

Глава 5.
**ТЕХНОЛОГИЯ ВОЗДЕЛЫВАНИЯ
И МЕТОДЫ РАЗМНОЖЕНИЯ**

УДК 582.672:57.085.2

doi: 10.31360/2225-3068-2021-79-75-82

**НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ РАЗМНОЖЕНИЯ
И СОХРАНЕНИЯ РЕДКОГО ВИДА *GLADIOLUS PALUSTRIS*
GAUDIN В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO***

Молканова О.И., Горбунов Ю.К., Ширнина И.В., Коновалова Т.Ю.

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина
Российской академии наук
г.Москва, Россия, e-mail: molkanova@mail.ru*

В лаборатории биотехнологии растений Главного ботанического сада им. Н.В. Цицина РАН создана коллекция редких видов растений, сохраняющихся в условиях *in vitro*. *Gladiolus palustris* Gaudin – редкий вид с ограниченной средой обитания, занесён в Красную книгу Российской Федерации как находящийся под угрозой исчезновения. При стерилизации семян оптимальный результат был достигнут при использовании гипохлорита кальция в концентрации 7%-ной (5–7 мин). Оптимальной на этапе собственно микро-размножения оказалась среда MS, дополненная 10 мг/л 6-БАП и 0,1 м/л НУК, на этапе ризогенеза – ½ MS, дополненная 1,5 мг/л ИМК и содержащей 20 г/л сахарозы. Оптимальными условиями депонирования *Gl. palustris* являются питательная среда ½ MS, 5 мг/л 6-БАП, 0,05 мг/л НУК и 40 г/л сахарозы, пониженная температура (3–7 °С) и слабая освещённость (500 лк). Разработанная технология является основой для получения материала для реинтродукции редких видов и пополнения коллекций ботанических садов.

Ключевые слова: редкие виды, *Gladiolus palustris* Gaudin, клональное микро-размножение, регуляторы роста, длительное сохранение *in vitro*.

Сохранение биоразнообразия растений является одной из актуальнейших задач ботанических садов. В России в настоящее время 110 ботанических садов и дендрариев. В 2020 г. в ботанических садах культивировалось 377 видов высших растений из 514 представленных в Красной книге РФ, что составляет 73 %.

Предпочтительным является сохранение редких видов в естественных условиях, однако это не всегда возможно. Так, например, лишь около половины видов Красной книги РФ не охраняется в природе (заповедниках, заказниках), генофонд другой половины видов федеральной

охраны далеко не всегда обеспечен мерами сохранения *in situ* [3, 5]. В последние десятилетия в охране редких и исчезающих растений все шире применяются методы биотехнологии [2, 6, 9, 10]. Они позволяют с использованием небольшого количества исходного материала в короткие сроки получить большое число выровненных растений. Полученные экземпляры можно использовать для пополнения живых коллекций, для реинтродукции или усиления ослабленных природных популяций редких видов.

Gladiolus palustris Gaudin – растение, занесённое в Красную Книгу РФ и находящееся под угрозой исчезновения (статус редкости – 0). Лимитирующие факторы исчезновения не изучены. Скорее всего, это нарушение гидрологического режима в местах исчезновения вида и сбор цветущих растений в декоративных целях [5].

Традиционный вегетативный метод размножения не позволяет быстро и в достаточном количестве размножить посадочный материал; многие представители рода *Gladiolus* имеют низкий коэффициент размножения [8, 16]. Применение клонального микроразмножения позволяет получить генетически однородный посадочный материал, сократить период разведения культуры, а также предоставляет возможность проведения работ в течение года и экономит площади, необходимые для выращивания посадочного материала *Gl. palustris* [1].

Однодольные растения, к которым относится гладиолус, труднее размножаются в культуре *in vitro*, чем двудольные [1]. Первое сообщение о возможности размножения видов рода *Gladiolus* L. в культуре *in vitro* появилось в 1970 г. [17]. Исследования последних лет направлены на изучение биологических особенностей различных типов эксплантов, оптимизацию минерального и органического состава питательных сред, повышение коэффициента размножения в культуре *in vitro*, получение выровненного оздоровленного посадочного материала [1, 8, 11].

Однако данные по клональному размножению гладиолусов неполные. Недостаточно изучено влияние стерилизующих растворов, минеральных и органических компонентов питательной среды, регуляторов роста и условий культивирования на процессы регенерации растений на каждом этапе микроразмножения [1]. Многие авторы отмечают положительное влияние применения 6-БАП на образование клубнелуковиц на этапе собственно микроразмножения [1, 8, 11].

Цель данной работы – изучение особенностей процессов регенерации *Gladiolus palustris* в культуре *in vitro*.

Объекты и методы. Исследования проводили в 2018–2021 гг. в лаборатории биотехнологии растений Главного ботанического сада им. Н.В. Цицина (ГБС РАН).

При введении в культуру *in vitro* в качестве исходного материала были использованы зрелые семена. Подготовку семян и введение в культуру *in vitro* проводили в стерильных условиях согласно методикам, разработанным в лаборатории биотехнологии ГБС РАН [6, 13]. Для поверхностной стерилизации последовательно применяли 2%-ный раствор фунгицида «Фундазола», 70%-ный раствор этанола (C_2H_5O) и 7%-ный раствор гипохлорита кальция ($Ca(ClO)_2$).

На стадии инициации использовали питательную среду Мурасиге-Скуга (1962), содержащую 6-БАП в концентрации 2,0 мг/л. В качестве регуляторов роста на стадии собственно микроразмножения использовали 6-БАП в концентрациях 2,0; 5,0; 10,0 мг/л и НУК в концентрации 0,1 мг/л. Укореняли экспланты на питательной среде, содержащей $\frac{1}{2}$ MS, 20 г/л сахарозы при температуре 5–7 °С и двух режимах освещённости (500 и 2 000 лк). В качестве стимуляторов корнеобразования применяли 3-индолилуксусную кислоту (ИУК) 1,5 мг/л и 3,0 мг/л, индометил-3-масляную кислоту (ИМК) 1,5 мг/л и 3,0 мг/л, а также совместно (1,5 мг/л ИУК + 1,5 мг/л ИМК). Субкультивирование эксплантов проводили через 50–60 суток. В качестве контроля использовали среду MS без добавления регуляторов роста.

Депонирование (до 24 месяцев) проводили при температуре 5–7 °С на питательной среде $\frac{1}{2}$ MS с добавлением 40 г/л сахарозы, 5 мг/л 6-БАП и 0,05 мг/л НУК, освещённости 500–1 500 лк.

Опыты проводились в 3-кратной повторности, по 10 эксплантов в каждой. Статистическую обработку результатов проводили с использованием стандартного пакета анализа Microsoft Excel.

Результаты и их обсуждение. Генетический банк *in vitro* ГБС РАН формировался с 1996 г. и в настоящее время является уникальным и наиболее представительным в России. На данный момент он содержит 1 310 таксонов. Особое внимание уделяется культивированию редких и исчезающих видов растений, коллекция которых насчитывает 82 вида, что составляет 17,3 % от общего числа покрытосеменных растений Красной книги РФ. 54 % коллекции *in vitro* редких и исчезающих видов растений составляют виды 1 и 2 категории редкости, 2 вида относятся к 0 категории. Большинство видов представлено образцами из разных популяций.

Особое внимание уделяли выбору объектов для включения в состав коллекций *in vitro*. В первую очередь в национальном масштабе нужно выделить виды 1 и 2 категорий Красной книги Российской Федерации не обеспеченные мерами охраны *in situ*. Следует выделять также таксоны со сложными трофическими связями и характеризующиеся узкой экологической амплитудой.

Gladiolus palustris – многолетнее травянистое растение высотой 30–60 см, имеющее яйцевидный клубень. Соцветие – колос. Цветки розоватые или ярко-розовые. Цветёт с мая по июнь. Плод – сухая коробочка [5].

Основной этап клонального микроразмножения – получение стерильной культуры *in vitro*. На этапе введения в культуру *in vitro* наиболее оптимальной была последовательная стерилизация «Бенлатом» (4%-ный), этанолом (70%-ный) в течение 30 сек и раствором гипохлорита кальция (7%-ный) 5–7 мин. Увеличение концентрации и экспозиции приводило к уменьшению уровня контаминации, но процент жизнеспособных эксплантов при этом также снижался.

Значительная роль в развитии регенерантов на этапе собственно микроразмножения принадлежит регуляторам роста. В результате проведённых исследований отмечено, что наибольшие значения морфометрических показателей были получены на питательных средах, содержащих 10 мг/л 6-БАП с добавлением 0,1 мг/л НУК. Дальнейшее увеличение концентрации регуляторов роста не дало положительного эффекта (табл. 1).

Таблица 1

Влияние концентрации регуляторов роста на морфометрические показатели *Gladiolus palustris* Gaudin на стадии собственно микроразмножения

Концентрация регулятора роста, мг/л		Коэффициент размножения	Длина листа, мм
6-БАП	НУК		
контроль		1,00 ±0,00	25,00 ±707
2	0,1	2,40 ±0,47	33,00 ±17,67
5	0,1	5,30 ±1,25	18,33 ±4,71
10	0,1	7,25 ±1,33	18,33 ±2,36
15	0,1	6,15 ±0,87	15,42 ±2,17

Сравнительный анализ полученных данных показал, что максимальный коэффициент размножения *Gl. palustris*, равный 7,25 ±1,33, был достигнут при культивировании эксплантов на питательной среде, содержащей 6-БАП (10 мг/л) и НУК (0,1 мг/л) (рис. 1).

Совместное использование ауксинов и цитокининов способствовало массовому образованию клубнелуковиц (до 12 шт. с одного экспланта). Повышение концентрации цитокинина (до 15 мг/л) приводило к образованию каллуса, который часто способствует соматклональной изменчивости. Для поддержания генетической стабильности *Gl. palustris* дальнейшее культивирование проводили на питательной среде, содержащей 10 мг/л 6-БАП и 0,1 мг/л НУК.

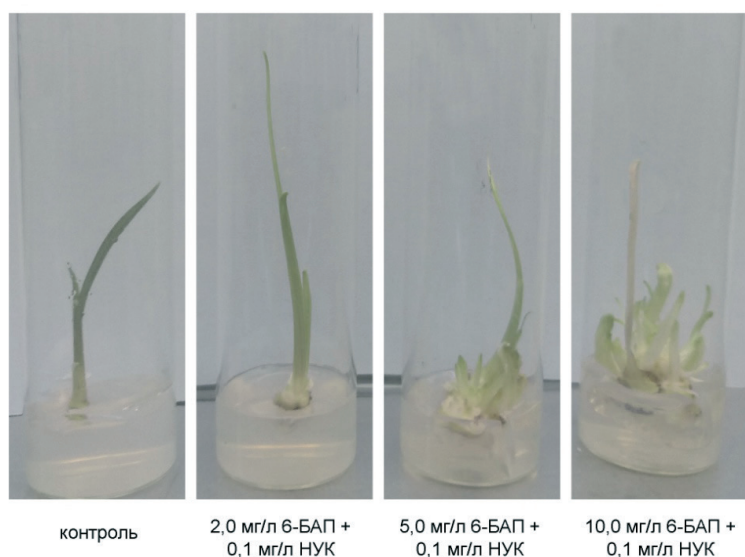


Рис. 1. Влияние концентрации регуляторов роста на развитие клубнелуковиц *Gladiolus palustris* на этапе собственно микроразмножения

На этапе укоренения исследовали влияние ИУК и ИМК в различных концентрациях на образование корней у клубнелуковиц *Gl. palustris*. (рис. 2).

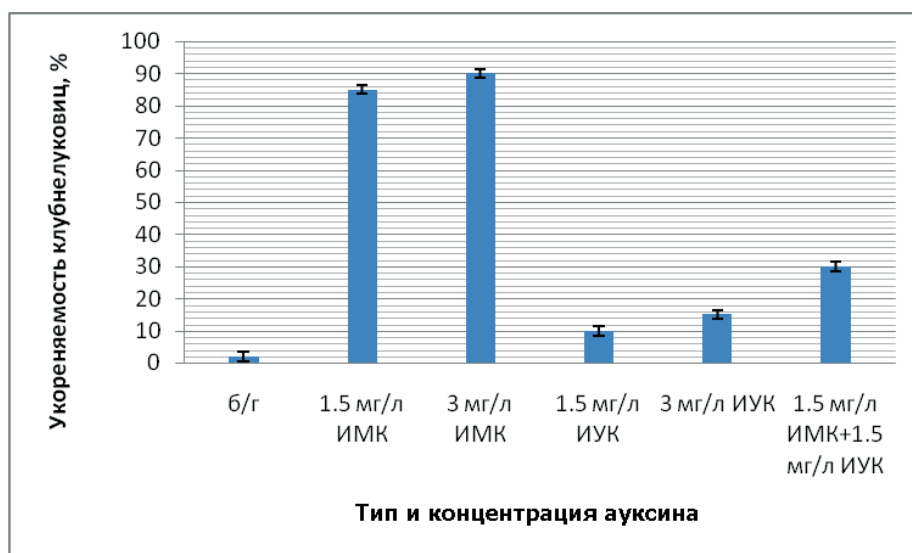


Рис. 2. Влияние типа и концентрации ауксина на укореняемость клубнелуковиц *Gladiolus palustris* Gaudin

Максимальный процент укореняемости ($91,2 \pm 1,4$) был получен на питательной среде $\frac{1}{2}$ MS, содержащей 3,0 мг/л ИМК и 20 г/л сахарозы, при температуре 16–18 °С и освещённости 2 000 лк. На питательной среде $\frac{1}{2}$ MS, содержащей 1,5 мг/л ИМК и 20 г/л сахарозы, процент укореняемости составил $87,6 \pm 1,3$, поэтому для повышения экономической рентабельности производства посадочного материала *Gl. palustris* эта питательная среда является оптимальной.

По литературным данным известно, что на укоренение растений *in vitro* положительное влияние оказывает снижение интенсивности освещения [4]. Наши исследования показали, что укоренение микропобегов *Gl. palustris in vitro* зависело не только от состава питательной среды, но и от освещения в период укоренения. Снижение интенсивности освещения до 500 лк позволило получить укоренённые растения на 7 суток раньше, чем при освещённости 2 000 лк.

Одним из эффективных способов сохранения является культивирование регенерантов в условиях замедленного роста. Длительное хранение позволяет поддерживать биологический материал от нескольких месяцев до 2–3 лет без субкультивирования в зависимости от используемой технологии и вида растения [12, 15]. Снижение темпов роста обычно достигается за счёт модификации сред или условий культивирования. К модификациям сред относятся: снижение минеральной основы, содержания углеводов, изменение концентраций или комбинаций регуляторов роста, добавление осмотически активных веществ, а также уменьшение температуры и интенсивности освещения [14]. Сроки и специфика условий хранения растительного материала определяются биологическими особенностями таксонов. В процессе исследований показано, что совместное использование снижения интенсивности освещения, состава питательной среды, концентрации осмотиков и ретардантов значительно увеличивало как период субкультивирования, так и жизнеспособность эксплантов в процессе хранения *in vitro*. Оптимальными условиями депонирования *Gl. palustris* является питательная среда $\frac{1}{2}$ MS, 5 мг/л 6-БАП, 0,05 мг/л НУК и 40 г/л сахарозы, пониженная температура (3–7 °С) и слабая освещённость (500 лк) [4, 6].

Заключение. Использование биотехнологических методов для сохранения редких видов растений, несомненно перспективно.

В процессе исследования был впервые разработан метод культивирования *in vitro* *Gl. palustris*. Наиболее оптимальной питательной средой для клонального микроразмножения *Gl. palustris* является MS с добавлением 10 мг/л БАП и 0,1 мг/л НУК (коэффициент размножения составил $7,25 \pm 1,33$). Оптимальным условием для формирования корней у

клубнелуковиц является культивирование на питательной среде, содержащей $\frac{1}{2}$ MS, 1,5 мг/л ИМК и 20 г/л сахарозы, при температуре 16–18 °С и освещённости 500 лк.

Установлено, что оптимальными условиями депонирования *Gl. palustris* является питательная среда $\frac{1}{2}$ MS 5 мг/л 6-БАП, 0,05 мг/л НУК и 40 г/л сахарозы, пониженные температуры (3–7 °С) и освещённость (500 лк).

Таким образом, показано, что способ микроразмножения *in vitro* может предоставить возможность сохранения и устойчивого воспроизводства исчезающего вида *Gl. palustris*. Полученные данные по оптимизации метода клонального микроразмножения этого вида позволяют получить достаточное количество посадочного материала в целях восстановления численности природных популяций.

Работа выполнена в рамках Государственного задания ГБС РАН (№ 118021490111-5)

Библиографический список

1. Арун Кумар, Ашвини Кумар, Вандана Шарма, Анураг Мишра, Шилпи Сингх, Пушпендра Кумар. Регенерация гладиолуса *in vitro* (*Gladiolus hybrida* L.): Оптимизация питательных сред и оценка генетической точности // Микробиология. Приложение. Наука. – 2018. – Вып. 7(10). – С. 2900-2909.
2. Бутенко Р. Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М.: Наука, 1964. – 272 с.
3. Горбунов Ю.Н., Орленко М.Л. Растения Красной книги России в коллекциях ботанических садов и дендрариев // Plants of Red Data Book of Russia in collections of botanical gardens and arboreta. – М.: ГБС РАН, – 2005. – 144 с.
4. Деменко В.И., Шестибратов К.А., Лебедев В.Г. Укоренение – ключевой этап размножения растений *in vitro* // Известия ТСХА. – 2010. – Вып. 1. – С. 73-85.
5. Красная книга Российской Федерации (растения и грибы). – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2008. – 855 с.
6. Способ клонального микроразмножения шпажника болотного (*Gladiolus palustris* Gaudin): Пат. 2729828 РФ / Молканова О.И., Ширнина И.В., Коновалова Т.Ю., Горбунов Ю.Н.; заявитель и патентообладатель: ФГБУН ГБС РАН. – № 2019138745; заявл. 29.11.2019; опубл. 12.08.2020. – Бюл. № 23
7. Ревин П. Речь на XVI Международном ботаническом конгрессе // Информ. бюлл. Совета ботанических садов России и Отделения Международного совета по охране растений. – 2000. – Вып. 11. – С. 38-47.
8. Шибанова Н.Л., Чемарова Т.Д. Использование клубнелуковиц при микроразмножении сортов гладиолуса (*Gladiolus* × *hybridus* Hort.) селекции учебного ботанического сада ПГНИУ // Научное обозрение. Биологические науки. – 2020. – № 4. – С. 43-48. – ISSN 2500-3399.
9. Chandrakant S., Poornima R and Rajkumar B.K. Recent Advances in Conservation of Plant Genetic Resources // Agricult. Research. & Technol. – 2017. – Vol. 7. – P. 1-3. – <https://doi.org/10.19080/ARTOAJ.2017.07.555718>.
10. Chauhan R.S. Biotechnological Approaches for Conservation of Rare, Endangered and Threatened Plants // Intern. Jour. of Scientific and Research Publications. – 2016. – Vol. 6.

– P. 10-14. – ISSN 2250-3153.

11. Dantu P.K., Bhojwani S.S. In vitro corm formation and field evaluation of corm derived plants of *Gladiolus* // *Scientia Horticulturae*. – 1995. – Vol. 61. – P. 115-129.

12. Engelmann F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity // *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. – 2011. – Vol. 47. – P. 5-16. – <https://doi.org/10.1007/s11627-010-9327-2>.

13. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // *Physiol. plant.* – 1962. – Vol. 15. – P. 473-497.

14. Ruffoni B., Savona M. The temporary immersion system (T.I.S.) for the improvement of micropropagation of ornamental plants // *Acta Horticulturae*, – 2005. – Vol. 683. – P. 445-453. – <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.683.59>.

15. Sarasan V., Cripps R., Ramsay M.M., Atherton C., McMichen M., Prendergast G., Rowntree J.K. Conservation in vitro of threatened plants – progress in the past decade // *In Vitro Cellular & Developmental Biol.* – 2006. – Vol. 42. – P. 206-214. – <https://doi.org/10.1079/IVP2006769>.

16. Tan Nhut D., Teixeira Da Silva J.A., Huyen P.X., Paek K.Y. The importance of explant source on regeneration and micropropagation of *Gladiolus* by liquid shake culture // *Scientia Horticulturae*. – 2004. – Vol. 102. – P. 407-414. – <http://doi.org/10.1016%2Fj.scienta.2004.04.004>.

17. Ziv M. Enhanced shoot and cormlet proliferation in liquid cultured gladiolus buds by growth retardants // *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. – 1989. – P. 101-110. – ISSN 0167-6857.

SOME FEATURES OF *IN VITRO* REPRODUCTION AND CONSERVATION OF THE RARE SPECIES *GLADIOLUS PALUSTRIS* GAUDIN

Molkanova O.I., Gorbunov Yu.N., Shirnina I.V., Konovalova T.Yu.

Federal State Budgetary Scientific Institution

*N.V. Tsitsin Main Botanical Garden of the Russian Academy of Sciences,
Moscow, Russia, e-mail: molkanova@mail.ru*

A collection of rare plant species preserved *in vitro* has been created in the Plant Biotechnology Laboratory (N.V. Tsitsin Main Botanical Garden of the Russian Academy of Sciences). *Gladiolus palustris* Gaudin is a rare species with a limited habitat, listed in the Red Book of the Russian Federation as endangered. When sterilizing seeds, the optimal result was achieved by using calcium hypochlorite at a concentration of 7 % (5–7 min.). The MS medium supplemented with 10 mg/l 6-BAP and 0.1 mg/l NAA was optimal at the stage of micropropagation, while at the stage of rhizogenesis it was ½ MS supplemented with 1.5 mg/l IBA and containing 20 g/l sucrose. Optimal conditions for depositing *Gl. palustris* are a nutrient medium of ½ MS, 5 mg/l 6-BAP, 0.05 mg/l NAA and 40 g/l sucrose, low temperature (3–7 °C) and low illumination (500 lux). The developed technology is the basis for obtaining material for the reintroduction of rare species and replenishment of collections growing in botanical gardens.

Key words: rare species, *Gladiolus palustris* Gaudin, clonal micropropagation, growth regulators, long-term preservation *in vitro*.