

СОХРАНЕНИЕ КОЛЛЕКЦИОННЫХ ФОНДОВ РАСТЕНИЙ СИБИРСКОГО БОТАНИЧЕСКОГО САДА В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*¹

Г.Я. Степанюк, Л.В. Хоцкова

Представлены результаты многолетних исследований по ускоренному размножению и созданию банка асептических культур растений Сибирского ботанического сада Томского госуниверситета. Выявлены оптимальные условия стерилизации и культивирования представителей 15 семейств. Изучены этапы развития регенерантов на питательных средах и сроки их готовности к высадке в промежуточный субстрат. Оработаны методики семенного размножения in vitro шести видов тропических и субтропических орхидных.

PRESERVATION OF COLLECTION FUNDS OF PLANTS OF THE SIBERIAN BOTANICAL GARDEN IN CULTURE *IN VITRO*

G.J. Stepanjuk, L.V. Khotskova

In article results of long-term researches on the accelerated reproduction and bank creation aseptic cultures of plants of the Siberian botanical garden of the Tomsk state university are presented. Optimum conditions of sterilization and culturing of representatives of 15 families are revealed. Development stages of the recycled plants on nutrient mediums and terms of their readiness for disembarkation in an intermediate substratum are studied. Techniques of seed reproduction in vitro of six species of tropical and subtropical orchids are fulfilled.

В настоящее время ботанические сады ведут большую работу в области сохранения биоразнообразия растительного мира. В ботанико-интродукционных центрах выращиваются более 80 000 видов растений, что составляет 1/3 всех описанных в настоящее время видов [3]. Сохранение биоразнообразия растений в ботанических садах осуществляется с применением современных методов интродукции, к которым относится и клональное микроразмножение. Исследования в области культуры ткани имеют свои особенности, связанные с методическими вопросами клонального микроразмножения: подбор питательных сред для каждого таксона растений, подбор температурных и световых условий на всех стадиях клонального микроразмножения, выявление частоты соматоклональных вариаций и их влияния на изменчивость образцов [2, 4].

С целью создания банка асептических культур и ускоренного воспроизводства редких и ценных растений в Сибирском ботаническом саду Томского госуниверситета (СибБС ТГУ) ведутся работы по клональному микроразмножению представителей семейств *Actinidiaceae* Hutch., *Araceae* Juss., *Asteraceae* Dum., *Cornaceae* Dum., *Euphorbiaceae* Juss., *Ericaceae* Juss., *Gesneriaceae* Dum., *Moraceae* Link.,

¹ Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ «Мобильность молодых ученых» (09-04-90823-моб_ст).

Myrtaceae R. Br., *Orchidaceae* Juss., *Piperaceae* C.A. Agarch., *Ranunculaceae* Juss., *Rosaceae* Juss., *Sterculiaceae* Vent., *Theophrastaceae* L.

Работы по микроклональному размножению исследуемых объектов проводились по общепринятым методикам [1] с применением разных питательных сред и добавлением различных сочетаний фитогормонов. Эксплантатами служили терминальные и латеральные почки молодых неодревесневших побегов, а также сегменты молодых листьев с центральной жилкой.

Стерилизацию растительной ткани проводили с применением нескольких реагентов. Растительный материал был промыт в проточной воде с мылом, затем выдержан в 0,5% растворе фундазола в течение 20 мин и вновь промыт в проточной воде. В условиях ламинар-бокса была проведена многоступенчатая стерилизация несколькими стерилизующими агентами: 70% этанолом в течение 30 с, раствором коммерческого отбеливателя «Белизна» при разведении 1:1, 1:2 или 1:3 в течение от 3 до 10 мин, 3% раствором дезинфицирующего средства «Лизоформин» с выдержкой 3–6 мин. После каждого стерилизующего агента было проведено 3–4-кратное промывание материала в стерильной дистиллированной воде по 5 мин. Эксплантаты размещали в индивидуальных культуральных сосудах на агаризованной питательной среде Мурасиге – Скуга (MS) или среде Андерсона с добавлением фитогормонов в различных сочетаниях. Культивирование проводилось в стерильных условиях при температуре воздуха 23–25 °C, относительной влажности воздуха 60%, при интенсивности освещения 3000 лк и 16-часовом фотопериоде. Субкультивирования проводили через 60 дней.

Для стадии инициации культур фикусов (*Ficus carica* L., *F. benghalensis* L., *F. benjamina* L., *F. lirata* Warb.), *Theobroma cacao* L., *Myrtus communis* L., *Peperomia magnoliaefolia* 'Variegata', *Monstera obliqua* (Miq.) Walp., *Codiaeum variegatum* Blume, *Aucuba japonica* Thunb., *Actinidia deliciosa* (A.Chev) Liang. использовали среду MS с добавлением 0,5–4 мг/л БАП (6-бензиламинопурина), а для рододендронов (*Rhododendron indicum* (L.) Sweet, *Rh. ledebourii* Pojark., *Rh. japonicum* (A. Gray) Suring) – среду Андерсона, дополненную 1 мг/л ИУК (β-индолилуксусная кислота) и 5 мг/л 2iP (6-γ, γ-ди-метилаллиламинопурина). У данных видов через 40–50 дней от начала культивирования начинался прямой органогенез.

На стадии пролиферации для вышеуказанных культур использовали ½ среду MS, дополненную 1–4 мг/л БАП и 0,25–1 мг/л НУК (α-нафтилуксусная кислота) или 2,4-D (дихлорфеноксиуксусная кислота), для рододендронов – среду Андерсона с 4 мг/л ИУК и 15 мг/л 2iP. На стадии размножения учитывали коэффициент размножения, число междоузлий и высоту микропобегов. В ходе эксперимента было выяснено, что эксплантаты *Codiaeum variegatum* и *Aucuba japonica* лучше развиваются на среде ½ MS с содержанием БАП (0,5–1,0 мг/л) и 2,4-D (0,25–0,5 мг/л) по сравнению со средами, содержащими аналогичные сочетания БАП и НУК. У эксплантатов мирта, пеперомии, инжира, монстеры косой, наоборот, более активный рост адвентивных побегов наблюдался на среде ½ MS с содержанием 1 мг/л БАП и 0,5 мг/л НУК. Со второго пассажа у всех изучаемых генотипов было отмечено увеличение коэффициента размножения. Наиболее высокий коэффициент размножения продемонстрировали *Myrtus communis* (15,7±4,3), *Ficus carica* (12,2±2,5) и *Actinidia deliciosa* (10,6±3,2).

Через 5–6 месяцев первые регенерированные экземпляры исследуемых видов были укоренены на ½ среде MS с добавлением 1 мг/л ИМК (β-индолилмасляная кислота) и 500 мг/л активированного угля. Через 360 дней окрепшие растеньица были пересажены из стерильных условий в смесь торфа и песка (1:1), продезинфицированную над паром. Адаптационный период проходил в условиях теплицы при повышенной относительной влажности 85% и температуре воздуха 25 °C. Приживаемость растений в этих условиях составила более 80%.

Среди цветковых однодольных растений особой оригинальностью и видовым разнообразием выделяются представители семейства *Orchidaceae* Juss. Обладая большим

адаптационным потенциалом, орхидеи способны существовать в различных экологических нишах тропических и субтропических областей. Однако из-за необычной формы растений, красоты и разнообразия соцветий многие из них находятся на грани исчезновения. Поэтому, наряду с изучением биологии орхидных и разработкой мер их охраны, весьма актуальной является проблема выращивания их в культуре. С целью сохранения биоразнообразия тропических и субтропических представителей орхидных в СибБС ТГУ ведутся работы по семенному размножению орхидей *in vitro*.

В результате искусственного перекрестного опыления цветков дендробиума фаленопсисовидного (*Dendrobium phalaenopsis* Fitzg.), ванды трехцветной (*Vanda tricolor* Ldl.), фаленопсиса приятного (*Phalaenopsis amabilis* Bl.), цимбидиума гибридного (*Cymbidium hybridum*), фаленопсиса конского (*Phalaenopsis equestris* Ldl.) и эпидендрума укореняющегося (*Epidendrum radicans* Pav.) получены плоды-коробочки. Плоды вскрывали в стерильных условиях и семена высевали на безгормональные агаризованные питательные среды Кнудсона и MS. Сроки созревания плодов и прорастания семян орхидей представлены в таблице, из которой следует, что цимбидиум гибридный и ванда трехцветная характеризуются самым продолжительным периодом созреванием плодов и прорастания семян.

В результате исследований установлено, что оптимальной средой для прорастания семян ванды трехцветной, эпидендрума укореняющегося, цимбидиума гибридного явилась безгормональная среда MS, а для дендробиума фаленопсисовидного, фаленопсиса приятного и фаленопсиса конского – среда Кнудсона. Нами были изучены этапы развития сеянцев орхидей на разных питательных средах. Было установлено, что сеянцы вышеперечисленных видов готовы к высадке в промежуточный субстрат через 320–340 дней после посева.

Продолжительность созревания плодов и прорастания семян исследуемых видов орхидей в оранжереях Сибирского ботанического сада ТГУ

Вид	Период созревания плодов, дни	Период прорастания семян, дни
<i>Cymbidium hybridum</i>	253–320	30–98
<i>Dendrobium phalaenopsis</i>	165	20–30
<i>Epidendrum radicans</i>	92	10–15
<i>Phalaenopsis amabilis</i>	185	20–45
<i>Phalaenopsis equestris</i>	149	25–30
<i>Vanda tricolor</i>	210	30–40

Таким образом, выявлены оптимальные условия стерилизации и культивирования представителей 15 семейств из коллекционных фондов Сибирского ботанического сада ТГУ, что позволило приступить к работам по созданию банка асептических культур *in vitro*. Изучены этапы развития регенерантов на питательных средах и сроки их готовности к высадке в промежуточный субстрат. Отработаны методики семенного размножения *in vitro* шести видов тропических и субтропических орхидей.

Литература

1. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М., 1999.
2. Вечернина Н.А. Методы биотехнологии в селекции, размножении и сохранении генофонда растений. Барнаул, 2004.
3. Джексон П.В. Анализ коллекционной и научно-технической базы ботанических садов // Информ. бюл. Совета ботанических садов России и Отделения Междунар. совета ботан. садов по охране растений. 2001. Вып. 12. С. 59–66.
4. Молканова О.И., Стахеева Т.С., Васильева О.Г. и др. Использование биотехнологических методов для размножения и сохранения редких и ценных видов растений // Ботанические сады как центры сохранения и рационального использования растительных ресурсов. М., 2005. С. 354–356.