейства *Fabaceae* – реликт третичного периода, эндем центральной Азии. Вид имеет дизъюнктивный ареал и встречается в горностепном поясе центрального, реже юго-восточного Алтая, а также в Туве и Монголии [8, 16] (рис. 1). Обычно он представлен небольшим числом популяций, строго приуроченным к засушливым каменистым

местообитаниям, имеющим тенденцию к сокращению. *G. monophylla* внесена в Красную книгу РСФСР и СССР [5, 6] со статусом 3(R) – редкий вид. В региональные сводки [3, 4] вид внесен со статусом 2 (U) – уязвимый таксон.



**Рис. 1. *Gueldenstaedtia monophylla* в природных условиях**

В литературе отсутствуют *G. monophylla* в условиях *in vitro*.

Целью данного исследования была разработка метода клonalного микроразмножения гюльденштедтии однолистной и сохранение ее в коллекции *in vitro*.

### Объекты и методы исследования

В качестве исходного материала для исследований использовали семена гюльденштедтии однолистной из двух природных ценопопуляций Онгудайского района Республики Алтай, отличающихся по интенсивности пастбищного использования.

Работу в асептических условиях, приготовление питательных сред проводили по общепринятым методикам [1]. Поверхностную стерилизацию семян проводили в растворе 70%-ного этанола (20 сек) и 0,15%-ном растворе  $HgCl_2$  (2 мин). Затем стерильные семена промывали в трех сменах стерильной дистиллированной воды и помещали на агаризованные среды – водный агар, среда МС [14].

Культивирование проводили на питательных средах МС,  $\frac{1}{2}$ МС и Гамборга и Эвелега (B5) [12]. В состав сред вносили регуляторы роста растений: 6-бензиламинопурин (БАП) в концентрациях 0,1-1,0 мг/л, кинетин (КИН) в концентрации 1 мг/л,  $\alpha$ -нафтилуксусную кислоту (НУК) в концентрациях 0,1-0,5 мг/л.

Растения культивировали в биологических пробирках объемом 40 мл и банках объемом 100 и 200 мл при освещении люминесцентными лампами 6000 люкс и 16-часовом фотопериоде. Коллекцию стерильных растений хранили при пониженных температурах ( $7^{\circ}C$ ), в условиях замедленного роста в световом термостате RuMed (Германия). В таблице приведены средние арифметические данные и их отклонения, вычисленные по Доспехову [2]. Каждый вариант опыта проводили в 10 повторностях.

### Результаты и обсуждение

**Проращивание семян в условиях *in vitro*.** Известно, что представители семейства Fabaceae относятся к эволюционно продвинутым видам, у которых отсутствует или имеется неглубокий покой семян [7]. Другой особенностью семян бобовых является достаточная жесткость семенных оболочек, что препятствует проникновению влаги и вызывает необходимость проведения скарификации семян для прорастания. Семена из двух изученных популяций отличались по степени зрелости: в популяции № 3 они были

Важнейшими причинами, ограничивающими распространение вида, являются: низкая семенная продуктивность, высокая степень элиминации проростков и ювенильных особей, а также длительный (20 лет) прегенеративный период. Известно лишь семенное размножение гюльденштедтии. Для сохранения вида требуется проведение охранных мероприятий как в условиях *in situ*, так и *ex situ*. Первичные опыты по интродукции показали очень низкую приживаемость гюльденштедтии однолистной (1%) в новых условиях обитания [9]. В последние годы для сохранения *ex situ* редких и исчезающих видов, имеющих проблемы при размножении традиционными способами, успешно используются методы клonalного микроразмножения [11, 13].

данные по методам размножения и сохранения

зеленоватыми, недозрелыми и не прорастали на фильтровальной бумаге, в популяции № 5 наблюдали зрелые семена.

При использовании питательных сред и освещения люминесцентными лампами стерильные незрелые семена удалось прорастить без скарификации. Начало прорастания отмечено на вторые сутки, через неделю процент всхожести семян составил 33-37%, через две недели – 50%. Для прорастания стерильных зрелых семян (популяция № 5) требовалась скарификация. После неё, через неделю прорастало 80-90% семян, через две недели – 100% семян. Полученные результаты не согласуются с данными, приведенными для этого вида Г.П. Семеновой [10]. Автор относит *G. monophylla* к термопсихрофильной группе, для которой необходимо проведение холодовой стратификации в течение 20-35 сут для массового прорастания семян.

Таким образом, в условиях *in vitro* можно прорастить свежесобранные недозрелые семена и, после скарификации, зрелые семена без дополнительной холодовой стратификации.

**Морфогенез и регенерация побегов *G. monophylla* в культуре *in vitro*.** Проросток гюльденштедтии однолистной состоит из округлых семядолей размером 0,5 x 0,3 см, гипокотиля длиной 1,6-2,4 см и корня розового цвета вначале стержневого, позже утолщающегося. Через 2-3 недели на конусе нарастания побега возникают первичные, а затем и настоящие длинночерешковые листья. Побег короткометамерный, розеточного типа. У месячных ювенильных растений число листьев достигает 10-12 штук.

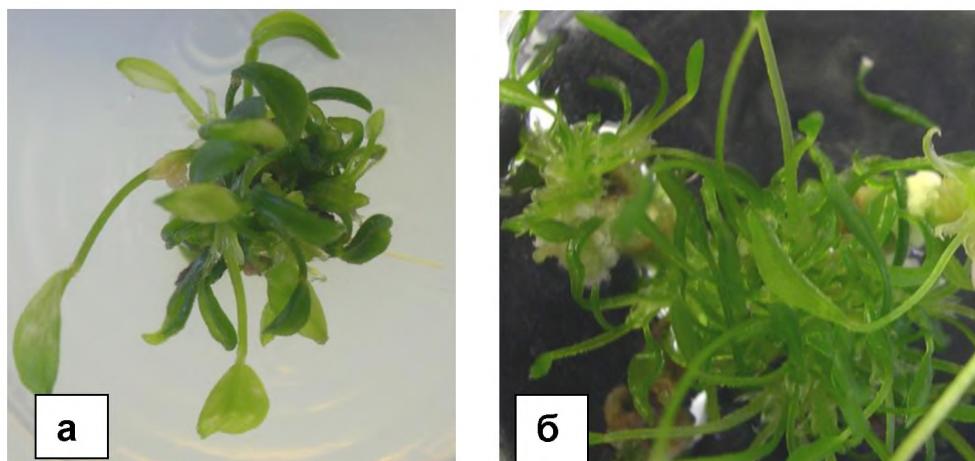
При использовании частей проростков в качестве эксплантов отмечены следующие морфогенетические реакции в зависимости от типа экспланта и концентраций регуляторов роста:

- целые семядоли и их части на средах с добавлением цитокинина БАП в диапазоне концентраций (0,2-1,0 мг/л) не обладали способностью к регенерации новых клонов. В варианте с равным количеством цитокинина и ауксина (по 0,5 мг/л БАП и НУК) по краю среза семядольного листа образовывался зернистый каллус, не способный к дальнейшему морфогенезу;

- сегменты гипокотиля и корней в вариантах с преобладанием ауксинов над цитокининами (1,0 мг/л НУК и 0,5 мг/л БАП) также формировали каллус и не использовались в дальнейших опытах. Прямого органогенеза из ткани в указанных вариантах опыта не наблюдали;

- перспективным эксплантом являлся конус нарастания побега. На среде В5 с добавлением 1,0 мг/л БАП на нём наблюдали образование единичных пазушных побегов или почек в пазухах семядолей и первого листа (варианты с 0,1-0,5 мг/л НУК). Совместное применение ауксинов и цитокининов (0,1 мг/л НУК и 0,2 мг/л БАП) способствовало появлению почек в листовых пазухах и удлинению междуузлий побега, что позволило в дальнейшем проводить микрочеренкование.

**Оптимизация протокола микроразмножения *G. monophylla*.** Для оптимизации протокола клonalного микроразмножения гюльденштедтии однолистной использовали два подхода. Первый заключался в воздействии на семена цитокининами БАП и КИН. Установлено, что через две недели после инкубации семян на среде В5 с цитокининами происходила активация развития пазушных меристем. При последующих пассажах на питательной среде ½ МС без внесения регуляторов роста была отмечена интенсивная регенерация пазушных побегов. В варианте с применением БАП количество пазушных побегов было почти в два раза больше, чем в варианте с КИН (рис. 2 а; табл.).



**Рис. 2. Регенерация побегов: а) на ½ МС после активизации развития семян на среде В5 с добавлением 1,0 мг/л БАП; б) на ½ МС, содержащей 0,4 мг/л НУК и 1 мг/л БАП**

Таблица  
Влияние типа экспланта и регуляторов роста на регенерацию побегов  
*Gueldenstaedtia monophylla*

Тип экспланта	Варианты питательных сред	Число побегов после двух пассажей, шт./эксплант
Семена	B5 + БАП (1,0 мг/л) – 1 пассаж ½ МС без гормонов – 2 пассаж	11,6 ± 0,7
	B5 + КИН (1,0 мг/л) – 1 пассаж ½ МС без гормонов – 2 пассаж	6,4 ± 0,9
Конус нарастания побегов	B5 + НУК (0,1 мг/л) + БАП (0,2 мг/л) – 1 пассаж ½ МС + НУК (0,4 мг/л) + БАП (1,0 мг/л) – 2 пассаж	21,5 ± 0,9

Таким образом, культивирование семян на средах, содержащих цитокинин, с последующим переносом на безгормональные среды позволяет существенно ускорить массовое размножение регенерантов. Полученные данные согласуются с результатами, приведенными Р. Николик с соавторами [15], которые исследовали действие различных цитокининов, включая БАП и КИН, на активацию развития семян другого бобового растения – *Lotus corniculatus* L.

Второй подход, используемый в работе, заключался в двухэтапной активации развития конуса нарастания регуляторами роста. Для индукции использовали среду B5, дополненную 0,1 мг/л НУК и 0,2 мг/л БАП. Через месяц культивирования материала для дифференциации переносили на среду ½ МС, содержащую более высокие концентрации ауксина и цитокинина (0,4 мг/л НУК и 1 мг/л БАП), что позволило получить множественную пролиферацию почек и развитие из них побегов (табл.; рис. 2 б). Второй подход является более эффективным для микроразмножения гюльденштедтии, чем предварительная активация развития семян цитокининами (табл.).

На этапе укоренения побегов оптимальной средой была среда ½ МС с добавлением 1% активированного угля. Адаптация микр клонов к условиям *ex vitro* нами не изучалась и является задачей дальнейших исследований.

### Выводы

1. Разработан эффективный способ микроразмножения гюльденштедтии однолистной, выявивший высокий регенерационный потенциал вида.
2. Увеличение количества побегов происходит за счет пролиферации пазушных меристем, что предполагает отсутствие генетической вариабельности.
3. Полученные микроклоны сохраняются в условиях замедленного роста. *G. monophylla* включена в коллекцию *in vitro* редких видов растений азиатской части России, созданную в ЦСБС.

*Работа выполнена при поддержке гранта Программы Президиума РАН «Биологическое разнообразие».*

### Список литературы

1. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
2. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. – М.: Агропромиздат, 1985. – С. 174-178.
3. Красная книга Республики Алтай. Растения. – Новосибирск: Наука, 1996. – 130 с.
4. Красная книга Республики Тыва. Растения. – Новосибирск: Наука, 2002. – 149 с.
5. Красная книга РСФСР. Растения. – М.: Росагропромиздат, 1988. – 590 с.
6. Красная книга СССР. – М.: Лесная пром-сть, 1984. Изд. 2-е. – Т. 2. – 480 с.
7. Nicolaeva M.G. Особенности прорастания семян в зависимости от филогенетического положения растений и эколого-географических условий их обитания // Физиология растений. – 1999. – Т. 46, № 3. – С. 432-437.
8. Пяк А.И. Петрофиты Русского Алтая. – Томск: Изд-во Томского ун-та, 2003. – 200 с.
9. Селютина И.Ю., Черкасова Е.С., Карнаухова Н.А. Структура ценопопуляций редкого вида *Gueldenstaedtia monophylla* (Fabaceae) в Центральном Алтае // Ботанический журнал. – 2008. – Т. 93, № 9. – С. 1414-1423.
10. Семенова Г.П. Условия проращивания семян редких и исчезающих растений флоры Сибири // Сибирский экологический журнал. – 2002. – N 2. – С. 221-236.
11. *In vitro* micropropagation of *Primula scotica*: a rare Scottish plant / Benson E.E., Danaher J.E., Pimbley I., Anderson C.T., Wake J., Daley S., Adams L.K. // Biodiversity and Conservation. – 2000. – V. 9, N 6. – P. 711-726.
12. Gamborg O.L, Eveleigh D.E. Culture methods and detection of glucanases in suspension cultures of wheat and barley // Can. J. Biochem. – 1968. – V.46, N 5. – P. 417-421.
13. Fay M.F. In what situation is *in vitro* culture appropriate to plant conservation? // Biodiversity and Conservation. – 1994. – V. 3, N 2. – P. 176-183.
14. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – V. 15. – P. 473-497.
15. Effects of cytokinins on *in vitro* seed germination and early seedling morphogenesis in *Lotus corniculatus* L. / Nikolic R., Mitic N., Miletic R., Nesovic M. // J. of Plant Growth Regulation. – 2006. – V. 25, N 3. – P. 187-194.
16. Zhu X. A revision of genus *Gueldenstaedtia* (Fabaceae) // Ann. Bot. Fennici. – 2004. – V. 41. – P. 283-291.