

УДК 507.75:581.9

ДЛИТЕЛЬНОЕ СОХРАНЕНИЕ *ONOBRYCHIS PALLASII* НА ОСНОВЕ ЭМБРИОКУЛЬТУРЫ *IN VITRO*

Бугара И. А.

*Таврический национальный университет имени В. И. Вернадского, Симферополь,
igorbugara@gmail.com*

Разработаны приемы длительного сохранения *Onobrychis pallasii* (Willd.) M. Bieb. в эмбриокультуре *in vitro* на основе сочетания осмотического стресса и низкой положительной температуры. Показана возможность культивирования изолированных зародышей на протяжении 360 суток на первичной питательной среде в течение одного цикла выращивания.

Ключевые слова: *Onobrychis pallasii*, эмбриокультура, длительное сохранение *in vitro*.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время, одной из приоритетных задач, имеющих общебиологическое значение, является сохранение генофонда редких и исчезающих растений. Традиционно применяемые для решения этой задачи подходы, основаны на расширении природоохранных территорий, создании живых коллекций в ботанических садах, хранении зародышевой плазмы в банке семян. Однако, редкие и исчезающие виды часто характеризуются низкой всхожестью семян в обычных условиях. Вместе с тем, у невыполненных семян резко сокращаются сроки хранения, что накладывает существенные ограничения на использование традиционных приемов сохранения растений [1]. В связи с этим, для решения вопросов сохранения биоразнообразия возникает необходимость использования методов, основанных на культивировании изолированных тканей растений в контролируемых условиях *in vitro*.

Сотрудниками биотехнологического центра Таврического национального университета имени В. И. Вернадского начиная с 2000 года, ведутся работы, направленные на размножение и сохранение многих редких и исчезающих растений природной флоры Крыма в культуре *in vitro* [2, 3]. Одним из первых объектов исследования стал уникальный редкий вид семейства *Fabaceae*, реликт третичного периода – *Onobrychis pallasii* (Willd.) M. Bieb., относящийся в Красной книге Украины к 2-й категории редкости. Использование приемов клонального размножения, основанных на культивировании изолированных зародышей *in vitro* позволило авторам массово размножить растения эспарцета Палласа с последующей возможностью репатриации, для восстановления численности природных популяций [4]. Проведенные нами исследования, направленные на разработку приемов депонирования *O. pallasii* на основе эмбриокультуры *in vitro* позволят не только существенно расширить возможности разработанной технологии массового размножения, но и эффективно реализовать возможность длительного сохранения растений в контролируемых условиях.

В этой связи, целью работы являлась разработка биотехнологических приемов длительного сохранения *O. pallasii* на основе эмбриокультуры *in vitro* в условиях осмотического стресса и низкой положительной температуры.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служили семена *O. pallasii* с разным сроком хранения. При выполнении экспериментальной работы использовали методы, общепринятые в исследованиях по культуре изолированных тканей растений [5]. Изолирование зародышей эспарцета Палласа проводили под бинокулярным микроскопом МБС-10 при помощи скальпеля и препаровальной иглы ланцетовидной формы. Экспланты помещали на поверхность безгормональных агаризованных питательных сред Мурасиге и Скуга [6], содержащих различные концентрации сахарозы и маннита. В качестве культуральных сосудов использовали химические пробирки 1,5 × 16 см с 10 мл питательной среды. Изолированные зародыши культивировали в условиях термостатированного помещения при температуре 24–26 °С, освещенности 2–3 тысячи люкс и 16-ти часовом фотопериоде. Низкотемпературное хранение эксплантов проводили в темноте, при температуре +4 °С.

В процессе культивирования проводили визуальный анализ развития эксплантов и оценивали последовательность прохождения отдельных этапов морфогенеза.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Подбор условий длительного сохранения. На начальных этапах исследования по оптимизации условий длительного сохранения *O. pallasii* в культуре *in vitro* существенную роль играет подбор оптимальной питательной среды для культивирования изолированных зародышей. Исследования, выполненные ранее Д. А. Скляренко и А. М. Бугара, показали высокую эффективность использования безгормональной питательной среды Мурасиге и Скуга (МС) для культивирования семян и изолированных зародышей *O. pallasii* [4]. Вместе с тем, для обеспечения длительного сохранения зародышевой плазмы в условиях *in vitro* необходимо подобрать условия, максимально замедляющие процессы морфогенеза, при сохранении нормальных параметров развития культуры.

С целью изучения влияния состава питательных сред на интенсивность ростовых процессов в эмбриокультуре *O. pallasii* мы использовали четыре варианта модифицированной нами питательной среды МС. Для замедления ростовых процессов и сохранения генофонда растений в условиях *in vitro* в состав используемых питательных сред рекомендуется добавлять осмотически активные соединения в повышенной концентрации (сахароза, маннит). Исходя из данного положения, каждая из используемых нами питательных сред отличалась концентрацией осмотически активных соединений. При этом в качестве контроля использовалась модифицированная питательная среда МС с минимальной концентрацией сахарозы (20000 мг/л) (табл. 1).

Проведенные нами исследования показали, что развитие изолированных зародышей *O. pallasii* наблюдалось на всех используемых питательных средах (рис. 1). Вместе с тем, нами была выявлена зависимость ростовых процессов от состава используемых питательных сред (рис. 2, 3). Так, средняя длина побегов была наибольшей, при использовании модифицированной питательной среды МС3 как на начальных этапах, так и в течение всего периода культивирования. Вероятно, это связано с тем, что повышенное, по сравнению с контролем, содержание сахарозы и добавление маннита в состав питательной среды, может оказывать стимулирующее действие на интенсивность роста микропобегов в эмбриокультуре *O. pallasii in vitro*.

Таблица 1

Концентрации осмотически активных соединений в составе питательных сред Мурасиге и Скуга для культивирования изолированных зародышей *Onobrychis pallasii in vitro* (содержание компонентов в мг/л)

Осмотически активные соединения	МС 1	МС 2	МС 3	МС 4
Сахароза	20000	60000	30000	40000
Маннит	-	-	2000	4000

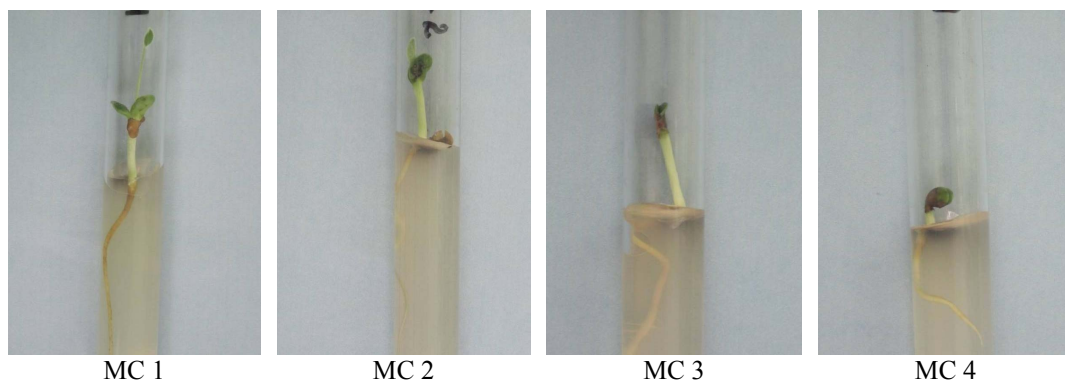


Рис. 1. Особенности ростовых процессов в эмбриокультуре *Onobrychis pallasii in vitro* в зависимости от состава питательной среды (10-е сутки культивирования)

Вместе с тем, совместное использование сахарозы и более высоких концентраций маннита достоверно снижало скорость роста микропобегов, которые на 20-е сутки культивирования достигали высоты $9,3 \pm 0,3$ мм, по сравнению с $16,5 \pm 0,7$ мм в контроле.

Начальные этапы корнеобразования в эмбриокультуре *O. pallasii in vitro* визуально отмечались на первые сутки культивирования. Причем, наибольшая средняя длина корней наблюдалась в контроле, на модифицированной питательной среде МС1. Добавление в питательную среду сахарозы и маннита существенно снижало интенсивность роста корней. Наименьшая средняя длина

ДЛИТЕЛЬНОЕ СОХРАНЕНИЕ *ONOBRYCHIS PALLASII*
НА ОСНОВЕ ЭМБРИОКУЛЬТУРЫ IN VITRO

корней наблюдалась нами при использовании модифицированной питательной среды МС4 и составляла за один цикл выращивания $50,3 \pm 1,2$ мм, при $81,1 \pm 2,4$ мм в контроле.

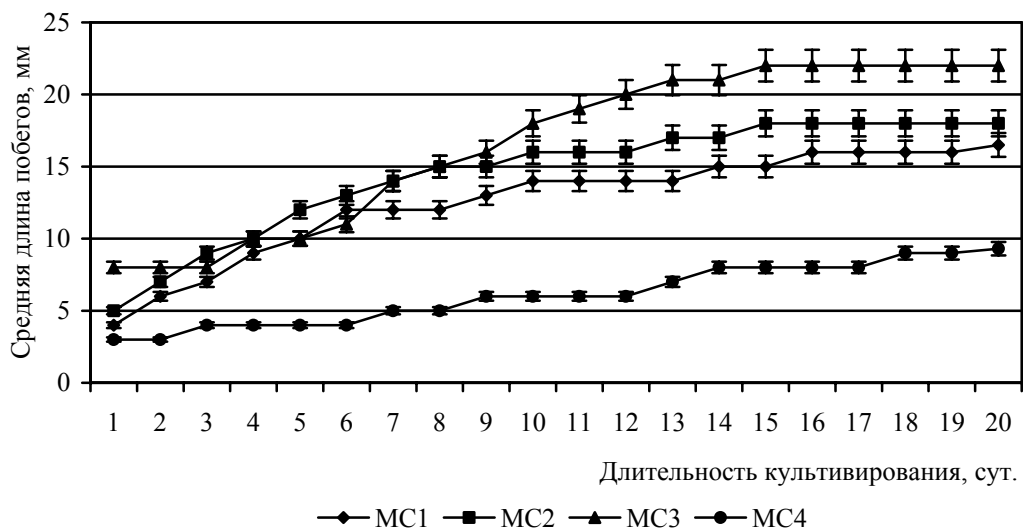


Рис. 2. Изменение средней длины побегов в эмбриокультуре *Onobrychis pallasii* в зависимости от состава питательной среды

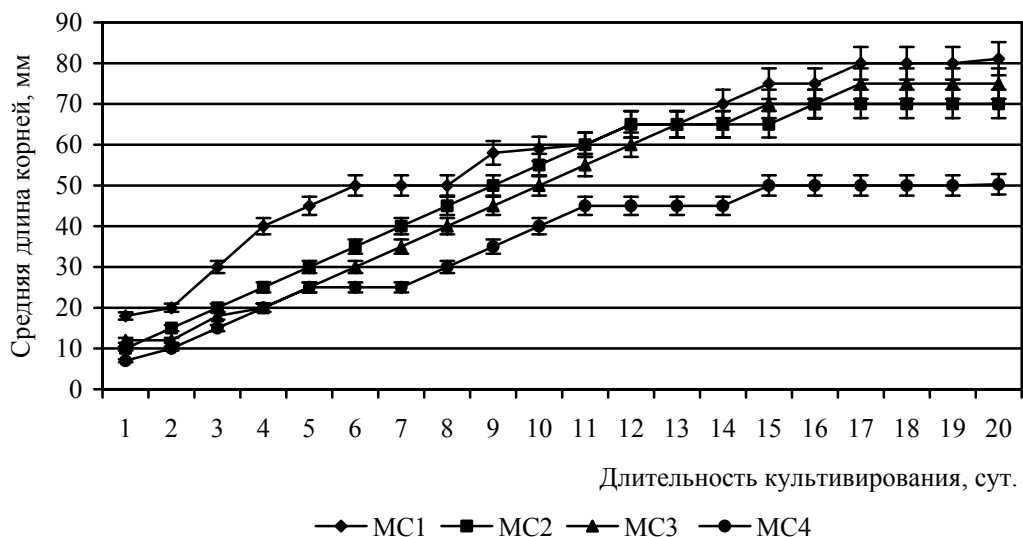


Рис. 3. Изменение средней длины корней в эмбриокультуре *Onobrychis pallasii* в зависимости от состава питательной среды

Проведенные нами исследования показали существенное влияние высоких концентраций сахарозы и маннита на интенсивность ростовых процессов в эмбриокультуре *O. pallasii in vitro*. Добавление в состав питательной осмотически активных веществ значительно снижало скорость роста побегов и корней. Вместе с тем, наименьшая скорость роста побегов и корней наблюдалась при совместном использовании сахарозы и высокой концентрации маннита.

Низкотемпературное хранение. Одним из современных подходов к сохранению генофонда, является депонирование растений *in vitro* в условиях низкой положительной температуры. Данный прием позволяет существенно снизить интенсивность ростовых процессов и, кроме того, температурный фактор способствует замедлению усыхания питательной среды и снижению роста посторонней микрофлоры.

Изучение интенсивности ростовых процессов при депонировании микрорастений в условиях низкой положительной температуры выявило следующие закономерности. Совместное использование в составе питательной среды сахарозы и маннита в высоких концентрациях наряду с влиянием низкой положительной температуры, существенно снижало интенсивность роста побегов и корней (рис. 4, 5).

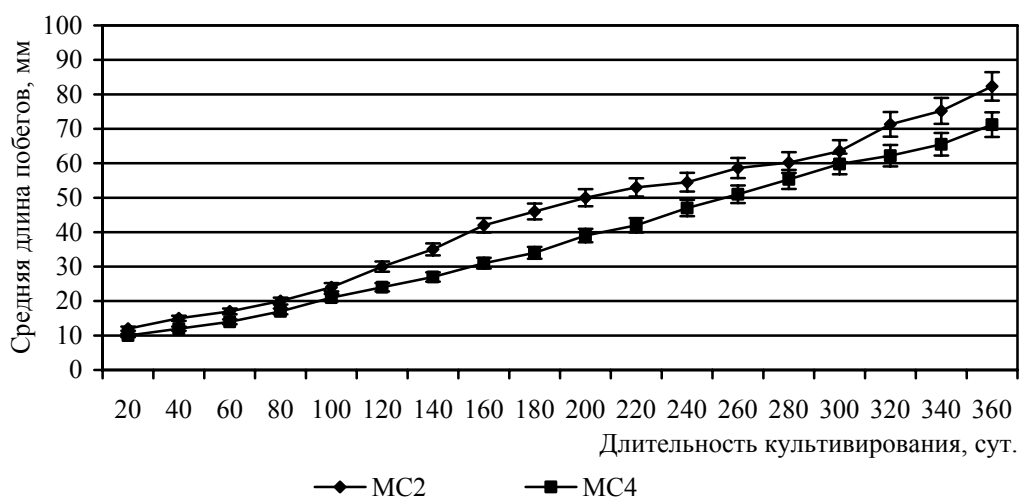


Рис. 4. Изменение средней длины побегов в эмбриокультуре *Onobrychis pallasii* в зависимости от состава питательной среды (температура +4 °С)

На модифицированной питательной среде MC2, содержащей сахарозу в концентрации 60000 мг/л средняя высота побегов за 360 суток культивирования составила $82,3 \pm 2,7$ мм. Вместе с тем, на модифицированной питательной среде MC4, содержащей сахарозу в концентрации 40000 мг/л и маннит в концентрации 4000 мг/л, средняя высота побегов составила $71,2 \pm 1,5$ мм.

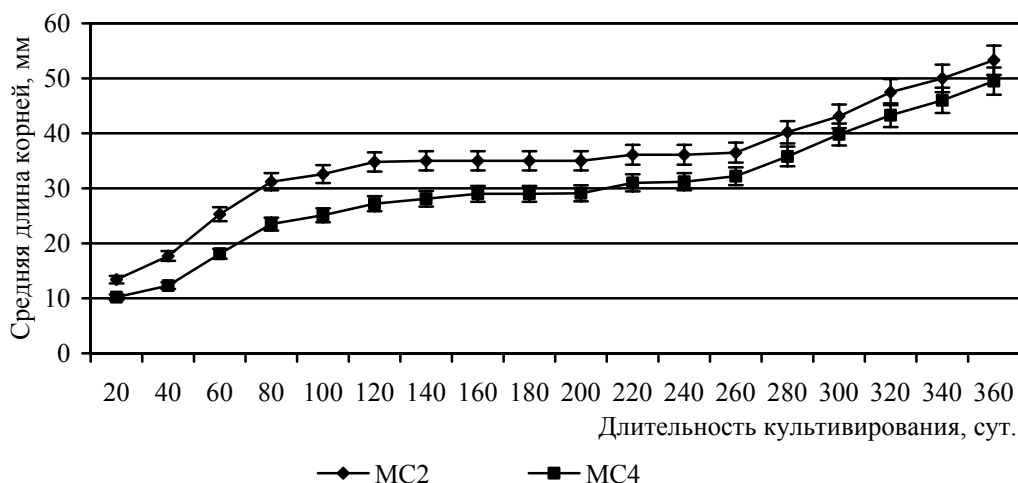


Рис. 5. Изменение средней длины корней в эмбриокультуре *Onobrychis pallasii* в зависимости от состава питательной среды (температура +4 °С)

Начальные этапы корнеобразования на используемых нами модифицированных питательных средах визуально отмечались на третьей сутки культивирования. За 360 суток культивирования на модифицированной питательной среде MC2 средняя длина корней составила $53,3 \pm 1,5$ мм. Совместное использование сахарозы и маннита снижало интенсивность роста корневой системы. После 360 суток культивирования средняя длина корней на модифицированной питательной среде MC4 составила $49,5 \pm 1,1$ мм.

Таким образом, проведенные нами исследования показали существенное влияние сахарозы и высоких концентраций маннита на фоне низкой положительной температуры на интенсивность ростовых процессов в эмбриокультуре *O. pallasii in vitro*. Добавление в состав питательной осмотически активных соединений в сочетании с низкой положительной температурой значительно снижало скорость роста побегов и корней. Вместе с тем, лучшие результаты по замедлению интенсивности ростовых процессов получены нами при совместном использовании, сахарозы и высоких концентраций маннита в питательной среде.

Адаптация растений-регенерантов к обычным условиям выращивания. Адаптация растений-регенерантов к обычным условиям выращивания является ответственным этапом, завершающим процесс сохранения растений в условиях *in vitro*. Наиболее благоприятное время для пересадки пробирочных растений – весна или начало лета. Растения с двумя-тремя листьями и хорошо развитой корневой системой осторожно вынимали из пробирок пинцетом с длинными концами или специальным крючком. Корни отмывали от остатков агар-агара и высаживали в почвенный субстрат, предварительно простерилизованный при 85–90 °С в течение 1–2 часов.

Для акклиматизации микрорастений к обычным условиям выращивания *in vitro*, после 360 суток культивирования в условиях низкой положительной температуры культуральные сосуды 14 суток держали на стеллажах при стандартных режимах (температура 24–26 °С, освещенность 2–3 тысячи люкс, 16-ти часовой фотопериод).

На 7 сутки содержания микрорастений в стандартных условиях визуально отмечались признаки активного отрастания корней и побегов. Данный факт свидетельствует об адаптации растений к условиям освещенности и нормальной для процессов морфогенеза температуре.

Адаптацию растений-регенерантов *O. pallasii* к условиям *in vivo* проводили на различных субстратах, отличающиеся компонентным составом, при этом, приживаемость растений-регенерантов находилась в пределах 70–95%. Лучшие результаты нами были получены при использовании в качестве субстрата смеси торфа и керамзита в соотношении (1:1). Преимущество данного субстрата для адаптации растений-регенерантов было показано в работах по культивированию *in vitro* мяты и розы [7, 8]. Через 45 суток выращивания растений-регенерантов длина побегов увеличивалась в среднем в 1,3 раза, количество листьев на побегах – в 1,6 раза, длина корней – в 1,7 раза (табл. 2).

Таблица 2

Биометрические показатели растений-регенерантов *Onobrychis pallasii* в процессе выращивания в условиях *in vivo* (субстрат торф-керамзит 1:1)

Длина основного побега, мм		Количество листьев, шт.		Длина корней, мм	
1-е сутки	45-е сутки	1-е сутки	45-е сутки	1-е сутки	45-е сутки
75,5±3,3	102,3±3,9	4,5±0,3	7,5±0,7	62,7±4,3	106,0±2,5

Таким образом, проведенные нами исследования показали принципиальную возможность длительного депонирования *O. pallasii* на основе эмбриокультуры *in vitro*. Разработанные нами биотехнологические приемы позволяют существенно увеличить сроки содержания растений в контролируемых условиях и, тем самым, существенно расширить потенциальные возможности культуры *in vitro*, как современного подхода к сохранению генофонда редких и исчезающих растений флоры Крыма.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны биотехнологические приемы длительного сохранения *Onobrychis pallasii* на основе эмбриокультуры *in vitro* при сочетании осмотического стресса и низкой положительной температуры.

2. Показана возможность культивирования изолированных зародышей на протяжении 360 суток на первичной питательной среде в течение одного цикла выращивания.

Список литературы

1. Новикова Т. И. Сохранение редких и полезных растений в коллекции *in vitro* Центрального сибирского ботанического сада / Т. И. Новикова, А. Ю. Набиева, Т. В. Полубоярова // Вестник ВОГиС. – 2008. – Т. 12, № 4. – С. 564–571.
2. Теплицкая Л. М. Клональное размножение редких видов флоры Крыма *in vitro*: проблемы и перспективы / Л. М. Теплицкая, А. М. Бугара, Д. А. Складенко, А. И. Сидякин // Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского. Сер. «Биология, химия». – 2008. – Т. 21, № 2. – С. 127–132.
3. Складенко Д. А. Культивирование изолированных зародышей эспарцета Палласа (*Onobrychis pallasii* Bieb.) *in vitro* с целью сохранения биологического разнообразия Крыма / Д. А. Складенко, А. М. Бугара // Экосистемы Крыма, их оптимизация и охрана (тематич. сб. науч. работ). – 2002. – Вып. 12. – С. 44–48.
4. Складенко Д. А. Використання клонального мікророзмноження *Onobrychis pallasii* (Willd.) Bieb. з метою збереження виду / Д. А. Складенко, А. М. Бугара // Наукові основи збереження біотичної різноманітності (тематич. зб.). – Вип. 6. – 2004. – С. 165–169.
5. Калинин Ф. Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф. Л. Калинин, В. В. Сарнацкая, В. Е. Полищук. – К.: Наукова думка, 1980. – 488 с.
6. Murashige T. A. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture / T. Murashige, F. Skoog // *Physiol. Plant.* – 1962. – Vol. 15, N 13. – P. 473–497.
7. Бугара И. А. Индуцированный морфогенез и клональное микроразмножение перспективных сортов мяты: автореф. дисс. ... канд. биол. наук / И. А. Бугара; НБС–ННЦ УААН. – Ялта, 2006. – 20 с.
8. Пилунская О. А. Физиологические особенности клонального микроразмножения розы эфиромасличной: автореф. дисс. ... канд. биол. наук / О. А. Пилунская; Инст. физиол. раст. и генки НАН Украины. – К., 2003. – 20 с.

Бугара І. О. Тривале збереження *Onobrychis pallasii* на основі ембріокультури *in vitro* // Екосистеми, їх оптимізація та охорона. Сімферополь: ТНУ, 2013. Вип. 9. С. 142–149.

Розроблено прийоми тривалого збереження *Onobrychis pallasii* (Willd.) M. Bieb. в ембріокультурі *in vitro* на основі поєднання осмотичного стресу та низької позитивної температури. Показана можливість культивування ізольованих зародків протягом 360 діб на первинній живильному середовищі протягом одного циклу вирощування.

Ключові слова: *Onobrychis pallasii*, ембріокультури, тривале збереження *in vitro*.

Bugara I. A. Long-term conservation *Onobrychis pallasii* in embryo culture *in vitro* // Optimization and Protection of Ecosystems. Simferopol: TNU, 2013. Iss. 9. P. 142–149.

Processes of long-term conservation of *Onobrychis pallasii* (Willd.) M. Bieb. in embryo culture *in vitro* using a combination of osmotic stress and low positive temperature is developed. The possibility of culturing isolated embryos amount 360 days on primary medium for one growing cycle was shown.

Key words: *Onobrychis pallasii*, embryo, long-term conservation *in vitro*.

Поступила в редакцію 16.07.2013 г.