

*В. В. Соловьева, Н. А. Вечернина,
О. К. Таварткиладзе, А. И. Шмаков*

Регенерация растений *Brachanthemum baranovii* (Krasch. et Poljak) Krasch. в культуре in vitro

Brachanthemum baranovii (Krasch. et Poljak) Krasch. является узколокальным эндемиком Центрального Алтая (сем. Asteraceae), который занесен в Красную книгу РСФСР как уязвимый вид, нуждающийся в государственной охране. Это полукустарничек высотой 15–50 см, растущий в условиях каменистой степи на высоте 850–1200 м над уровнем моря. Растение встречается исключительно на известняковых обнажениях и проявляет чрезвычайную требовательность к характеру субстрата. Узкая стенопопность вида при отсутствии вегетативного размножения и сильной зависимости вызревания семян от погодных условий ограничивает возможности сохранения и распространения *B. baranovii* как в природе, так и в культуре [1, 2, 3]. Опыт первичной интродукции вида показал, что в необычных для себя условиях растения страдали от выпревания при обилии снега, цвели, но не образовывали семян [4]. Вследствие этого продолжительность жизни *B. baranovii* в ботаническом саду составляла 1 вегетационный период, редко 2. Видимо, создание условий, соответствующих экологическим требованиям вида, позволило бы повысить эффективность его интродукции. Однако слабая изученность его биологии и уникальность природных мест обитания сильно затрудняют воссоздание естественных условий существования *B. baranovii*, необходимых для его успешного роста и размножения.

В сложившейся ситуации актуален поиск нетрадиционных подходов к сохранению генофонда растений. Одним из таких подходов является использование методов биотехнологии растений, благодаря которым стало реальным, например, осуществление программ по сохранению генофонда таких редких растений, как шафран [5], лиственница Сукачева [6], морощка приземистая [7]. Однако применять эти методы можно только к таким растениям, для которых разработаны методы регенерации в культуре изолированных органов. Целью нашего исследования явилось изучение условий регенерации *B. baranovii* в культуре in vitro.

Материалы и методы. В качестве первичного материала для введения в культуру in vitro использовали свежесобранные семена

B. baranovii. Поверхностную стерилизацию семян осуществляли по методике, разработанной в лаборатории биотехнологии растений ЮСБС [8]: погружали на 30 мин в 0,2% раствор хлорсодержащего порошка «Беласепт», а затем на 10 мин в 0,1% раствор сулемы. Простерилизованные и промытые семена помещали на питательную среду по прописи Гамборга (В5), дополненную 1 мкМ 6-бензиламинопурина (БАП).

В опытах по изучению влияния генотипа на регенерационную способность *B. baranovii* in vitro использовали побеги четырех генотипов – 1, 2, 3, 4, которые культивировали на среде В₅ с 0,5 мкМ БАП.

В экспериментах по изучению влияния цитокининов (БАП, кинетин (К), 2-изопентениладенин (2-іР), аденин сульфат (АС)) использовали микропобеги генотипа 1.

Работу в асептических условиях, приготовление и стерилизацию питательных сред проводили по общепринятым методикам [9]. рН сред доводили перед автоклавированием до 5,8–5,9. Культивирование проводили при фотопериоде 16 ч и температуре 24±1 °С. Субкультивирование осуществляли через каждые 25–30 суток.

Результаты и их обсуждение. Использование описанного режима стерилизации позволило полностью освободить семена от микрофлоры и получить высокую всхожесть семян (83%). Наблюдения показали, что основная часть семян (10 из 18) проросла на среде с БАП в течение 14 суток, что говорит о достаточной зрелости семян, для проращивания которых не требовалось периода покоя. У полученных проростков удаляли корешки и продолжали культивировать их на той же среде до появления настоящих листьев. В следующем пассаже использовали среду В₅ с 0,5 мкМ БАП, где на эксплантах регенерировали новые побеги в количестве 5–8 шт./эксплант высотой от 0,5 до 1,0 см.

Известно, что для индукции регенерационных процессов в культуре изолированных органов в питательные среды необходимо добавлять стимуляторы роста – цитокинин в определенных сочетаниях с ауксином и/или гибберриллином. В то же время у многих рас-

Таблица 1

Влияние БАП на регенерационную способность побегов *V. baranovii* in vitro (n = 20)

Концентрация, мкМ	Количество побегов, шт./эксплант	Частота регенерации, %	Частота каллусогенеза, %
0	0	0	0
0,5	5,0	100	100
1,0	6,1	100	100
5,0	6,1	100	100
10,0	8,5	100	100
20,0	6,3	100	100
HCP _{0,05}	0,5		

тений (земляника, малина черная и ежевика, сенполия) добиться регенерации побегов можно в присутствии одного стимулятора – цитокинина, воздействие которого определяется его концентрацией и химической природой [10, 11, 12]. Нами было изучено влияние БАП, К, 2-иР (0,5–40,0 мкМ) и АС (5–150 мг/л) на регенерационную способность побегов *V. baranovii*. Полученные результаты представлены в таблицах 1 и 2.

Как следует из данных таблиц 1 и 2, лучшим индуктором побегообразования среди изученных цитокининов являлся БАП. Этот регулятор роста индуцировал образование 5–6 дополнительных побегов у 100% эксплантов, начиная с относительно низких концентраций – 0,5–1,0 мкМ. Этот факт свидетельствует о высоком содержании эндогенных стимуляторов роста, что, как правило, является условием высокой пролиферативной активности эксплан-

тов [13]. Более высокие концентрации БАП (5,0–10,0 мкМ) стимулировали процесс регенерации, вызывая одновременно изменения в морфологии регенерирующих побегов. С повышением концентрации цитокинина междуузлия побегов становились короче, изменялись размеры, форма и количество листьев на побегах.

Наибольшее количество побегов (7–10 шт./эксплант) регенерировало на питательной среде с 10 мкМ БАП. При этом побеги выглядели как пучки видоизмененных листьев с сильно укороченным стеблем. В связи с этим конгломераты видоизмененных побегов дорастивали на среде В₅ со сниженным содержанием БАП – 0,5 мкМ. В ходе культивирования побеги вытягивались в длину и приобретали нормальную морфологию. Установлено, что после дорастивания 73% побегов высотой 8–14 мм были способны к укоренению на безгормональной среде. Видимо, подобное чередование сред позволи-

Таблица 2

Влияние цитокининов на регенерацию побегов *V. baranovii* in vitro (n = 12)

Концентрация цитокинина, мкМ	Количество побегов, шт./эксплант	Средняя высота побегов, мм	Частота регенерации, %	Частота каллусогенеза, %
Кинетин				
0,5	0,4	менее 5	25	46
1,0	3,2	4,9	83	100
2,0	5,8	6,3	100	100
5,0	7,6	8,0	100	100
10,0	7,5	7,9	100	100
20,0	7,2	5,9	100	100
HCP _{0,05}	2,0			
2-иР				
0,5	0,5	5,5	25	100
1,0	1,6	4,8	83	100
2,0	2,5	6,2	100	100
5,0	4,7	9,1	100	100
10,0	6,0	6,3	100	100
20,0	5,2	7,6	100	100
HCP _{0,05}	1,1			
АС (мг/л)				
20	0	–	0	–
50	0	–	0	–
100	0,4	менее 5	33	–

ло выровнять гормональный баланс побегов, нарушенный из-за культивирования на средах с относительно высоким содержанием цитокинина.

Из данных таблицы 2 видно, что при культивировании побегов *V. baranovii* на питательных средах с относительно низким содержанием К и 2-іР (0,5–1,0 мкМ) индуцировать побегообразование у 100% эксплантов не удавалось, что свидетельствует о более слабом по сравнению с БАП влиянии этих регуляторов роста на регенерационный процесс. С повышением концентрации К, 2-іР частота регенерации, интенсивность регенерации и скорость роста побегов возрастали, достигая максимальных значений при 5,0–10,0 мкМ К (коэффициент размножения 1:7 – 8) и 10,0–20,0 мкМ 2-іР (коэффициент размножения 1:5 – 6).

Наихудшие результаты были получены в опытах с АС, который является предшественником в синтезе эндогенных цитокининов (табл. 2). Регенерацию единичных побегов у 33% эксплантов наблюдали только после увеличения концентрации АС до 100–150 мг/л. При более низких концентрациях (5–50 мг/л) вместо побегообразования происходило укоренение 40–70% эксплантов (такое же, как на безгормональной среде), что свидетельствует о слабом использовании АС в биосинтезе эндогенных цитокининов.

По всей видимости, наблюдаемые различия в эффективности воздействия экзогенных цитокининов на регенерацию определяются особенностями их метаболизма в клетках растений. Например, 2-іР при микроразмножении некоторых растений используют в концентрациях, которые на порядок выше применяемых концентраций БАП [14]. Это может быть связано с тем, что 2-іР является природным фитогормоном, поэтому он более интенсивно разрушается в растительных клетках под воздействием окислительных ферментов. Синтетические цитокинины БАП и К не «узнаются» ферментами клеток, сохраняя свою стабильность и активность [15].

При разработке методов регенерации необходимо учитывать, что растения разных генотипов одного вида могут по-разному реагировать на предлагаемые условия культивирования *in vitro*. Поэтому нами было изучено влияние генотипа на регенерационную способность побегов *V. baranovii* (табл. 3).

Как показали наши исследования, коэффициент размножения побегов *V. baranovii* исследуемых генотипов варьировал в небольших пределах – от 4 до 6 шт. на 1 эксплант. Одна-

Таблица 3
Влияние генотипа на регенерацию побегов *V. baranovii* на питательной среде В₃ с 0,5 мкМ БАП (n = 20)

Генотип	Количество побегов, шт./эксплант	Средняя высота побегов, мм
1	5,0	–
2	4,4	7,2
3	5,6	6,0
4	5,4	5,6
НСР _{0,05}	0,6	

ко отмечены индивидуальные особенности каждого из изучаемых генотипов по морфологии регенерирующих побегов и интенсивности каллусогенеза, развивающегося в основании побегов. Разная реакция на включаемые в питательную среду регуляторы роста, по мнению А.В. Высоцкого [10], отражает в какой-то мере эндогенное содержание ростовых веществ, которое является генетически обусловленным признаком вида или сорта. Характер превращения цитокининов в клетке, от которого зависит активность регулятора роста, также детерминирован генетически [15].

Во время цветения *V. baranovii* разных генотипов было установлено, что взрослые растения генотипа 1 отличались от растений других генотипов (с желтыми цветами) тем, что имели белый венчик и сочетали в себе признаки и *V. baranovii*, и *Dendranthema sinuatum* (Ledeb.) Tzvel. Некоторые исследователи считают, что именно такие растения являются настоящими представителями вида *V. baranovii*, связывая происхождение вида с межродовой гибридизацией между *D. sinuatum* и *V. krylovii*, которые входят в состав фитоценозов *V. baranovii* [16]. Если высказанное предположение верно, то клональное размножение растений генотипа 1 становится особенно актуальным, так как *V. baranovii* с белыми цветами встречаются в природе очень редко, а семенное размножение гибридных растений оказывается, как правило, малоэффективным из-за стерильности или недоразвитости их семян.

Таким образом, в ходе наших экспериментов установлено влияние природы и концентрации цитокининов на регенерацию побегов *V. baranovii in vitro*. Сделан вывод о более сильном стимулирующем воздействии БАП на регенерационную способность эксплантов по сравнению с К и 2-іР. Наибольшее количество побегов нормальной морфологии регенерировало в присутствии 0,5–1,0 мкМ БАП – 5–6 шт./эксплант. Сходной реакции можно было добиться и в присутствии других цитокининов. Однако для этого нужно было увеличить их

содержание в питательной среде до 2–5 мкМ. С увеличением концентрации БАП до 5–10 мкМ коэффициент размножения возрастал. Но при этом наблюдали такие нежелательные для клонального размножения эффекты, как видоизменение регенерирующих побегов и образование каллуса в базальной части побегов. Поэтому использование среды с 10 мкМ БАП, на которой экспланты проявляли максимальную регенерационную способность, для размножения *V. baranovii* было возможно только

в случае доращивания конгломератов побегов на среде со сниженным содержанием БАП (0,5 мкМ). Ингибирующими для регенерации и роста побегов концентрациями БАП были 20,0–40,0 мкМ. Достоверных различий по темпам пролиферации побегов между генотипом 1 и генотипами 2, 3 и 4 обнаружено не было, что позволяет считать среды для пролиферации побегов универсальными, пригодными для вегетативного размножения семенного потомства растений вида *V. baranovii* *in vitro*.

Литература

1. Красная книга РСФСР. Растения: Энциклопедия / Отв. ред. А.Л. Тахтаджян и др. М., 1988.
2. Верещагина И.В. Встреча с зеленым другом. Барнаул, 1996.
3. Пяк А.И. Особенности высотного распространения *Brachanthemum baranovii* (Asteraceae) в связи с плейстоценовыми событиями на Алтае // Бот. жур. СПб., 1999. Т. 84. №3.
4. Семенова Г.П. Интродукция и охрана редких и исчезающих видов флоры Сибири // Сибирский экологический журнал. Новосибирск, 1997. Т. 4. №1.
5. Комарова Э.Н., Миляева Э.Л., Ахундова Д.Д. Использование метода культуры ткани *in vitro* в целях размножения редких и исчезающих видов растений на примере шафрана // Флора и растит. Сибири и Дальнего Востока: Тез. докл. конф., посвящ. памяти Л.М. Черепина. Красноярск, 1991.
6. Путенихин В.П. Культура изолированных почек листовницы Сукачева // Биология культивируемых клеток и биотехнология. М., 1991.
7. Яцына А.А., Концевая И.И. Клональное микроразмножение морозники приземистой (*Rubus chamaemorus* L.) // Биология клеток растений *in vitro*, биотехнология и сохранение генофонда: Тез. докл. VII Междунар. конф. М., 1997.
8. Вечернина Н.А., Таврткиладзе О.К., Шмаков А.И. К проблеме сохранения *Brachanthemum baranovii* (Krasch. et Poljak) Krasch.: введение в культуру *in vitro* // Известия АГУ. Барнаул, 1998. Вып. 1.
9. Калинина Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев, 1980.
10. Высоцкий В.А. Культура изолированных тканей и органов плодовых растений: оздоровление и микрклональное размножение // Сельскохозяйственная биология. М., 1983. №7.
11. Упадъшев М.Т., Высоцкий В.А. Размножение ежевики и малины черной методом культуры тканей // Садоводство и виноградарство. М., 1991. №6.
12. Майстренко Г.Г., Гордиенко Н.Я., Тищенко С.Ю. Морфогенез сенполий в культуре *in vitro* при экзогенном внесении гормонов // Биология клеток растений *in vitro*, биотехнология и сохранение генофонда: Тез. докл. VII Междунар. конф. М., 1997.
13. Байбурина Р.К. Микрклональное размножение взрослых гибридных деревьев *Betula pendula* Roth. var. *carelica* Merckl // Раст. ресурсы. М., 1998. Т. 34. Вып. 2.
14. Высоцкий В.А. Клональное микроразмножение растений // Культура клеток растений и биотехнология. М., 1986.
15. Основы химической регуляции роста и продуктивности растений / Г.С. Муромцев, Д.И. Чкаников, О.Н. Кулаева и др. М., 1987.
16. Смирнов С.В. О гибридном происхождении *Brachanthemum baranovii* (Krasch. et Poljak) Krasch. (Asteraceae) // Тезисы VII Молодежной конференции ботаников в Санкт-Петербурге (15–19 мая 2000). СПб., 2000.

