

V. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ СИСТЕМАТИКИ РАСТЕНИЙ И БИОТЕХНОЛОГИИ.

УДК 581.4

Д.В. Балабова
В.В. Соловьева

D. Balabova
V. Solovieva

МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ РАСТЕНИЙ РОДА *HOSTA*

MICROPROPAGATION OF *HOSTA* PLANTS

Показано, что получение высоко морфогенного каллуса зависит от типа экспланта. Морфогенный каллус индуцирован на среде МС, дополненной БАП (5–10 мкМ) и АТХП (20 мкМ). Микро размножение растений хосты в культуре почек *in vitro* осуществлено на питательной среде МС с цитокинином (БАП). На стадии укоренения лучшие результаты получены на среде с 0,5 мкМ НУК.

Род *Hosta* Tratt. (семейство Liliaceae) – насчитывает около 40 видов, приуроченных к умеренно теплым областям Восточной Азии и Дальнего Востока (Жизнь растений, 1982). Хосты – декоративнолиственные травянистые многолетники с укороченным компактным или слабо разветвленным корневищем. Эти теневыносливые, зимостойкие и неприхотливые растения идеально подходят для рокариев и посадок вблизи искусственных водоемов (Калиженкова и др., 2002).

Традиционно хосты размножают делением куста. Молодые растения плохо переносят пересадку, и для возобновления роста им требуется хотя бы один вегетационный сезон. Нарастание новых побегов происходит очень медленно. Для повышения эффективности вегетативного размножения в настоящее время применяют метод микро размножения.

Цель настоящей работы – изучение регенерационной способности изолированных тканей хосты сорта Френсис Уильямс.

Материалы и методы исследований.

В качестве исходного материала для индукции каллусогенеза были использованы неокрашенные лепестки бутонов, сегменты черешков и цветоносов, а также листья размножаемых в культуре *in vitro* растений, а для побегообразования – почки корневищ. Первичный растительный материал промывали в проточной воде, а затем стерилизовали в 0,1 % растворе сулемы (черешки, цветоносы и участки корневищ – 20 мин., бутоны – 15 мин.), после чего трижды промывали стерильной дистиллированной водой.

Работу в асептических условиях, приготовление и стерилизацию питательных сред проводили по общепринятой методике (Калинин и др., 1980). Минеральную основу агаризованных питательных сред готовили по прописи Мурасиге и Скуга (МС); перед автоклавированием рН питательной среды доводили до 5,8–5,9. Основную питательную среду дополняли различными концентрациями регуляторов роста: 6-бензиламинопурином (БАП) 0,5 – 30 мкМ, 4-амино-3,5,6-трихлорпиколиновой кислотой (АТХП) 1 – 20 мкМ, α -нафтилуксусной кислотой (НУК) 0,05 – 10 мкМ, β -индолилмасляной кислотой (ИМК) 0,05 – 0,5 мкМ, 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой (2,4-Д) 10 мкМ.

Индукцию и культивирование каллуса осуществляли в условиях темноты, морфогенез индуцировали в условиях фотопериода (16/8 часов) при $24 \pm 1^\circ\text{C}$.

Результаты и обсуждение.

Таблица 1

Влияние БАП на регенерацию и развитие почек в культуре розеток хосты сорта ‘Френсис Уильямс’ (n = 12)

мкМ	Кол-во почек de novo, шт.	Розетки		Каллус
		кол-во, шт.	высота, мм	
0,5	4,0 \pm 1,6	1,8 \pm 1,6	29 \pm 8,6	-
1	3,8 \pm 1,7	1,8 \pm 1,7	22 \pm 4,8	-
5	4,9 \pm 1,5	2,3 \pm 1,6	20 \pm 1,6	-
30	6,3 \pm 2,0	2,8 \pm 1,5	10 \pm 1,4	+

Таблица 2

Влияние типа экспланта на каллусогенез и регенерацию почек хосты сорта ‘Френсис Уильямс’ *in vitro* (среда МС + БАП 20мкМ + АТХП 1мкМ) (n = 12)

Тип экспланта	Каллус		Интенсивность геммогенеза, шт./экспл.
	всего, шт.	с почками, шт./%	
Фрагмент листа	36	9/25	7,1±1,6
Фрагмент лепестка	14	10/71	4,2±1,2

Регенерация растений является самым важным этапом во всей методологии культуры клеток и тканей. Процесс регенерации зависит от совокупности различных факторов. Одним из них является тип используемого экспланта.

Первичные экспланты (кроме почек) культивировали на средах для каллусообразования. Для этого фрагменты черешков и цветоносов помещали на среды, дополненные одним из ауксинов (НУК, или АТХП, или 2,4-Д) – 10 мкМ и цитокинином (БАП) – 2 или 10 мкМ. Лепестки культивировали на среде с 20 мкМ АТХП и 10 мкМ БАП. Экспланты черешков и цветоносов пролиферировали белый, мелкозернистый каллус на всех вариантах сред. Однако каллус, полученный на питательной среде, содержащей 2,4-Д, при последующем субкультивировании погибал. От лепестков получен каллус желтоватого цвета, плотный, узловатой структуры, он хорошо рос и был в дальнейшем использован в эксперименте по регенерации почек.

Еще одним типом эксплантов являлись почки корневищ. Почки помещали на среду с 5 мкМ БАП. От каждой почки получали по 1–2, реже 3 розетки. Полученные розетки переносили на среды, содержащие от 0,5 до 30 мкМ БАП (табл. 1). В наших экспериментах не установлено достоверных различий по влиянию БАП на число регенерирующих почек и число ведущих розеток. Но отмечено влияние БАП на высоту розеток. Низкие концентрации цитокинина (0,5; 1; 5 мкМ) стимулировали рост розеток в высоту. Средняя высота розеток на этих средах была 29, 22 и 20 мм соответственно. На среде с 30 мкМ БАП – 10 мм. На базальной части эксплантов отметили развитие каллуса.

Листья многих травянистых и древесных растений, используемые в качестве эксплантов, характеризуются высоким морфогенетическим потенциалом. Повышенной регенерационной способностью отличаются центральные жилки листа, характеризующиеся высокими дозами эндогенных гормонов (Дерфлинг, 1985). Кроме того, лист более доступен как эксплант, чем лепестки, являющиеся видоизмененными листьями. Поэтому в наших исследованиях, еще одним типом эксплантов являлись фрагменты листа размножаемых *in vitro* растений. Экспланты пролиферировали каллус на среде, дополненной 5мкМ или 10мкМ БАП и 20мкМ АТХП. Полученный каллус имел такую же морфологию, что и каллусы лепестков (светло-желтый цвет, плотный, узловатой структуры). Этот тип каллуса помещали на среду для регенерации (табл. 2).

Интенсивность геммогенеза у эксплантов листа была выше (7,1±1,6 шт./экспл.), чем у эксплантов лепестка (4,2±1,2шт./экспл.), но частота встречаемости морфогенного каллуса, полученного от лепестков, была значительно больше (71 против 25 %), чем каллуса, полученного от листа. Кроме того, у каллуса листьев отмечен ризогенез, который подавляет формирование зачатков почек. Поэтому первые почки появлялись спустя 2–3 месяца культивирования на среде для регенерации. У каллуса лепестков ризогенез практически не наблюдался. Коэффициент размножения розеток, полученных в культуре каллуса лепестков, был в 2–3 раза больше, чем у розеток, полученных в каллусе листового происхождения.

Таблица 3

Характеристика регенерантов хосты сорта ‘Френсис Уильямс’, укорененных на средах с ауксинами (n = 10)

мкМ	Частота ризогенеза, %	Число корней, шт./экспл.	Средняя длина корня, мм/экспл.	Высота розетки до/после укоренения, мм	Число листьев до/после укоренения, шт./экспл.
НУК					
0,05	100	5,8±1,6	17,3±2,6	24±3,1/28±4,1	3,1±1,4/4,9±1,2
0,1	100	7,4±1,9	8,3±2,3	24±3,4/32±5,2	2,4±1,5/5,3±1,0
0,5	100	11,7±2,5	3,2±1,4	22±3,4/23±3,3	3,3±1,4/5,7±1,1
ИМК					
0,05	100	4,9±1,3	27,0±5,0	24±3,2/26±3,5	2,9±1,4/4,0±1,2
0,1	100	3,9±1,2	24,9±3,2	25±3,3/28±4,0	2,4±1,5/4,3±1,1
0,5	100	6,6±1,2	22,8±4,1	24±3,9/27±4,5	2,6±1,4/4,2±1,2

Размноженные в культуре *in vitro* розетки хосты укореняли. Все розетки укоренялись как на среде полного минерального состава (МС), так и редуцированного вдвое (S МС) без регуляторов роста. На этих средах у розеток регенерировало в среднем по 5–6 корней со средней длиной корня 13 мм. По числу корней, их длине различий не установлено.

Изучено также действие ауксинов ИМК и НУК на процесс укоренения. Для стимуляции ризогенеза ауксины НУК и ИМК часто используют в относительно небольших концентрациях, так как высокие концентрации ауксинов в среде могут стимулировать каллусогенез. Согласно литературным данным, действие ауксина ИМК на процесс ризогенеза имеет положительный эффект для многих растений, например, для хосты – 0,5 мг/л (Калиженкова и др., 2002), *Gloriosa superba* – 4,92 мкМ (Сивакумар, Кришнамурти, 2004). Использование НУК было эффективно для *Stachys sieboldii* – 1 мг/л (Хадеева и др., 1995), трех видов *Iris* – *I. hybrida*, *I. sibirica* и *I. ensata* – 1 мкМ (Вечернина и др., 2004). Результаты эксперимента представлены в таблице 3.

На средах с регуляторами роста образование корней начиналось раньше, чем на средах без регуляторов роста (на 2–4 сутки против 4–6 суток). Частота регенерации корней в каждом варианте составила 100 %. Отметим, что на ризогенез оказывали влияние, как концентрация применяемых ауксинов, так и их химическая природа. Максимальное число корней получено на среде с 0,5 мкМ НУК: на каждой розетке регенерировало в среднем по 12 корней. При концентрации НУК 0,05 мкМ и 0,1 мкМ в 2 раза меньше – 6–7 корней на розетку. Отмечено влияние НУК на длину корней. Длина корней увеличивалась с уменьшением концентрации ауксина НУК в среде – 3, 8 и 17 мм при 0,5; 0,1 и 0,05 мкМ соответственно. На среде с ИМК при всех изученных концентрациях образовывалось в среднем 4–6 корней на розетку, средняя длина корня составила 23 – 27 мм.

Адаптацию растений-регенерантов хосты к условиям выращивания *ex vitro* проводили на гидропонной установке «Минивит 0,35». За период адаптации (20 суток) происходило увеличение корневой системы, высоты розеток, размеров листовой пластинки, удлинение черешков и появление новых листьев. В последующем растения высаживали в открытый грунт, где они успешно развивались.

На основании проведенных экспериментов сделаны следующие выводы:

1. В качестве эксплантов необходимо использовать фрагменты листьев и лепестков, а фрагменты цветоносов и черешков – нецелесообразно.
2. Наибольшей регенерационной способностью характеризуются каллусы, индуцированные от фрагментов лепестка – 4,2 почки на 1 каллус, при частоте регенерации 71 %. Регенерационная способность каллусов листового происхождения – 7,1 почки на 1 каллус, при частоте регенерации 25 %.
3. При микроразмножении розеток можно использовать БАП в широком диапазоне концентраций (0,5–30 мкМ).
4. При укоренении розеток целесообразно использовать 0,5 мкМ НУК. На этой среде регенерирует наибольшее число корней – 11,7 шт./экспл.

ЛИТЕРАТУРА

- Вечернина Н.А., Таварткиладзе О.К., Клементьева Л.А., Долганова З.В.** Особенности регенерации и размножения растений рода *Iris* (Iridaceae) *in vitro* // Раст. ресурсы, 2004. – Т. 40, вып. 4. – С. 56–64.
- Дерфлинг К.** Гормоны растений. Системный подход: Пер. с англ. – М.: Мир, 1985. – 304 с.
- Жизнь растений: В 6-ти т. / Гл. ред. А.Л. Тахтаджян. Т. 6. Цветковые растения. – М.: Просвещение, 1982. – 543 с.
- Калиженкова М.Д., Аш. О.А., Лоскутова Н.** Хоста: размножение *in vitro* // Цветоводство, 2002. – Вып. 6. – С. 10.
- Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е.** Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – Киев.: Наук. думка, 1980. – 488 с.
- Сивакумар Г., Кришнамурти К.В.** Органогенез *Gloriosa superba* в культуре *in vitro* // Физиология растений, 2004. – Т. 51, № 5. – С. 790–798.
- Хадеева Н.В., Дегтяренко Л.В., Гордон Н.Ю., Яковлева Е.Ю.** Введение в культуру *in vitro* стахиса (*Stachys sieboldii* Miq.) // Физиология растений, 1995. – Т. 42, № 6. – С. 923–928.

SUMMARY

It was demonstrated that induction of high-morphogenetic callus is dependent on type of explants. Morphogenetic callus was induced by MS medium with 5×10^{-6} – 10^{-5} M BA and 2×10^{-5} M ATPA from leaf and petal explants. Micropropagation of hosta plants by *in vitro* buds culture in MS medium with cytokinin (BA) in investigated. In rooting stage best results were induced by 5×10^{-7} M *n*-naphthyl-acetyc acid.

УДК [581.15 + 543.545] : 582.542

Д.Е. Герус

D. Gerus

РЕГИСТРАЦИЯ РЕКОМБИНАЦИОННЫХ И ИНТРОГРЕССИВНЫХ ПРОЦЕССОВ
МЕЖДУ *ELYMUS CANINUS* И *E. MUTABILIS* (TRITICEAE: POACEAE)

REGISTRATION OF RECOMBINANT AND INTROGRASSIVE PROCESSES BETWEEN *ELYMUS CANINUS* AND *E. MUTABILIS* (TRITICEAE: POACEAE)

Типичные особи видов *Elymus caninus* и *E. mutabilis* имеют достаточно четкие морфологические различия. Однако в природных популяциях встречаются морфологически промежуточные и отклоняющиеся формы этих видов. Нами были изучены искусственные половые гибриды между типичными и отклоняющимися формами в двух комбинациях скрещивания и их потомки в следующих поколениях методами морфологического и электрофоретического анализов. Полученные данные показали, что пара *E. caninus* – *E. mutabilis* представляет собой единый рекомбинационный генпул, внутри которого между особями возможны интрогрессивные процессы или ограниченная рекомбинация на α 2-уровне.

Согласно морфологическим описаниям в Сибири типичные особи видов *Elymus caninus* и *E. mutabilis* имеют достаточно четкие различия по величине колосковых чешуй (КЧ), длине остей и опушенности нижних цветковых чешуй (НЦЧ) (Пешкова, 1990). Тем не менее, среди природных особей встречаются промежуточные и переходные формы по некоторым диагностическим признакам. Так, у обоих видов значительно варьирует признак относительной длины КЧ, у ряда биотипов *E. caninus* обнаруживаются шиповатые или волосистые НЦЧ, а также короткоостые формы, а у некоторых биотипов *E. mutabilis* отмечены абсолютно гладкие НЦЧ и удлиненные ости.

Ранее было показано, что в Скандинавии короткоостая разновидность *E. caninus* var. *muticus*, вероятнее всего, имеет гибридное происхождение от *E. caninus* и *E. mutabilis*. Сибирские морфологически отклоняющиеся формы *E. caninus*, некоторые из которых также могут быть причислены к разновидности *muticus*, происходят от *E. caninus*, *E. mutabilis* и, возможно, *E. transbaicalensis* (Герус, Агафонов, 2006).

Целью данной работы было изучение возможных взаимоотношений между двумя видами в эксперименте. Изучали несколько гибридных комбинаций с участием типичных и морфологически отклоняющихся форм (МОФ) *E. caninus* и *E. mutabilis*.

Был создан гибрид между горно-алтайскими биотипами *E. caninus* GAT-9210 и *E. mutabilis* АСН-8932. Единственное гибридное растение F_1 обладало промежуточным фенотипом по сравнению с родительскими формами и пониженной, но достаточно стабильной (по данным с разных колосьев) семенной фертильностью (СФ) – до 6,6 %. Анализ полевой выборки F_2 (22 растения) обнаружил вариабельность по следующим морфологическим признакам в разном их сочетании: наклон колосьев (от прямых до слабо наклоняющихся), относительная длина колосковых чешуй ($k=L_{КЧ}/L_{НЦЧ}$ варьировал у разных растений от 0,5 до 0,8), шиповатость НЦЧ, (гладкие или выражено шиповатые), длина остей НЦЧ (от 3 до 20 мм). Установленные значения семенной фертильности в этой выборке растений распределялись в пределах от 3 зерновок на колос до 72,0 %, что соответствует α 2-уровню совместимости родительских генотипов (Агафонов, 2003).

Для более полного понимания процессов рекомбинации в поколениях нами использован высококоразрешающий и малозатратный метод SDS-электрофореза запасных белков эндосперма индивидуальных зерновок. Анализ электрофоретических спектров в выборке семян F_2 показал расщепление по полипептидным компонентам, при этом в каждой зерновке могли быть идентифицированы только родительские компоненты в разных сочетаниях – от полного совпадения с одним из родителей до гетерозиготных генотипов, содержащих компоненты обоих родителей. Сделан вывод, что в данной гибридной комбинации действительно возможна рекомбинация генетического материала на α 2-уровне.

Был создан гибрид между двумя алтайскими МОФ *E. caninus* GAC-8921 и *E. mutabilis* АСН-8905. Растения образца *E. mutabilis* АСН-8905 имели абсолютно голые и гладкие НЦЧ, в то время как типичные особи этого вида обладают шероховатыми или коротковолосистыми НЦЧ. Образец *E. caninus* GAC-8921, наоборот, имел густошиповатые НЦЧ.

Растение F_1 – (1), выращенное в открытом грунте, было более мощным и хорошо развитым, растение F_1 – (2), выращенное в условиях климокамеры, показало абсолютную стерильность. С растения F_1 – (1)

было собрано 16 зерновок с 22 колосьев, величина СФ не превышала три зерновки на колос. Такое низкое значение СФ свидетельствует о том, что данные родительские формы достаточно отдалены филогенетически, но при этом еще сохранили некоторую гомологичность геномов, которая обеспечивает образование небольшого числа выполненных и всхожих зерновок.

В условиях открытого и защищенного грунта были высеяны все полученные зерновки от растения F_1 . Значения СФ у разных растений F_2 составляли от 5,0 % (до 3 зерновок на колос) до 34,3 % у самой вегетативно мощной особи. Это означает, что половая совместимость родительских биотипов также соответствует $\alpha 2$ -уровню. Анализ выборки F_3 (18 растений), полученной от растения F_2 – (1), показал наличие рекомбинантных особей по основным диагностическим признакам. Семенная фертильность 7 растений составляла 12,0–58,6 %, но 2 растения были абсолютно стерильными с закрытыми пыльниками. Анализ выборки F_4 (всего 30 растений) с трех растений F_3 , показал, что наряду с особями, имеющими признаки родительских форм, присутствовали рекомбинантные особи, которые могли быть охарактеризованы как типичные формы *E. caninus* и *E. mutabilis*. Таким образом, в гибридной комбинации от двух МОФ к поколению F_4 выщепилось несколько растений, полностью соответствующих современным диагнозам *E. caninus* и *E. mutabilis*.

В сравнительное электрофоретическое изучение были взяты зерновки поколения F_3 и F_4 . У всех взятых в этот анализ выборок отмечалась рекомбинация белковых компонентов, но при этом у большинства зерновок всех выборок было обнаружено два компонента, которые не принадлежали ни одной из родительских форм. Поскольку во всех выборках семян поколения F_3 , берущих начало от пяти растений F_2 , были обнаружены одни и те же дополнительные полипептиды, в частности 43 ед. ОЭП, то, вероятнее всего, в поколении F_1 произошло опыление отдельных цветков неидентифицированным спонтанным опылителем (НСО-1).

Анализ зерновок поколения F_5 показал, что у растений этих выборок присутствовали компоненты обеих родительских форм и НСО-1, а также еще два дополнительных компонента. У других изученных выборок этих компонентов обнаружено не было. Вероятнее всего, в поколении F_3 произошло опыление отдельных цветков вторым спонтанным опылителем. Это предположение косвенно подтверждается наличием закрытых пыльников у двух растений поколения F_4 .

Суммарные данные морфологического и электрофоретического анализа, а также значений СФ показали, что данная гибридная комбинация между двумя МОФ развивалась в поколениях по смешанному типу. У части электрофоретически изученных зерновок были отмечены компоненты посторонних доноров, т. е. неидентифицированных спонтанных опылителей (НСО). Эти линии поколений развивались и стабилизировались по интрогрессивному типу. Вместе с тем, во всех поколениях электрофоретически выявлялись зерновки, содержащие только компоненты родительских биотипов. Это означает, что в данной гибридной комбинации возможна прямая рекомбинация генетического материала с последующей стабилизацией жизнеспособности и семенной фертильности.

Таким образом, можно сделать вывод, что пара *E. caninus* – *E. mutabilis* представляет собой единый рекомбинационный генпул, внутри которого между особями возможна рекомбинация генетическим материалом на $\alpha 2$ -уровне.

ЛИТЕРАТУРА

Агафонов А.В. Модель генпулов SH-геномных видов рода *Elymus* L. (Triticeae: Poaceae) Северной Евразии // Мат-лы XI съезда РБО (18–22 августа 2003 г., Новосибирск–Барнаул). – Барнаул: Изд-во АзБука, 2003. – Т. 1. – С. 231–233.

Герус Д.Е., Агафонов А.В. Биосистематический анализ происхождения некоторых таксонов и морфологически отклоняющихся форм, близких к *Elymus caninus* и *E. mutabilis* // Сиб. бот. вестн.: электронный журнал, 2006. – Т. 1, вып. 1. – С. 65–74; <http://journal.csbg.ru>

Пешкова Г.А. *Elymus* L. – Пырейник // Флора Сибири. – Новосибирск: Наука, 1990. – Т. 2.

SUMMARY

Typical individuals of *Elymus caninus* and *E. mutabilis* have morphological differences clear enough across species. However some morphologically intermediate and deviating forms have been collected in natural populations. Interspecific hybrids between typical and deviating forms in two cross combinations and their progeny in next generations were studied by morphological and electrophoretic methods. Obtained data have shown that introgressive processes or limited recombination at the 2-level between two species can be occurred.

УДК 633.88.582.998:+ 581.19(571.16)

Н. Мунхжаргал
Л.Н. Зибарева
А.И. Пяк
Д. Оюунчимэг

N. Munkhjargal
L. Zibareva
A. Pyak
D. Ouynchimeg

**ХЕМОТАКСОНОМИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ПОИСКУ ЭКДИСТЕРОИДОВ
В СЕМЕЙСТВЕ CARYOPHYLLACEAE ФЛОРЫ СИБИРИ И МОНГОЛИИ**

**CHEMOTAXONOMICAL METHOD FOR ECDYSTEROIDS SEARCH IN CARYOPHYLLACEAE
OF SIBERIA AND MONGOLIA FLORAS**

Методом химического скрининга из 21 вида семейства Caryophyllaceae флоры Сибири и Монголии **выявлено наличие экдистероидов в наземной части** 9 видов, из них в 3 видах флоры Монголии впервые: *Silene aprica*, *S. ichebogda*, *S. mongolica*.

Рядом авторов обсуждалось хемотаксономическое и экологическое значение экдистероидов на примере семейств Chenopodiaceae, Solanaceae, Ranunculaceae, Alliaceae (Dinan et. al., 1998; Savchenko et. al., 1997, 1998, 2000).

Ранее было показано, что экдистероиды можно использовать в качестве хемотаксономического критерия для видов *Silene* семейства Caryophyllaceae (Зибарева и др., 2003). В настоящее время экдистероиды обнаружены более чем в 140 видах этого семейства, в том числе в 120 видах рода *Silene* и 8 видах *Lychnis*. Ранее нами

Таблица

Результаты скрининга видов Caryophyllaceae флоры Монголии и Алтая
на содержание экдистероидов

№ п/п	В и д ы	Содержание 20Е %, от массы абс. сух. сырья			Литература
		1	2	3	
1	<i>Arenaria capillaries</i> Poir.	-			
2	<i>Cerastium pussillum</i> Ser.	-			
3	<i>Dianthus superbus</i> L.	-		-	Ревина и др., 1988
4	<i>Dianthus versicolor</i> Fisch.	-		-	Ревина и др., 1988
5	<i>Elisanthe viscosa</i> (L.) Rupr.		-	-	Ревина и др., 1988
6	<i>Gastrolychnis apetala</i> (L) Fenzl.	0.2		0,2	Ревина и др., 1988
7	<i>Gypsophila desertorum</i> (Bunge) Fenzl.	-			
8	<i>Melandrium brachypetala</i> (Hormen) Tolm. et Kozhanczikov	-		0.2	Ревина и др., 1988
9	<i>Pseudostellaria rupestris</i> (Turcz.) Pax.	-			
10	<i>Silene aprica</i> Turcz.*	0.1			
11	<i>Silene chamarensis</i> Turcz.	0.1		0.4 0.3	Ревина и др., 1988 Зибарева, 2003
12	<i>Silene graminifolia</i> Otth.	0.1	0.6	0.6	Ревина и др., 1988
13	<i>Silene ichebogda</i> Glub*.	0.1			
14	<i>Silene jenissensis</i> Willd.	2.2	0,3	1.3	Ревина и др., 1988
15	<i>Silene mongolica</i> Maxim*.	0.2			
16	<i>Silene repens</i> Patr.	1.1	0.3	0.5 0.4	Ревина и др., 1988 Саатов, 1993
17	<i>Silene viscosa</i> (L.) Pers		0,3	+	Volodin et.al., 2002
18	<i>Stellaria amblyosepala</i> Schrenk.	-			
19	<i>Stellaria crassifolia</i> Ehrh.	-		-	Volodin et.al., 2002
20	<i>Stellaria dichotoma</i> L.	-			
21	<i>Stellaria umbellata</i> Turcz.	-		-	Ревина и др., 1988

Примечания: 1 – во флоре Монголии, 2 – во флоре Сибири, 3 – литературные данные; * – новые источники фитоэкдистероидов, “-” – отсутствие экдистероидов.

исследовано более 152 видов этого рода, из которых экистероиды впервые выявлены в 75 видах, а индивидуальные экистероиды выделены из 12 видов (Зибарева и др., 1995; Zibareva et al., 2004).

Систематика рода *Silene* довольно сложна, и современная классификация основана преимущественно на морфологических признаках растений. Некоторые секции рода *Silene* включают только экистероидсодержащие виды растений (например, *Siphonomorpha*, *Chloranthae*, *Coronatae*, *Graminiformes*, *Otites*, *Silene*, *Dipterosperma*, *Lasiocalycinae*, *Holopetalae*), тогда как другие только экистероид-отрицательные (*Behen*, *Atocion*, *Psammophilae*, *Odontopetalae*, и др.). В этих секциях со значительной степенью вероятности можно прогнозировать присутствие/отсутствие экистероидов в еще не исследованных видах. Другие секции содержат как экистероид-положительные, так и отрицательные виды. Примечательно, что наборы характерных экистероидов для секций *Siphonomorpha*, *Silene* и *Otites* различны. Наличие экистероидов можно использовать в качестве дополнительного систематического признака и необходимого критерия отбора объектов при поиске их продуцентов среди родственных видов.

Поскольку флора Монголии не изучалась на присутствие фитоэкистероидов, представляет интерес провести скрининг видов семейства *Caryophyllaceae*, а хемотаксономический подход будет способствовать выяснению целого ряда спорных вопросов о филогенетическом статусе некоторых видов и упорядочит целенаправленный поиск (Высочина, 1998) видов, синтезирующих экистероиды.

Целью нашего исследования является поиск доступных и перспективных продуцентов фитоэкистероидов в видах семейств *Caryophyllaceae* флоры Сибири и Монголии. На территории Монголии произрастает 83 вида (Грубов, 1982) этого семейства. Впервые проведено обследование флоры Монголии на присутствие экистероидов. Объектами изучения были 21 вид *Caryophyllaceae* флоры Монголии и Сибири.

Качественный и количественный анализ экистероидов проводили хроматоспектрофотометрическим методом (Якубова и др., 1978). Экистероиды обнаружены в 9 видах, включая 3 новые экистероидсодержащие источника – *Silene aprica*, *S. ichebogda*, *S. mongolica* флоры Монголии (табл.). Сравнительный анализ содержания 20Е показал, что на его уровень и состав экистероидов влияет место произрастания, что подтверждает ранее полученные данные (Саатов, 1993). В видах *S. repens*, *S. jenissensis*, произрастающих на территории Монголии, содержание 20Е выше, чем в одноименных алтайских образцах. В других видах – *S. graminifolia*, *S. chamarensis* наблюдается обратное соотношение, тогда как в *Gastrolachnis apetala* содержание 20Е находится на одном уровне. В одном из видов *Melandrium brachypetala* нам не удалось подтвердить наличие экистероидов.

ЛИТЕРАТУРА

- Высочина Г.И.** Хемотаксономия: системный подход к ресурсоведческому и интродукционному поиску // Мат. Междунар. совещ. «Физиолого-биохимические аспекты изучения лекарственных растений», посвящ. памяти В.Г. Минаевой. – Новосибирск, 1998. – С. 86–87.
- Грубов В.И.** Определитель сосудистых растений Монголии. – Л.: Наука, 1982. – С. 441.
- Зибарева Л.Н.** Фитоэкистероиды растений семейства *Caryophyllaceae*: Автореф. дисс. ... д-ра хим. наук. – Новосибирск, 2003. – 31 с.
- Зибарева Л.Н., Балтаев У.А., Свиридова Т.П., Саатов З., Абубакиров Н.К.** Виды рода *Lychnis* L. – перспективные источники экистероидов // Раст. ресурсы, 1995. – Т. 31, вып. 4. – С. 1–9.
- Зибарева Л.Н., Еремينا В.И., Иванова Н.А., Лазьков Г.А.** Распределение фитоэкистероидов в трибе *Sileneae* Dumort. (*Caryophyllaceae* Juss.) // Раст. ресурсы, 2003. – Т. 39, вып. 3. – С. 45–53.
- Ревина Т.А., Ревушкин А.С., Ракитин А.В.** Экистероидсодержащие виды во флоре Горного Алтая // Раст. ресурсы, 1988. – Вып. 4. – С. 565–569.
- Саатов З.** Экистероиды растений сем. *Caryophyllaceae*, *Labiatae*, *Compositae*: Автореф. дисс. ... д-ра хим. наук. – Ташкент, 1993. – 36 с.
- Якубова М.Р., Генкина Г.Л., Шакиров Т.Т., Абубакиров Н.К.** Хроматоспектрофотометрический метод определения экистерона в растительном сырье // Химия природ. соедин., 1978. – № 5. – С. 737–740.
- Dinan L., Whiting P., Scott A.J.** Taxonomic distribution of phytoecdysteroids in seeds of members of the *Chenopodiaceae* // *Biochemical systematics and ecology*, 1998. – V. 26. – P. 553–576.
- Savchenko T., Whiting P., Germade A., Dinan L.** Ecdysteroid agonist and antagonist activities in species of the *Solanaceae* // *Biochemical Systematics and Ecology*, 2000. – V. 28. – P. 403–419.
- Savchenko T., Whiting P., Sarker S.D., Dinan L.** Phytoecdysteroids in the Genus *Agapanthus* (*Alliaceae*) // *Biochemical Systematics and Ecology*, 1997. – V. 25. – № 7. – P. 623–629.

Savchenko T., Whiting P., Sarker S.D., Dinan L. Analysis of species of the Ranunculaceae for ecdysteroid agonists and antagonists - II. Ecdysteroids in the genus *Anemone* // Biochemical Systematics and Ecology, 1998. – V. 26. – P. 131–134.

Volodin V., Chadin I., Whiting P., Dinan L. Screening plants of European North-East Russia for ecdysteroids // Biochemical Systematics and Ecology, 2002. – V. 30. – P. 525–578.

Zibareva L., Volodin V., Saatov Z., Savchenko T., Whiting P., Lafont R., Dinan L. Distribution of phytoecdysteroids in the Caryophyllaceae // Phytochemistry, 2004. – V. 64, №. 2 – P. 499–517.

SUMMARY

Ecdysteroids presence was detected in 9 from 21 species from Mongolian and Altain floras, and in 3 of them from Mongolian flora: *Silene aprica*, *S. ichebogda*, *S. mongolica*, at the first time.

УДК: 581.143.6; 582.572

А.Ю. Набиева

A. Nabieva

**ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА СОХРАНЕНИЕ ГЕНОТИПОВ ЛИЛИЙ НЕИЗМЕННЫМИ
ПРИ ИХ КУЛЬТИВИРОВАНИИ IN VITRO**

FACTORS AFFECTING LILIES GENOTYPES STABLE THROUGH IN VITRO CULTURE

В данном сообщении обзорного характера обсуждаются морфогенетические особенности культивирования разного рода эксплантов как лилий, так и других растений в связи с проблемой возникновения соматклональной изменчивости и нестабильности генотипов у регенерантов. Определена схема развития эксплантов тканей и органов цветка лилий путем прямого органогенеза.

При использовании биотехнологических методов для сохранения биологического разнообразия крайне важна разработка методов регенерации и микроразмножения, в которых условия получения регенерантов оптимизированы таким образом, чтобы риск получения растений с измененным генотипом был сведен к минимуму. Принято считать, что в стволовых клетках стеблевых и корневых апексов число хромосом в ядрах строго постоянно, ведь именно они являются предшественниками археспориальных и генеративных клеток, сохраняющих наследственную идентичность в ходе делений. Таким клеткам отводится особая роль в реализации плана строения растения и поддержания его стабильности в ходе онтогенетического развития (Laux, 2003). В реальности, клетки меристем наравне с клетками, содержащими диплоидное число хромосом, могут содержать клетки и других уровней пloidности (Кунах, 1995).

Основной метод, используемый в биотехнологии при размножении растений, – это активация уже существующих в растениях пазушных меристем. Так, большинство растений из порядков *Amaryllidales*, *Liliales* (амариллис, нерине, гиацинт, нарцисс, лилия и др.) размножаются в культуре тканей адвентивными луковичками, что соответствует традиционному методу их вегетативного размножения дочерними луковичками. Данный метод считается наиболее надежным с точки зрения генетической стабильности размножаемых форм (Высоцкий, 1998), т. к. большинство исследователей полагают, что ювенильные ткани, такие, как меристемы и зародышевые ткани, отличаются большей органогенной и эмбриогенной активностью *in vitro*, чем онтогенетически зрелые и специализированные ткани. Также отмечено, что максимальная генетическая стабильность присуща регенерантам, полученным именно из меристем. При использовании таких эксплантов у лилий, как осей соцветий и тканей цветоложа – органов осевой природы, еще не закончивших эмбриональное развитие и не утративших своих морфогенетических способностей, как правило, микролуковички появляются в каллусной ткани. Поэтому такого рода экспланты наравне с незрелыми зародышами, завязями и молодыми проростками, как указывает Pelconen (1999), используются в основном для получения каллусных тканей с высоким эмбриогенным потенциалом. Высказано мнение, что из-за генетической нестабильности такая система не может быть рекомендована для «микроразмножения» (Лутова, 2003), т. к. регенерация растений с использованием подобных эксплантов может сопровождаться изменчивостью, превышающей частоту спонтанных соматических мутаций на целый порядок величин (10^{-6} – 10^{-7}).

Таким образом, для сохранения видовых и сортовых особенностей лилий, так же, как и других растений, важно исключить в процессе развития регенерантов стадию каллусогенеза, с тем, чтобы избежать соматклональной вариабельности и получить растения-регенеранты идентичные исходному материалу. Как известно, каллус нарастает на поверхности экспланта тем более интенсивно, чем обширней раневая поверхность экспланта (Лутова, 2003). Следовательно, необходимо подбирать такие типы эксплантов, которые бы представляли собой индивидуальные органы, выделенные с частью побега.

Особенно важную роль для сохранения исходного генотипа неизменным при микроклонировании растений играет состояние и происхождение экспланта, а также состав питательных элементов и фитогормонов в культуральной среде. Целью работы по разработке методики наиболее стабильного размножения и сохранения генотипов лилий является определение условий инициации программы гемморизогенеза – в терминологии Т.Б. Батыгиной (2003) у регенерантов, полученных из разного рода эксплантов.

Для лилий присуще длительно сохраняющееся морфогенное состояние цветоложа, что является

основной предпосылкой появления регенерантов путем прямого органогенеза. В эмбриологическом плане, по мнению Т.Б. Батыгиной, цветоложе – это верхушка побега с укороченными метамерами, а генерирующими центрами образования меристематических тканей выступают клетки обкладок сосудистых пучков (Чурикова, Молканова 2005). Также процессы дедифференциации и цитодифференциации, как и образование проводящей системы, могут происходить, как отмечено тем же автором, в субэпидермальных тканях цветоложа или оси соцветия. Наши исследования подтвердили, что формирование регенерантов прямо из первичного экспланта (прямая регенерация), происходит путем закладки гидроцитных клубочков, обеспечивающих деятельность промеристем.

Кроме того, появление измененных вариантов находится в прямой зависимости от времени нахождения развивающегося растения на питательной среде, содержащей гормоны.

Отсюда следует, что используя для определенных типов эксплантов минимальные (триггерные) концентрации и минимальное время воздействия фитогормонов, приводящие к регенерации лилий *in vitro*, можно добиться получения регенерантов в процессе прямого органогенеза, как наиболее благоприятного пути воспроизведения генотипов в культуре лилий *in vitro* при их наибольшей стабильности.

ЛИТЕРАТУРА

Батыгина Т.Б. Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. – СПб.: Мир и Семья, 1997. – Т. 2. – С. 629–633.

Кунах В.А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. I. Изменчивость в онтогенезе // Биополимеры и клетка, 1994. – Т. 10, № 6. – С. 5–35.

Лутова Л.А. Биотехнология высших растений: Учебник для студ. высш. учеб. завед. – СПб., 2003.

Чурикова О.А. Изучение закономерностей функционирования верхушечной меристемы побега и особенностей морфогенетических процессов в культурах *in vitro* растений разных таксономических групп // Вестн. МГУ, 2005. – Сер. 16, Биология. – № 3. – С. 52–64.

Французенок В.В. Совершенствование микроклонального размножения лилий: Автореф. дисс. ... канд. с.-х. наук. – Горки, 1997. – 20 с.

Laux T. The stem cell concept in plants: a matter of debate // Cell., 1997. – V. 113. – P. 281–283.

Pelkonen V.P., Kauppi A. The effect of light and auxins on the regeneration of lily (*Lilium regale* Wil.) cells by somatic embryogenesis and organogenesis // International Journal of Plant Sciences, 1999. – 160. – P. 483–490.

SUMMARY

In this review we discuss the problems connecting with somaclonal variability in the tissue and organ culture of lilies and other plants. After evaluation the role of some factors in genotypes instability of regenerants the scheme of obtaining lily bulbs without callus stage was proposed.

УДК: 582.573.16; 635.92

Т.В. Полубаярова

T. Poluboyarova

МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ ДЕКОРАТИВНОГО ЛУКА *ALLIUM ALTISSIMUM* REGEL

MICROPROPAGATION OF ORNAMENTAL PLANT *ALLIUM ALTISSIMUM* REGEL

Изучался прямой органогенез побегов из цветоложа цветков *Allium altissimum* Regel. Было испытано 20 вариантов питательных сред на основе среды BDS. Наилучшей средой для органогенеза из цветоложа цветка была среда BDS, дополненная 2 мг/л БАП и 2 мг/л НУК (28 побегов на эксплант). Удлинение побегов происходило на среде BDS, дополненной 1 мг/л TDZ. Укоренение происходило на той же среде с 1 мг/л ИМК. Оптимальным субстратом для укоренения *ex vitro* была смесь вермикулита с торфом (1:1).

Allium altissimum Regel – высоко декоративное растение, размножение которого затруднено низкой всхожестью семян и ослабленной способностью к формированию дочерних луковиц. В последние годы для быстрого и качественного размножения геофитов успешно применяются методы культивирования *in vitro*. В качестве эксплантов обычно используют луковицы, отличающиеся высокой степенью загрязнения. Кроме того, получение регенерантов в этом случае происходит через каллус, что способствует соматической изменчивости, вызванной хромосомными абберациями. Использование соцветий в качестве эксплантов для прямого органогенеза позволяет преодолеть указанные проблемы.

Цель исследования – разработка метода клонального микроразмножения *A. altissimum* путем прямого органогенеза.

В качестве эксплантов использовали цветоложе цветков и соцветий на разных стадиях развития. Первый тип эксплантов – цветки в фазе бутонизации, второй тип – распустившиеся цветки соцветия.

Для стерилизации соцветий использовали два способа. Первый – закрытые в покрывало соцветия смачивали 96 % спиртом и обжигали в пламени спиртовки. Второй способ применяли для стерилизации распустившихся соцветий и соцветий находившихся в покрывале, их помещали на 30 секунд в 70 % раствор этилового спирта, на 7–9 мин в 0,2 % раствор гипохлорита ртути, затем промывали 3–4 раза в стерильной дистиллированной воде.

Таблица

Влияние регуляторов роста на морфогенез и регенерационную способность культивируемых *in vitro* тканей цветоложа цветков

№	Варианты питательной среды (на основе BDS)	Эксплантов шт.	Каллус шт./ %	Побеги шт./ %
1	Контроль	20	0/0	0/0
2	Кинетин 1 мг/л	20	0/0	0/0
3	Кинетин 1 мг/л + НУК 1 мг/л	10	0/0	0/0
4	Кинетин 1 мг/л + НУК 2 мг/л	10	0/0	7/70
5	Кинетин 2 мг/л	10	10/100	0/0
6	Кинетин 2 мг/л + НУК 1 мг/л	50	10/25	40/75
7	Кинетин 2 мг/л + НУК 2 мг/л	10	0/0	4/40
8	Кинетин 3 мг/л	20	0/0	10/50
9	Кинетин 3 мг/л + НУК 1 мг/л	50	10/20	40/80
10	Кинетин 3 мг/л + НУК 2 мг/л	10	0/0	0/0
11	НУК 1 мг/л	20	1/5	0/0
12	НУК 2 мг/л	20	0/0	3/15
13	БАП 1 мг/л	50	0/0	30/60
14	БАП 1 мг/л + НУК 1 мг/л	10	0/0	4/40
15	БАП 1 мг/л + НУК 2 мг/л	10	0/0	5/50
16	БАП 2 мг/л	30	0/0	10/33
17	БАП 2 мг/л + НУК 1 мг/л	10	0/0	7/70
18	БАП 2 мг/л + НУК 2 мг/л	30	0/0	27/90
19	БАП 3 мг/л	10	0/0	5/50
20	БАП 3 мг/л + НУК 1 мг/л	20	0/0	15/75

Для культивирования луков использовали питательную среду Данстена и Шорта (BDS) (Dunstan, 1978), в состав которой вводили регуляторы роста – 6-бензиламинопурин (БАП), 6-фурфуриламинопурин (кинетином, Кн), нафтилуксусную кислоту (НУК), индолилуксусную кислоту (ИУК), индолилмасляную кислоту (ИМК), тидиазурон (TDZ) в различных комбинациях. Среда дополняла 500 мг/л активированного угля.

Нами было отмечено, что при стерилизации с помощью обжига в дальнейшем для введения в культуру можно использовать только цветоложе, т. к. цветки в соцветии погибали. При втором способе стерилизации цветки сохраняют жизнеспособность.

После стерилизации экспланты помещали на питательную среду BDS с добавлением БАП (1–3 мг/л), Кн (1–3 мг/л) и НУК (1–3 мг/л). В качестве контроля служила питательная среда BDS без регуляторов роста. Всего в исследовании было испытано 20 вариантов питательных сред (табл.).

Как показали наши исследования, на контрольной среде BDS без регуляторов роста цветоложа цветков с завязями погибали уже через 5–6 недель. Наибольшее количество побегов было получено на той же среде, дополненной 2 мг/л БАП и 2 мг/л НУК. При культивировании в течение 3–4 недель на поверхности срезов наблюдали интенсивное деление клеток только у цветков, полученных из закрытых соцветий. Через 30–40 дней появились первые луковички. Удлинение побегов происходило в конце следующего пассажа на среде для дифференциации BDS, дополненной 1 мг/л TDZ. Некоторые экспланты достигали 5–7 см высоты. Затем луковички были разделены и для укоренения перенесены на среду BDS с добавлением 1 мг/л ИМК. Максимальный коэффициент размножения составил 28 побегов на один эксплант, что значительно превышает коэффициент размножения, если в качестве экспланта использовать луковицы (Полубоярова, 2006).

У соцветия с распустившимися цветками, при культивировании на тех же средах не наблюдалось ни увеличения в размерах, ни дифференцировки эксплантов. Следовательно, для регенерации побегов путем прямого органогенеза необходимо использовать соцветие в фазе бутонизации, поскольку клетки меристемы еще не потеряли свою активность.

Через 7–8 месяцев культивирования луковички, достигшие диаметра от 0,5 до 1,5 см, были высажены в условия *ex vitro* в различные виды субстратов: песок, мох, смесь песка с мхом (1:1), смесь вермикулита с торфом (1:1). Нами было отмечено, что луковицы выживали только в смеси вермикулита с торфом, а в других видах субстрата погибали.

ЛИТЕРАТУРА

Байтулин И.О., Рахимбаев И.Р., Каменецакая И.И. Интродукция и морфогенез дикорастущих луков Казахстана. – Алма-Ата: Наука. – 1986. – 156 с.

Полубоярова Т.В., Новикова Т.И. Микрклональное размножение дикорастущих декоративных видов луков подрода *Melanocrommyum*. Мат-лы Всерос. науч.-практ. конф. «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира». – Волгоград, 2006. – С. 47–51.

Dunstan D.I. Short KC Shoot production from onion callus tissue culture. – *Sci Hortic* 9, 1978. – 99–110 p.

SUMMARY

Direct organogenesis of shoots and bulblets from receptacle of flowers of *Allium altissium* Regel has been studied. About 20 combinations of plant growth regulators on BDS base medium has been analyzed. The best medium for direct organogenesis from receptacle was BDS supplemented with 2 mg/L BA and 2 mg/L NAA (28 shoots per explant). Formed shoots elongated on differentiation medium BDS with 1 mg/L TDZ. Rooting of individual shoots was induced after transfer on BDS medium with 1 mg/L IBA. Optimal substrate for adaptation of shoots in *ex vitro* conditions was vermiculite and peat (1:1).

УДК 581.4

В.В.Соловьева
Д.В. Балабова

V. Solovjeva
D. Balabova

РЕГЕНЕРАЦИЯ И РАЗМНОЖЕНИЕ BRACHANTHEMUM KRYLOVII IN VITRO

IN VITRO REGENERATION AND PROPAGATION OF BRACHANTHEMUM KRYLOVII

Изучены процессы регенерации и размножения растений редких и исчезающих растений вида *Brachanthemum krylovii* (Asteraceae) в культуре in vitro пазушных почек и побегов. Показано, что процессы регенерации зависят от природы и концентрации цитокинина (6-бензиламинопурина и кинетина) в составе питательной среды (МС, S МС, B₅, S B₅). На этапе укоренения лучшие результаты получены с использованием 1 мкМ индолил-3-масляной кислоты. Все растения успешно росли в условиях in vivo.

Растения *Brachanthemum krylovii* Serg. (сем. Compositae, род *Brachanthemum* DC.) приурочены к известняковым массивам Центрального Алтая (15 небольших популяций на высоте 850–1200 м над уровнем моря). Впервые под таким названием растение было описано Л.П. Сергиевской в 1953 г. Долгое время этот вид во многих флористических работах отождествляли с другим представителем рода, с *Brachanthemum baranovii* (Krasch. et Poljak.) Krasch. Так, во Флоре Сибири оба вида объединены под названием *B. baranovii*, где приведено «адаптированное» описание» (Флора Сибири, 1997).

В результате последних исследований было установлено, что редко встречающейся в природе *B. baranovii* с белыми цветами является межродовым гибридом между двумя растениями: *B. krylovii* и *Dendranthema sinuatum* (Ledeb.) Tzvel. (Смирнов, Frisen, 2006). Размножаются эти растения семенами. В условиях интродукции растения живут не более 1–2 лет, страдая от выпревания при обилии снега (Семенова, 1997).

Целью настоящего исследования было изучение особенностей культивирования и регенерации на каждом этапе размножения in vitro редкого и исчезающего растения *B. krylovii*.

Материалы и методы.

Первичным растительным материалом при введении в культуру in vitro *B. krylovii* служили свежесобранные семена. Семена погружали на 10 минут в 0,1 % раствор сулемы, затем промывали в стерильной дистиллированной воде и помещали на питательную среду по прописи Гамборга (B₅) без регуляторов роста или с добавлением 6-бензиламинопурина (БАП 0,5, 1,0 мкМ). После появления первых настоящих листьев у проростков удаляли корешки и пересаживали их на среду с 0,5 мкМ БАП.

Культивирование побегов *B. krylovii* проводили на агаризованных питательных средах с минеральной основой по прописям Гамборга (B₅) или Мурасиге и Скуга (МС) (Калинин и др., 1980), дополненных различными регуляторами роста: 6-бензиламинопурином (БАП), 6-фурфуриламинопурином или кинетином (К), индолил-3-масляной кислотой (ИМК), α-нафтилуксусной кислотой (НУК). Питательную среду стерилизовали в автоклаве при давлении 0,9±0,1 атм. Перед автоклавированием pH среды доводили до 5,8–5,9. Все операции, требующие соблюдения условий стерильности, проводили в ламинар-боксе.

Процессы регенерации и размножения изучали в контролируемых условиях: фотопериод 16/8 часов свет/темнота, температура 25±1С°. Субкультивирование проводили через 25–30 суток. Учитывали количество (шт.) и длину побегов, корней (см, мм). Адаптацию растений-регенерантов к нестерильным условиям

Таблица 1

Влияние минеральной основы питательной среды на регенерацию побегов *Brachanthemum krylovii* in vitro в присутствии 0,5 мкМ БАП

Питательная среда	Побеги с видоизмененной морфологией, %	Число побегов, шт./эксплант	Средняя длина побега, мм
МС (n=30)	19	5,8±1,0	9,6±1,1
1/2МС (n=23)	25	6,1±1,2	8,8±1,0
B ₅ (n=42)	23	8,0±0,9	8,4±0,9
1/2B ₅ (n=34)	85	6,8±0,8	4,5±0,4

выращивания осуществляли на гидропонной установке «Минивит 0,35».

Результаты и их обсуждение.

После поверхностной стерилизации все 45 семян, вводимых в культуру *in vitro*, были освобождены от инфекции, и через 15 суток большинство из них (37 шт.) проросли.

Наблюдения за развитием проростков после удаления корней и культивирования их на свежей питательной среде V_5 с 0,5 мкМ БАП, показали, что через 20 суток культивирования на этой среде побеги имели высоту 6–9 мм и по 8–12 листьев. От таких побегов отрезали семядольные листья и пересаживали их на среду того же состава. К концу пассажа количество побегов составляло 4–6 шт., их длина варьировала от 10 до 14 мм.

Поскольку при микроразмножении растений *in vitro* большое значение имеет минеральный состав питательной среды (Ишмуратова, 1998; Носырева и др., 2001), нами изучено влияние этого фактора на регенерацию побегов *B. krylovii in vitro*. В нашем эксперименте, результаты которого представлены в таблице 1, использованы основные питательные среды по прописям МС и V_5 (полный и редуцированный вдвое минеральный состав), дополненные 0,5 мкМ БАП.

Минеральный состав питательной среды оказывал влияние на регенерационную способность побегов *B. krylovii*. Пазушные и адвентивные побеги регенерировали в присутствии цитокинина на всех изученных вариантах питательных сред с частотой 100 %, но наиболее высокая интенсивность регенерации отмечена на среде V_5 (7–9 шт./эксплант). Разбавление минеральной основы питательной среды V_5 в 2 раза не оказало существенного влияния на коэффициент размножения, но приводило к значительному увеличению числа побегов с измененной морфологией (23 % на среде V_5 и 85 % на среде $S V_5$). Среди таких побегов были витрифицированные, а также имеющие очень мелкие листья. Кроме того, отметили уменьшение средней длины побегов примерно вдвое. На средах МС и $S MС$ количество вновь образовавшихся побегов было достоверно меньше, чем на среде V_5 . Существенных изменений показателей регенерации побегов после двух кратного уменьшения концентрации минеральных солей в среде МС отмечено не было. Следует отметить, что на этих средах побеги росли и развивались более интенсивно, достигали максимальных размеров, имели более интенсивный зеленый цвет. Полученные результаты позволяют сделать вывод о нецелесообразности использования сред с редуцированной вдвое минеральной основой для размножения *B. krylovii* в культуре *in vitro*.

На этапе собственно размножения было изучено действие цитокининов БАП и К (0,5–20,0 мкМ), дополненных в состав основной питательной среды по прописи МС (табл. 2).

Из представленных в таблице 2 данных следует, что химическая природа цитокинина, а также его концентрация оказали влияние на эффективность размножения *B. krylovii in vitro*. Добавление небольшого количества БАП (0,5 мкМ) было достаточным для индукции регенерации побегов у всех эксплантов (100 % частота регенерации). Другой цитокинин (К) в той же концентрации индуцировал образование меньшего количества побегов (2,5 шт./экспл. против 5,1 шт. на среде с БАП) при частоте регенерации 92 %. При разработке способов размножения *in vitro* ряда растений также отмечено, что более высокие темпы размножения были получены с использованием БАП. Эти закономерности были характерны, например, для

Таблица 2

Влияние цитокининов на регенерацию *Brachanthemum krylovii* в культуре пазушных почек

мкМ	Частота регенерации, %	Число побегов, шт./эксплант	Средняя длина побегов, мм
БАП (n=11)			
0,5	100	5,1±1,4	11,2±1,2
1,0	100	7,4±1,1	8,0±0,8
2,0	100	5,3±1,4	4,5±0,4
5,0	100	5,2±0,9	4,0±0,4
К (n=12)			
0,5	92	2,5±0,9	8,2±2,3
1,0	92	2,8±1,0	8,1±1,6
2,0	100	4,3±0,6	9,3±1,2
5,0	100	7,4±0,8	10,3±1,2
10,0	100	5,6±1,0	6,4±0,7
20,0	100	3,7±1,0	4,5±0,5

Таблица 3

Влияние ауксинов на укоренение побегов *Brachanthemum krylovii* in vitro (n=12)

мкМ	Число корней, шт./эксплант	Максимальная длина корня, см	Средняя высота побега (до/после укоренения), мм
0	2,8±0,9	4,8±1,7	8,7±0,8/18,5±2,1
ИМК 1	4,9±0,6	6,8±0,5	6,6±0,5/15,7±0,8
	5,9±1,7	6,1±0,7	7,9±0,7/17,2±1,9
	7,1±1,5	3,3±1,1	7,8±1,0/16,3±1,5
НУК 2	5,5±1,0	3,0±1,7	6,5±0,6/18,5±1,2
	5,3±0,8	2,4±0,8	7,7±0,6/18,7±1,4
	6,1±1,7	1,2±0,3	8,9±0,7/18,6±1,9

наперстянки шерстистой, клевера лугового, ежевики и малины черной (Михайлова и др., 1988; Новоселова, Солодка, 1988; Упадышев, Высоцкий, 1991). С увеличением концентрации цитокининов количество регенерирующих побегов возрастало. Однако использование относительно высоких концентраций регуляторов роста (более 1–2 мкМ БАП и более 5 мкМ К) отрицательно влияло на морфологию регенерирующих побегов, стебли которых становились короче, а листовая пластинка становилась слаборассеченной.

Таким образом, на этапе собственно размножения *B. krylovii* целесообразно использовать питательную среду с относительно невысоким содержанием БАП – 0,5–1,0 мкМ. При использовании указанных концентраций цитокинина отмечен достаточно высокий коэффициент размножения (1:5–8), 90 %, образующихся de novo побегов имели нормальную морфологию.

На этапе укоренения использовали побеги *B. krylovii*, размноженные на среде с 0,5 мкМ БАП. Их помещали на питательные среды по прописи МС, которые дополняли регуляторами роста ауксиновой природы – ИМК (0,5–10,0 мкМ) или НУК (0,5–5,0 мкМ) (табл. 3).

На среде без регуляторов роста, а также при использовании стимуляторов ризогенеза (ИМК или НУК) происходило 100 % укоренение побегов. Применение стимуляторов ризогенеза способствовало прежде всего регенерации большего количества корней. Лучшим из двух изученных ауксинов оказалась ИМК в концентрациях 1,0–2,0 мкМ: у всех побегов регенерировали корни, имеющие нормальную морфологию. Использование НУК в таких же концентрациях приводило к формированию прозрачных, коротких и плоских корней. При добавлении в состав среды ауксинов (ИМК или НУК) в концентрациях, превышающих указанные, происходила индукция не только ризогенеза, но и каллусогенеза. Каллус развивался на базальной части побегов, а регенерировавшие корни имели видоизмененную морфологию. Ризогенез был полностью ингибирован при использовании ауксинов 5 мкМ, так как на базальной части побегов развивался каллус, из которого регенерировали корни.

Полученные растения-регенеранты использовали на последнем этапе микроразмножения – адаптации к условиям выращивания in vivo. Растения-регенеранты извлекали из пробирок, отмывали корни от агара и высаживали в кассеты гидропонной установки. В течение первых 2 недель для растений создавали условия повышенной влажности – накрывали полиэтиленовой пленкой. В гидропонной культуре приживаемость растений составила 100 %. За период адаптации у растений удлинялись стебли и корни, увеличивалось количество листьев и площадь листовой пластинки. Через 20–30 суток растения достигали высоты 4–6 см и их высаживали в открытый грунт на участке Южно-Сибирского ботанического сада (в конце мая). Спустя 3–4 месяца (сентябрь) они приобретали размеры взрослых растений (15–30 см) и зацветали.

Выводы.

1. Для размножения побегов *B. krylovii* в культуре in vitro целесообразно использовать основные питательные среды МС и В₂ полного состава, которые нужно дополнять цитокинином БАП в концентрации 0,5–1,0 мкМ.
2. Для укоренения размноженных побегов in vitro следует использовать ИМК в концентрации 1–2 мкМ.
3. Все пробирочные растения (100 %) адаптируются к условиям in vivo на гидропонной установке «Минивит 0,35».

ЛИТЕРАТУРА

- Ишмуратова М.М. Клональное микроразмножение *Rhodiola rosea* L. и *R. iremelica* Boriss. in vitro // Раст. ресурсы, 1998. – Т. 34, вып. 1. – С. 12–23.
- Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. –

Киев, 1980. – 210 с.

Михайлова С.П., Левандовский Г.С., Дружинина Э.В., Попов Ю.Г. Изучение действия регуляторов роста цитокининовой и ауксиновой природы на морфогенез изолированных верхушек наперстянки шерстистой // Междунар. конф. «Биология культивируемых клеток и биотехнология»: Тез. докл. – Новосибирск, 1988. – С. 137–138.

Новоселова Е.Ю., Солодкая Л.А. Микроклональное размножение клевера лугового с повышенной устойчивостью к раку // Междунар. конф. «Биология культивируемых клеток и биотехнология»: Тез. докл. – Новосибирск, 1988. – С. 337–338.

Носырева М.В., Вечернина Н.А., Таварткиладзе О.К. Изучение регенерационной способности изолированных почек *Adonis vernalis* L. в культуре in vitro // Известия АГУ, 2002. – № 3. – С. 98–100.

Семенова Г.П. Интродукция и охрана редких и исчезающих видов флоры Сибири // Сибирский экологический журнал, 1997. – Т. 4, № 1. – С. 19–29.

Смирнов С.В., Frisen N. Использование молекулярно-генетического анализа для выявления гибридов на примере *Brachanthemum baranovii* (Krasch. et Poljak.) Krasch. // Мат-лы V Междунар. научно- практ. конф.: «Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии» – Барнаул, 2006. – С. 256–258.

Упадышев М.Т., Высоцкий В.А. Размножение ежевики и малины черной методом культуры тканей // Садоводство и виноградарство, 1991. – № 6. – С. 24–27.

Флора Сибири. – Новосибирск: Наука, 1997. – Т. 13: Asteraceae (Compositae). – 472 с.

SUMMARY

In this work plants regeneration and propagation of the rear and disappear plants *Brachanthemum krylovii* (Asteraceae) by in vitro cultured of lateral buds and shoots are investigated. It was demonstrated that regeneration processes was depended from chemical structure and concentration of cytokinin (6-benzylaminopurin and kinetin) into nutrient medium (MC, S MC, B5, S B5). In rooting stage best results was induced by 10⁻⁶ M indolyl-3-butyric acid. There was successfully growth for all plantlets in vivo.