

УДК 581.143.6

ОСОБЕННОСТИ ВВЕДЕНИЯ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* ДВУХ ВИДОВ *TAMARIX*

Т. А. Крицкая, А. С. Кашин

Саратовский государственный университет им. Н. Г. Чернышевского
Россия, 410010, Саратов, ул. Академика Навашина, 1
E-mail: kriticaiata@gmail.com

Поступила в редакцию: 01.11.15 г.

Особенности введения в культуру *in vitro* двух видов *Tamarix*. – Крицкая Т. А., Кашин А. С. – Подобраны условия для введения в культуру *in vitro* двух видов тамариксов (*Tamarix laxa* и *T. ramosissima*): способ стерилизации, минеральный и гормональный составы питательных сред. Определены условия индукции побего- и корнеобразования в культуре *in vitro*. Наилучшим способом стерилизации стеблевых сегментов являлась последовательная поверхностная обработка мыльным раствором, 70%-ным этанолом, 10%-ным раствором «Белизны», 5%-ным раствором «Лизоформина-2000» с последующей трёхкратной промывкой в стерильной дистиллированной воде. Выход жизнеспособных эксплантов составил более 60%. При этом меньшая концентрация стерилизующих агентов способствовала лучшему обеззараживанию материала.

Ключевые слова: *Tamarix*, *in vitro*, клональное микроразмножение, стерилизация эксплантов, лекарственные растения.

Features of the introduction of two *Tamarix* species to the culture *in vitro*. – Kritskaya T. A., Kashin A. S. – The parameters for introduction in *in vitro* culture of *Tamarix laxa* and *T. ramosissima*, including sterilization method, mineral and hormonal composition of the medium used, are defined. It is proved that the most efficient method of sterilization (the percentage of viable explants is over 60%) is the treatment with soap solution, 70% ethanol, 10% Belizna detergent, 5% solution of Lizoformin-2000 detergent and subsequent washing with sterile distilled water three times. The lower concentration of sterilizing agents improves the material sterilization. The conditions of induction of shoot and root formation of *in vitro* cultures are established.

Key words: *Tamarix*, *in vitro*, clonal micropropagation, explants disinfection, medicinal plants.

Род гребенщик, или тамарикс (*Tamarix* L.), насчитывает около 60 видов, распространенных в пустынных областях Европы, Азии и Афри-

ки. Гребенщики относятся к группе древних растений Ирано-Туранского региона, ставшего центром их формообразования (Бобров, 1979). Растения этого рода широко используются для укрепления подвижных песков и для озеленения в зонах пустынь и полупустынь, особенно при засоленных почвах (Русанов, 1958; Семенютина и др., 2014). В условиях аридных экосистем Северо-Западного Прикаспия заросли тамариковых кустарников являются действенным фактором ценозообразования, поскольку в их подкроновом пространстве формируется специфический микроклимат, отличающийся относительной мезофильностью (Магомедов, 2012).

В Саратовской области встречается два вида гребенщиков – *Tamarix laxa* Willd. и *T. ramosissima* Ledeb. (Еленевский и др., 2008). Оба вида используются как лекарственные растения в народной медицине, для закрепления песков, а также являются медоносными (Дикорастущие..., 2001). *T. laxa* включён в Красную книгу Саратовской области (Гребенюк, Давиденко, 2006) как редкий вид, привязанный к засоленным почвам, произрастающий на границе своего ареала.

Выращивание тамариков из семян хлопотно и применяется лишь в селекционных работах (Русанов, 1958). Семена теряют всхожесть через 1–4 месяца. Черенкование гребенщиков в ботаническом саду в условиях Саратовской области положительных результатов не принесло.

Поэтому целью нашей работы являлось изучение особенностей введения в культуру *in vitro* двух видов *Tamarix* и их дальнейшего регенерационного потенциала.

В работе применяли общепринятые методы биотехнологии растений (Бутенко, 1999). В качестве эксплантов использовали сегменты побегов текущего года 1,5–2,0 см длиной с 2–3 междоузлиями, срезанные с верхней части ветвей. Сбор материала проводили из природных популяций изучаемых объектов в Саратовской (Александрово-Гайский район) и Волгоградской (Палласовский район) областях.

Перед началом стерилизации черенки погружали в мыльный раствор (можевеловое мыло Ялівец производства Никитского ботанического сада, Ялта) и экспонировали на лабораторной качалке 30 мин. После этого их 2–3 промывали водопроводной водой. Обработывали 70%-ным этанолом в течение 2–3 мин, затем переносили в раствор бытового отбеливателя «Белизна» (Электра, Волгоград) и/или препарата «Лизоформин-2000» (ЛЗФ) с добавлением 2–3 капель детергента

ОСОБЕННОСТИ ВВЕДЕНИЯ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO TAMARIX*

Tween 80 (Panreac Quimics, ЕС) и экспонировали на шейкере (200 оборотов в минуту). Концентрацию стерилизующего агента и время экспозиции подбирали экспериментально. Черенки трижды промывали стерильной дистиллированной водой и в условиях ламинарного бокса (Lamsystems, Россия) помещали на агаризованную питательную среду в стеклянные пробирки.

В качестве базовой питательной среды использовали WPM (McCown, Lloyd, 1981), дополненную 0,5 мг/л 6-бензиладенина и 1,0 мг/л зеатина. Пробирки с эксплантами переносили в культуральную комнату (23–25°C, 16-часовой фотопериод, освещение белыми люминесцентными лампами 2000–3000 люкс) и ежедневно осматривали на наличие инфекции.

Жизнеспособный асептический материал *T. ramosissima* удалось получить после последовательной стерилизации в 70% этаноле (2 мин), 10% «Белизне» (5 мин) и 5% ЛЗФ (1 мин). Выход обеззараженных эксплантов в этом случае составил в среднем 64,7%. В табл. 1 представлены апробированные варианты стерилизации. Использование этанола и раствора «Белизны» оказалось недостаточным для деконтаминации; материал зарастал грибной инфекцией уже на третий день культивирования. Благодаря включению ЛЗФ как дополнительной ступени стерилизации экспланты удалось освободить от инфекции, но только в том варианте, где время экспозиции во всех стерилизующих агентах было наименьшим (вариант № 5). Увеличение длительности стерилизации в растворе «Белизны» или ЛЗФ вызывало сильный ожог тканей, что приводило к гибели эксплантов.

Таблица 1

Схема стерилизации эксплантов *T. ramosissima*

Стерилизующий раствор	Время экспозиции, мин							
	Вар. 1	Вар. 2	Вар. 3	Вар. 4	Вар. 5	Вар. 6	Вар. 7	Вар. 8
70% этанол	2	2	2	2	2	2	2	2
10% «Белизна»	5	10	-	15	5	10	10	15
15% «Белизна»	-	-	10	-	-	-	-	-
5% ЛЗФ	-	-	-	-	1	1	3	1
Трёхкратное ополаскивание в стерильной дистиллированной воде								

Исходя из полученных данных, мы уменьшили количество экспериментальных вариантов стерилизации в работе с *T. laxa* и увеличили на 1 мин длительность обработки 70%-ным этанолом для снижения контаминации (табл. 2). Как и в предыдущем эксперименте наибольшее количество жизнеспособных эксплантов (62,5%) было получено в том варианте, где время экспозиции в стерилизующих агентах было наименьшим (рисунок).

Таблица 2

Схема стерилизации эксплантов *T. laxa*

Стерилизующий раствор	Время экспозиции, мин	Кол-во развившихся эксплантов, %
70% этанол 10% «Белизна» 5% ЛЗФ	3 5 1	62,5
70% этанол 10% «Белизна» 5% ЛЗФ	3 10 1	25,0
70% этанол 10% «Белизна» 5% ЛЗФ	3 10 2	25,4

Дальнейшее культивирование тамариксов осуществлялось путём микрочеренкования побегов на питательной среде WPM.

В качестве веществ цитокининового типа действия нами были использованы 6-бензиладенин и зеатин в концентрациях 0,5 и 1,0 мг/л соответственно. Выбор такого сочетания связан с тем, что отдельно взятые эти цитокинины не оказывали желаемого эффекта на культуру, от 20 до 50% эксплантов некротизировали. Указанное сочетание было апробировано ранее и давало положительный результат в работах с другими различными культурами тканей растений (Блюднева и др., 2013; Крицкая, Кашин, 2013; Крицкая и др., 2015). Коэффициент размножения составил 1:3–1:7 через 30 суток культивирования. Образование корней у полученных клонов отмечалось после культивирования на питательной среде WPM, дополненной α -нафтилуксусной кислотой в концентрации 0,5 мг/л.

На наш взгляд, дезинфицирующий эффект кратковременной обработки антисептиками обусловлен тем, что листья гребенщиков имеют чешуевидную форму и у основания покрыты соевым налётом, что

ОСОБЕННОСТИ ВВЕДЕНИЯ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* TAMARIX

препятствует проникновению вглубь инфекции. Кроме того, доказано, что листья близкого вида *T. dioica* Roxb. обладают цитотоксической активностью и противогрибковыми свойствами (Khan et al., 2013), благодаря



которым он и получил распространение в народной медицине. По-видимому, более длительная экспозиция в дезинфицирующих растворах разрушала естественные барьерные механизмы растительных тканей и содержащиеся в них фунгициды, что и провоцировало некроз или развитие грибной инфекции. Немаловажно и то, что побеги с почками отбирали с верхней части стебля – этот растительный материал считается менее загрязнённым (Сидоренко, Митрофанова, 2011; Иванова и др., 2014).

Эксплант *T. laxa* с раскрывшейся почкой на питательной среде WPM

Лучший дезинфицирующий эффект при меньшей концентрации хлорсодержащего агента отмечался в работе К. А. Карпеченко с соавторами (2012). Авторы использовали раствор «Белизны» в концентрациях 25 и 4% (второй вариант дополнительно содержал 0,04% мертиолята) для стерилизации побегов кизильника. Выход жизнеспособных эксплантов после обработки составил 7 и 69% соответственно.

Таким образом, получены асептические культуры *T. laxa* и *T. ramosissima*. Представлены предварительные результаты по индукции побего- и корнеобразования эксплантов. Установлено, что оптимальным способом стерилизации стеблевых сегментов являлась последовательная поверхностная обработка мыльным раствором (30 мин), 70%-ным этанолом (2–3 мин), 10%-ным раствором «Белизны» (5 мин) и 5%-ным раствором ЛЗФ (1 мин) с последующей трёхкратной промывкой в стерильной дистиллированной воде. Полученные данные могут служить основой в дальнейшей работе по массовому получению посадочного материала этих видов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Блюднева Е. А., Крицкая Т. А., Кашин А. С. Использование клонального микроразмножения для массового получения посадочного материала декора-

тивных и плодово-ягодных культур в Ботаническом саду СГУ // Бюл. Бот. сада Саратов. гос. ун-та. 2013. № 11. С. 119–131.

Бобров Е. Г. Род Гребенщик – *Tamarix* L. // Флора европейской части СССР. Т. IV / отв. ред. А. А. Федоров. Л.: Наука. Ленингр. отд-ние, 1979. С. 151–154.

Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: учеб. пособие. М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. 160 с.

Гребенюк С. И., Давиденко О. Н. *Tamarix laxa* Willd. // Красная книга Саратовской области: Грибы. Лишайники. Растения. Животные. Саратов: Изд-во Торг.-пром. палаты Саратов. обл., 2006. С. 169–170.

Дикорастущие полезные растения России / отв. ред. А. Л. Буданцев, Е. Е. Лесинская. СПб.: Изд-во СПХФА, 2001. 663 с.

Еленевский А. Г., Буланый Ю. И., Радыгина В. И. Конспект флоры Саратовской области. Саратов: ИЦ «Наука», 2008. 232 с.

Иванова Н. Н., Митрофанова И. В., Митрофанова О. В. Методические основы клонального микроразмножения некоторых декоративных культур // Сб. науч. тр. Гос. Никитского бот. сада. 2014. № 138. С. 57–101.

Карпеченко К. А., Землянухина О. А., Моисеева Е. В., Баранова Т. В., Каляев В. Н., Вепринцев В. Н., Карпеченко Н. А., Карпеченко И. Ю., Кондратьева А. М. Введение в культуру *in vitro* кизильника Даммера (*Cotoneaster Dammerii* С.К. Schneid) // Фундаментальные исследования. Биол. науки. 2012. №6. С. 329–332.

Крицкая Т. А., Кашин А. С. Использование метода культуры *in vitro* для сохранения некоторых редких и исчезающих кальцефильных видов растений Саратовской области // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2013. Т. 13, вып. 4. С. 65–73.

Крицкая Т.А., Кашин А.С., Попова А.О. Повышение эффективности клонального микрорамноения *Allium regelianum* A. Becker // Бюл. Бот. сада Саратов. гос. ун-та. 2015. № 13. С. 197–205.

Магомедов М. М. Ценозообразующая роль древовидных кустарников (*Tamarix meyeri* Boiss., *T. ramosissima* Ledeb.) аридных территорий Северо-Западного Прикаспия: автореф. дис ... канд. биол. наук. Махачкала, 2012. 23 с.

Русанов Ф. Н. Род Гребенщик, или Тамарикс – *Tamarix* L. // Деревья и кустарники СССР. Т. IV / под ред. С. Я. Соколова. М.;Л.: Изд-во АН СССР, 1958. С. 795–822.

Семенютина А. В., Свинцов И. П., Таран С. С., Кружилин С. Н., Хужахметова А. Ш., Семенютина В. А., Ульянов Д. В. Принципы формирования фонда посадочного материала биоразнообразия древесных видов для улучшения экологической ситуации малолесных регионов // Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Сер. Естеств. и техн. науки. 2014. № 7–8. С. 56–74.

ОСОБЕННОСТИ ВВЕДЕНИЯ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* TAMARIX

Сидоренко Т. И., Митрофанова И. В. Особенности введения в культуру *in vitro* некоторых сортов садовой группы миниатюрных роз // Бюл. Гос. Никитского бот. сада. 2011. № 133. С. 41–53.

Khan S., Ullah F., Mahmood T. *In vitro* antimicrobial and cytotoxic activity of *Tamarix dioica* Roxb. leaves // Turk. J. Biol. 2013. Vol. 37. P. 329–335.

McCown B. H., Lloyd G. Woody plant medium (WPM) – a revised mineral nutrient formulation for microculture of woody plant species // Hort. Sci. 1981. Vol. 16. P. 453.