

## Список литературы

- Буторина А.К., Дерюжкин Р.И., Мурая Л.С. и др. Цитологические особенности гетерозисной лиственницы // Лесоведение. 1987. №4. С.82–86.
- Буторина А.К., Богданова Е.В. Адаптивное значение и возможное происхождение В-хромосом у ели колючей // Цитология. 2001. Т.43, №8. С.809–814.
- Григорьевская А.Я., Попова О.С. Интродукция и акклиматизация древесно-кустарниковых пород в городе Воронеже // Антропогенное влияние на флору и растительность: Материалы II науч.-практ. регион. конф. Липецк, 2007. С.160–165.
- Владимирова О.С. Добавочные хромосомы хвойных (на примере представителей рода *Picea* A. Dietr.): Автореф. дис. ... канд. биол. наук / Ин-т леса им. В.Н. Сукачева СО РАН. Красноярск, 2002. 23 с.
- Владимирова О.С., Муратова Е.Н. Кариологические особенности ели сибирской (*Picea obovata* Ledeb.) в условиях антропогенного загрязнения г. Красноярска // Экологическая генетика. 2005. Т.III, №1. С.18–23.
- Круклис М.В. Кариологические особенности *Picea obovata* // Лесоведение. 1971. №2. С.76–84.
- Муратова Е.Н. Кариотипы кедровых сосен // Цитология. 1978. Т.20, №8. С.972–976.
- Рубцов Н.Б., Бородин П.М. Эволюция хромосом: от А до В и обратно // Природа. 2002. №3. С.59–66.
- Топильская Л.А., Лучникова С.В., Чувашина Н.П. Методика приготовления ацетогематоксилиновых препаратов // Цитологические исследования плодовых и ягодных культур. Мичуринск, 1976. С.58–60.
- Jamilena M., Ruiz Rejon C., Ruiz Rejon M. A molecular analysis of the *Crepis capillaries* B chromosome // J. Cell Sci. 1994. Vol.107. P.703–708.
- Sharbel T.F., Green D.M., Houben A. B-chromosome origin in the endemic New Zealand frog *Leiopelma hochstetteri* through sex chromosome devolution // Genome. 1998. Vol.41. P.14–22.
- Sivolapov A.I., Blagodarova T.A. Different levels of mixoploidy in hybrid poplars // Cytogenetic studies of forest trees and shrub species. Zagreb: Hrvatske šume; Šumarski fakultet Sveučilišta, 1997. P. 311–316.

УДК 581.143.6

СОХРАНЕНИЕ И УСКОРЕННОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ  
ПИОНА УКЛОНЯЮЩЕГОСЯ МЕТОДОМ ЭМБРИОКУЛЬТУРЫ**А.А. Зарипова**

Ботанический сад-институт Уфимского научного центра РАН,  
450080, г. Уфа, ул. Полярная, 8; e-mail: zaripova.al@mail.ru

Пион уклоняющийся, *Paeonia anomala* L. (сем. Раеониасеае) – редкое лекарственное растение, находящееся под угрозой исчезновения, численность особей которого уменьшилась до критического уровня (Мулдашев и



др., 1998; Красная книга ..., 2001; Мулдашев и др., 2004). Лимитирующими факторами являются рубки леса, выпас скота в лесах и лугах, выкапывание корневищ населением, а также длительное прорастание семян.

Возобновление вида в природных условиях и размножение в интродукционной культуре затруднено в связи с медленным прорастанием семян (2–3 года). Семена *P. anomala* имеют недоразвитый зародыш, который отличается очень низким содержанием физиологически активных веществ и слабой активностью ферментов (Цингер, 1951; Валишина, Цингер, 1952; Попцов и др., 1981). Кроме того, у *P. anomala* наблюдается продолжительный прегенеративный период развития особей (Николаева, 1982; Игнатьева, 1995), связанный с морфофизиологическим глубоким эпикотильным типом покоя (Николаева и др., 1985).

С целью сохранения и воспроизводства генофонда редких и исчезающих видов растений перед нами была поставлена задача разработать технологию ускоренного размножения *P. anomala* с использованием метода эмбриокультуры.

### Материал и методика

Материалом для работы служили семена *P. anomala*, собранные с растений, произрастающих в Татышлинском районе Республики Башкортостан. Эксплантами являлись изолированные зародыши зрелых семян, которые не вступили в период покоя.

Приготовление и стерилизацию питательных сред для культивирования тканей и органов *P. anomala* проводили согласно предложенным рекомендациям (Бутенко, 1964; Калинин и др., 1980).

Перед извлечением зародышей проводили стерилизацию семян по следующей схеме: семена отмывали в мыльном растворе в течение 15 мин, затем промывали проточной водой в течение 10 мин, ополаскивали дистиллированной водой, далее в ламинар-боксе выдерживали в 70%-ном этаноле в течение 1 мин, в 3%-ном растворе перекиси водорода в течение 5 мин, в 0,1%-ном растворе диацета в течение 20 мин, промывали дистиллированной водой 3 раза по 15 мин.

Зародышей вычленили из семян в асептических условиях ламинар-бокса на поверхности стерильной бумаги. Вдоль семени ближе к халазальному концу делали небольшой надрез семенной кожуры и окружающих зародыш тканей (эндосперм) при помощи ланцета. Затем зародыш извлекали и немедленно помещали в пробирки с питательной средой во избежание подсыхания. Зародышей выделяли осторожно, чтобы не повредить их, так как незначительные повреждения отрицательно сказывались на их развитии в культуре *in vitro*. В течение первых трех-четырех недель пробирки с зародышами находились в темноте, при 26°C и относительной влажности



воздуха 70%. После образования первичного корешка длиной 2–3 см проростки выставляли на светоплощадку с люминесцентными лампами 3000 лк и температурой 26°C.

Для изучения влияния различных добавок на рост и развитие изолированных зародышей *P. anomala* использовали среды Уайта, Хеллера и Мурасиге–Скуга с сахарозой, глюкозой и различными добавками стимулирующих рост веществ: индолилуксусной кислотой (ИУК), индолилмасляной кислотой (ИМК),  $\alpha$ -нафтилуксусной кислотой (НУК), 6-бензиламинопурина (БАП), кокосового молока, дрожжевого экстракта, гидролизата казеина. Содержание в питательной среде сахарозы составляло 2%, агара – 0,6%, рН питательной среды 5,6–5,8.

### Результаты и их обсуждение

В наших опытах все вышеперечисленные добавки приводили чаще всего к аномальному развитию зародыша. Наибольшая тератология наблюдалась на средах с ауксинами и дрожжевым экстрактом. При этом корневая система покрывалась каллусной тканью, чрезмерно разрастался гипокотиль, семядоли и почка также очень часто образовывали каллусную ткань. Добавление в питательную среду сахарозы приводило к более интенсивному росту по сравнению с использованием глюкозы. К тому же экономически выгоднее использование сахарозы. Нормальное развитие зародышей наблюдали на простой минерально-сахарозной среде Хеллера и с половинной ( $\frac{1}{2}$ ) концентрацией минеральных солей среды Мурасиге и Скуга. Последующую работу проводили с использованием  $\frac{1}{2}$  состава минеральной среды Мурасиге и Скуга.

Нами были проведены исследования по влиянию глубины погружения зародышей *P. anomala* в питательную среду. Опыты показали, что при помещении зародышей на глубину 0,4–0,5 см от поверхности среды они гибнут через два пассажа, т.е. через 42–45 дней. Если зародыши помещали на поверхности среды, они засыхали. Оптимальное положение зародыша – это частичное погружение в питательную среду на 0,1–0,2 см. Полученные нами результаты согласуются с данными Т.Б. Батыгиной и Р.Г. Бутенко (1980).

Зародыши группировали по размерам: от 0,3 до 0,4 мм и от 0,5 до 0,6 мм. Жизнеспособность зародышей зависела от их размера при инокуляции (табл. 1). Хорошо сформированные растения были получены из зародышей размером от 0,5 до 0,6 мм. Присутствие в питательной среде Мурасиге и Скуга фитогормонов не являлось обязательным условием формирования растений из зародышей (табл. 2). Тем не менее среда с низкими концентрациями цитокинина и ауксина также способствовала развитию зародыша.



Таблица 1. Влияние размера экспланта на жизнеспособность зародышей *Paeonia anomala* L.

№ п/п	Размер зародыша, мм	Жизнеспособные, %	Нежизнеспособные, %
1	0,3–0,4	40 ± 3,2	60 ± 4,7
2	0,5–0,6	80 ± 6,7	20 ± 1,2

Нормальное развитие изолированных зародышей *P. anomala* наблюдали на среде Мурасиге и Скуга (МС) с половинной концентрацией минеральных солей без гормонов. На 5–7-е сутки после вычленения зародыша раздвигались семядоли; на 12–14-е сутки появлялся корешок; на 25–30-е сутки корешок достигал 1,5–2,0 см длины, семядоли увеличивались. После переноса проростков в условия фотопериода через месяц начиналось позеленение семядолей. Через 40 суток появлялась почка, корешок достигал 3–5 см длины.

Таблица 2. Влияние регуляторов роста на развитие зародышей *Paeonia anomala* L. в культуре *in vitro*

№ п/п	Концентрация, мг/л		Развитие проростка	
	ауксинов	БАП		
1	0	0	+	
2	ИМК	0,01	0,1	+
		0,01	0,3	±
		0,01	0,5	-
3	ИУК	0,01	0,1	±
		0,01	0,3	-
		0,01	0,5	-
4	НУК	0,01	0,1	±
		0,01	0,3	-
		0,01	0,5	-

Примечание: «+» – активное развитие, «±» – слабое развитие, «-» – деформированный проросток (различные нарушения в развитии).

В культуре изолированных зародышей *P. anomala* мы получали интенсивное развитие зародышей, активный рост их корневой системы, гипокотыля и семядолей, но верхушечная почка проростка, при принятых условиях выращивания (температура 26°C), оставалась в состоянии покоя.

Для выведения из покоя верхушечной почки проростков нами использовано влияние пониженных температур и гибберелловой кислоты. При воздействии низкими положительными температурами (5–6°C) и добавлении в питательную среду гибберелловой кислоты в концентрации 1,0 мг/л первый лист появился через один месяц культивирования *in vitro* (рис. 1), в то время как контрольные растения имели лишь семядоли.



Полученные растения переводили в условия *ex vitro*. Пересадка растений из стерильной питательной среды в условия теплицы сопровождалась переживанием ими стрессовых состояний, связанных с изменением влажности воздуха и средой культивирования, а также из-за слабого развития корневых волосков.

Для переноса растений из пробирок в условия *ex vitro* использовали четыре варианта питательных субстратов, состоящих из вермикулита, дерновой почвы, песка и торфа. В табл. 3 приведены составы почвенных смесей и результаты приживаемости растений *P. anomala* при культивировании их в различных почвенных субстратах. Культивирование растений в почвенных субстратах № 2 и № 3 приводило к гибели большей их части. По-видимому, это связано с плохой аэрацией почвенных смесей. Наиболее благоприятным для роста регенерантов *P. anomala* оказался субстрат из дерновой почвы и вермикулита в соотношении 1:1 (92%), а также из вермикулита (86%). Известно, что слабая аэрация корней становится основной причиной плохого роста растения, недостаток кислорода тормозит дыхание, отрицательно влияет на усвоение минеральных элементов, фотосинтез и снижает продукционные процессы (Сабинин, 1963).



Рис. 1. Развитие *Paeonia anomala* L. на питательной среде  $\frac{1}{2}$  МС, содержащей гибберелловую кислоту в концентрации 1,0 мг/л, в условиях низких положительных температур

Таблица 3. Приживаемость растений *Paeonia anomala* L. в питательных субстратах

Номер субстрата	Состав субстратов (соотношение компонентов)	Приживаемость растений, %
1	Вермикулит	86
2	Дерновая почва, песок (1:1)	21
3	Дерновая почва, песок, торф (1:1:1)	8
4	Дерновая почва, вермикулит (1:1)	92

Таким образом, на этапе переноса растений из стерильных условий в нестерильные удалось подобрать питательные субстраты, которые позволили достичь высокий процент их приживаемости (рис. 2).

Для доращивания растения помещали в емкости с субстратом и переносили в камеру с повышенной влажностью воздуха (85–90%). Создание оптимального водно-воздушного режима является определяющим фактором благоприятного прохождения адаптации растений.



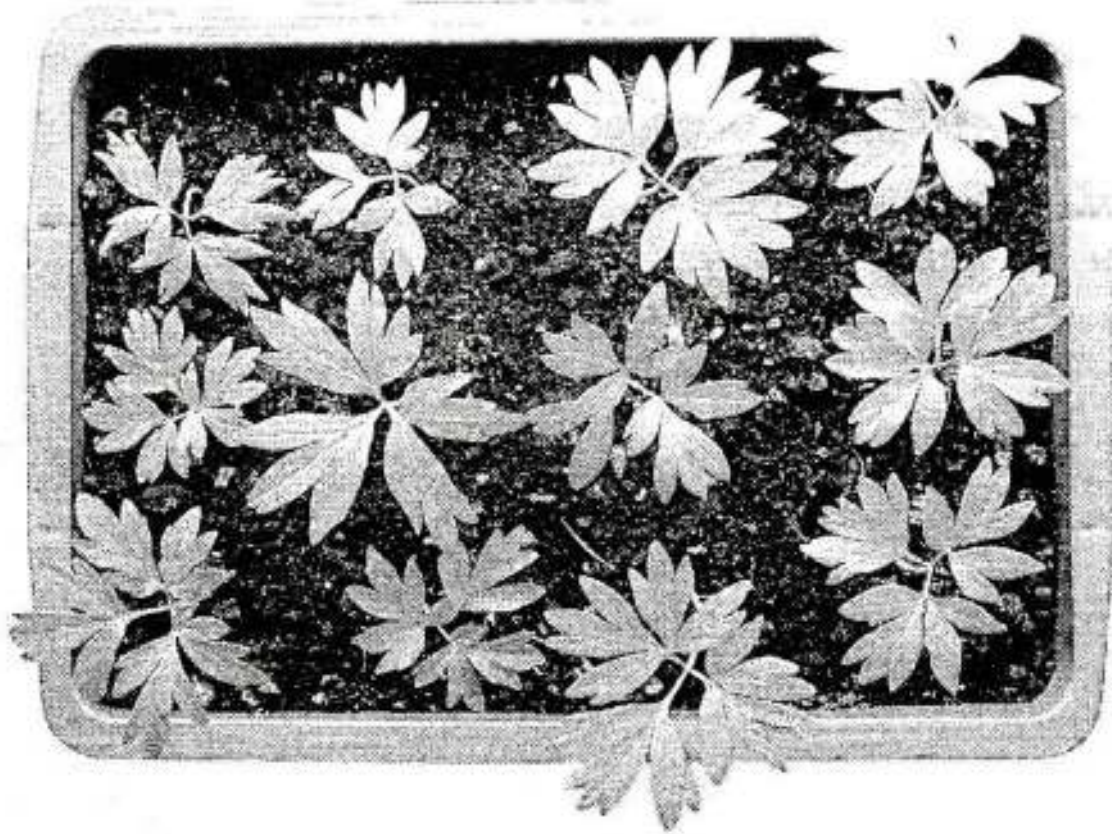


Рис. 2. Перевод растений *Paeonia anomala* L. в условия *ex vitro*

Адаптированные к почвенным условиям растения были готовы к высадке в открытый грунт при температуре 6–8°C. Высаживали в открытый грунт растения, временно закрывая полиэтиленовой пленкой (первую неделю) и притеняли акриловой тканью, в начале мая, когда температура почвы достигла 8°C.

Через месяц акриловую ткань убирали, и дальнейший рост растений продолжался в обычных условиях открытого грунта. При этом необходимо тщательно следить за влажностью почвы, особенно первые две недели. При такой технологии приживаемость растений в открытом грунте составляет 92%. Успешную адаптацию растений мы объясняем созданием оптимальных условий водного и светового режимов, подбором благоприятного температурного режима.

Таким образом, разработанная технология включает асептическое вычленение зародыша, выращивание его на питательной среде Мурасиге и Скуга с половинной концентрацией минеральных солей, выведение из покоя верхушечной почки проростка с применением низких положительных температур и гибберелловой кислоты, а также перевод и выращивание растений в условиях *ex vitro*. Использование метода эмбриокультуры сокращает период прорастания и развития зародышей, что позволяет получить растения *P. anomala* через 1,5–2 месяца после вычленения и культивирования зародышей на искусственной питательной среде вместо 1–2 и более лет при традиционном посеве семян в грунт.



## Список литературы

- Батыгина Т.Б., Бутенко Р.Г. Морфогенетические потенции зародыша покрытосеменных растений (на примере представителей рода *Raeonia*, сем. Раеониaceae) // Бот. журн. 1981. Т.66, №11. С.1531–1547.
- Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М., 1964. 272 с.
- Валишина В.П., Цингер Н.В. Зависимость прорастания семян аконита от размеров зародыша // Бюл. ГБС. 1952. Вып. 13. С.45–47.
- Игнатьева И.П. Онтогенетический морфогенез вегетативных органов пиона уклоняющегося (*Raeonia apomala* L.) // Изв. ТСХА. 1995. Вып.4. С.108–134.
- Калинин В.Ф., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. М., 1980. 488 с.
- Красная книга Республики Башкортостан. Т.1. Редкие и исчезающие виды высших сосудистых растений / Под ред. Е.В. Кучерова. Уфа, 2001. 280 с.
- Мулдашев А.А., Кучеров Е.В., Галеева А.Х. Об охране и рациональном использовании флоры и растительности в северной зоне Башкортостана // Вопросы рационального использования и охраны растений в республике Башкортостан. Уфа, 1998. С.5–18.
- Мулдашев А.А., Галеева А.Х., Маслова Н.В. Проблемы охраны пиона уклоняющегося (*Raeonia apomala* L.) в Республике Башкортостан // Проблемы сохранения биоразнообразия на Южном Урале. Уфа, 2004. С.170–171.
- Николаева М.Г. Покой семян // Физиология семян. М., 1982. С.125–183.
- Николаева М.Г., Разумова М.В., Гладкова В.Н. Справочник по проращиванию покоящихся семян. Л., 1985. 347 с.
- Потцов А.В., Некрасов В.И., Иванова И.А. Очерки по семеноведению. М., 1981. 113 с.
- Сабинин Д.А. Физиология развития растений. М., 1963. 350 с.
- Цингер Н.В. О причинах медленного прорастания семян пионов // Тр. ГБС. 1951. Т.II. С.103–145.

УДК 581.163 + 582.5

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ГАМЕТОФИТНОГО АПОМИКСИСА  
У НЕКОТОРЫХ ВИДОВ СЕМЕЙСТВА ASTERACEAE  
КРАСНОДАРСКОГО КРАЯ И ПРИЛЕГАЮЩИХ ОБЛАСТЕЙ

**И.С. Кочанова, Н.М. Лисицкая, А.С. Кашин**

Саратовский государственный университет им. Н. Г. Чернышевского,  
410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 83; e-mail: kashinas@sgu.ru

Степень изученности цветковых растений в отношении распространения у них гаметофитного апомиксиса по-прежнему остаётся недостаточной. Ранее нами это было показано на примере видов семейства Asteraceae