

СОХРАНЕНИЕ РЕДКОГО ВИДА *BELLEVALIA SARMATICA* (GEORGI) WORONOW КУЛЬТУРЫ *IN VITRO*

А.И. Кутковски-Муштук, Н.Г. Чоркина, М.Г. Лозинский

Национальный Ботанический сад (Институт) Академии Наук Молдовы, Кишинев, Молдова, alinacutcovschi@mail.ru

Аннотация: *Bellevalia sarmatica* (Georgi) Woronow луковичное степное декоративное растение, включенное в Красную книгу Молдовы, охраняемое государством. Метод культивирования *in vitro* позволяет долговременно сохранять и культивировать в особых условиях со строго установленными параметрами на искусственно приготовленных питательных средах. Одним из основных условий успешного микро-клонирования является стерилизация растения и питательных сред.

Ключевые слова: *Bellevalia sarmatica*, *in vitro*, питательные среды

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1295-1298

Одной из актуальных проблем современной ботаники является разработка стратегии сохранения разнообразия видов растений, находящихся под угрозой исчезновения.

Наиболее успешной стратегией долгосрочной охраны многообразия является щита и сохранение фитоценозов и популяций спонтанной флоры – сохранение *in situ*. Но многие редкие виды достигли предела, и только сохранение *in situ* не решает проблемы защиты от все более интенсивных антропогенных факторов.

Одним из наиболее успешных методов сохранения видов от вымирания является поддержание и умножение таксона в искусственных условиях, соответствующих тем, которые в природе. Интродукция редких и исчезающих видов растений *ex situ* обеспечивает сохранение и изучение биологии их развития, различные виды размножения и культивирование вегетативно размножающегося биологического материала, эти моменты являются основой для репатриации этих видов в экологические ниши естественного произрастания видов. Сохранение интактных ценотропных фитопопуляций и генетически биологического разнообразия видов, ботанические сады играют огромную роль в увеличении количества таксонов.

Метод культивирования *in vitro* позволяет долговременно сохранять и культивировать в особых условиях со строго установленными параметрами на искусственно приготовленных питательных средах, на которые инокулируются клетки, ткани, меристемы и т.д. Метод культивирования тканей позволяет нам получить посадочный материал за относительно короткое время и в ограниченном пространстве.

Род *Bellevalia* включает около 50 видов растений. *Bellevalia sarmatica* (Georgi) Woronow луковичное степное декоративное растение, включенное в Красную книгу Молдовы, охраняемое государством. Не так давно степные районы занимали 2/3 всей территории Молдовы, в то время как естественные степные популяции сохранялись как ограниченные территории и охраняемые территории государства.

Bellevalia многолетний луковичный поликарпик. Луковица овальная, 2–4 см в диаметре. Стебель безлистный, утолщённый, в верхней половине с соцветием, 15–30 см высотой, голый. Прикорневые листья в числе 3–7 ремневидные, мясистые, книзу суженные. Соцветие кистевидное; цветоножки при цветах прямостоячие, отклонённые, в 4–8 раз длиннее цветов, при плодах горизонтально отклонённые, сильно удлиняющиеся до 12 см длиной. Околоцветник колокольчатый, 8–9 мм длиной, серовато-бурый, доли его прямые, овально ланцетные, короче трубки в 3 раза, желтовато-белые. Плод – продолговатая коробочка с 2–8 (10) семенами (рис. 1).



Рис. 1. *Bellevalia sarmatica* (Georgi).

Использование культур *in vitro* является де-факто методом сохранения, представляющим собой жизнеспособную и эффективную альтернативу для защиты и сохранения генетического фона редких и исчезающих видов.

Одним из основных условий успешного микро-клонирования является стерилизация растения. Экспланты, взятые с донорского растения (луковица, фрагменты луковиц), тщательно промывались в водопроводной воде.

Сначала промытые проточной водой части чешуй выдерживали в растворе перманганата калия (0,05%) с Tween-20 в течение 20 минут, далее промывали трехкратно дистиллированной водой и переносили в бокс, под ламинар, в основной дезинфицирующий раствор. Поверхностную стерилизацию проводили 70%-ым раствором спирта в течение 30 секунд. Потом выдерживали в растворе диацета 0,3% (5-7 минут), после каждой процедуры материал трижды промывался дистиллированной водой. Время экспозиции и оптимальную концентрацию диацета определили экспериментально.

После стерилизации растительного материала эксплантаты инокулировали на питательную среду в большие или маленькие баночки в соответствии с размером взятых фрагментов, так чтобы неформованные луковицы имели достаточное пространство для развития.

Для изучения реактивности этого вида в *in vitro* было проверено несколько вариантов культуральной среды, все из которых имели макро- и микроэлементы в соответствии с MS (Murashige-Scoog, 1962).

При подготовке питательных сред pH доводили до 5,9-6,0, после чего их автоклавировали в течение 15 минут при 120 °С. Первичные экспланты культивировали в вегетационной комнате в темноте при 20 °С. Для введения в культуру *in vitro* в первом пассаже мы использовали безгормональную питательную среду по прописи Murashige, Skoog (1962) – (MS). После их адаптации в культуре и отсева инфицированных и некротированных эксплантов, через 2 недели, во втором пассаже были протестированы среды, провоцирующие интенсивный геммогенез с различными концентрациями цитокининов. Как известно, цитокинины способствуют пробуждению и росту адвентивных почек, луковичек, поэтому было исследовано влияние трёх типов цитокининов в концентрациях от 0,5 до 10 мг/л в сочетании с ауксинами в концентрациях от 0,1 до 0,25 мг/л. Максимальные показатели размножения, полученные на средах с исследуемыми гормонами, отображены в таблице.

Таблица.

Интенсивность регенерации микролуковичек и преобладающий тип морфогенеза у эксплантов чешуй редких видов в зависимости от регуляторов роста и их концентраций в питательной среде

Вид	Вариант среды MS	Цитокинины/ Ауксины	Концентрация гормонов, мг/л
<i>Bellevalia sarmatica</i> (Georgi) Woronov	B1	БАП/ α -НУК	0,5/0,25
	B2	кинетин/ ИУК	0,2/0,1
	B3	2iP/ ИУК	0,5/0,2

Введение в культуру *in vitro* проводили на питательных средах с различными концентрациями фитогормонов. Для инициирования культуры были испытаны низкие средние значения ауксина и цитокинина (варианты В-1, В-2, В-3). Два варианта среды (В-6, В-9) были протестированы для быстрого развития луковиц и образования корней.

В качестве источника углерода использовали сахарозу. Все культуральные среды затвердевали при концентрации 6 г/л агара, рН среды устанавливали до 5,8 перед автоклавированием.



Рис. 2. *Bellevalia sarmatica* (Georgi) в *in vitro*.

Первые очевидные прогнозы были сделаны через 4 недели, когда было обнаружено, что большое количество эксплантов образовали небольшие выпуклости, похожие на луковицы 0,5 мм (рис. 2). Тестирование и экспериментальный анализ среды показали оптимальную среду для инициирования культуры: микро- и макроэлементы по Murashige, Skoog (1962), добавленные с гормональной концентрацией 0,5 мг/л (БАП) и 0,25 мг/л - (α -НУК). После 6 недель инкубации на этой среде получали 10-12 луковиц/эксплантатов с диаметром 3,0 мм. На среде В-2, с меньшей концентрацией БАП, образовалось меньшее количество луковиц (7-9 луковиц/эксплантов). Регенерация также имела место на питательной среде с кинетином (В-2), но с более низким процентом (4-6 луковиц / эксплант). Первые луковицы *de novo* на этой среде наблюдались через 8 недель. Это свидетельствует о том, что присутствие БАП

способствует более высокой активности и поддержанию роста изолированных тканей и индукции органогенеза по сравнению с вариантами обогащенными кинетином. Полученные луковицы переносили в дополнительные среды с более высокой концентрацией фитогормонов и сахарозы. Увеличение концентрации сахарозы в среде заставляло луковицы расти быстрее, а на этих средах наиболее крупные луковицы с диаметром 14-17 мм. В течение 2 недель на средах В-6, В-9 началось формирование корневой системы и произошло формирование листьев. Растения, полученные на средах В-6 и В-9, не имели больших различий в размерах. Однако наиболее оптимальной средой на этой стадии является среда В-6 с концентрацией 60 г/л сахарозы. Использование различных концентраций фитогормонов позволяет руководить и ускорять условия переноса растений *de novo* в условиях *ex vitro*. Высокие концентрации сахарозы вызывают более быстрый рост эксплантатов, что позволяет значительно сократить период созревания луковиц и ускорить фазы цветения на 1,5-2,0 года.

Неформованные луковицы *in vitro* проходят несколько этапов акклиматизации и успешно переносятся в условия *ex vitro*. Первоначально они были посажены в перлит и торф (1:1). В течение первых 14 дней культивирования влажность воздуха поддерживалась дисперсией воды – туманом для этого использовали полиэтиленовые камеры. Все растения (100%) адаптировались, продолжали расти и развиваться.

CONSERVATION OF THE RARE KIND OF *BELLEVALIA SARMATICA* (GEORGI) WORONOW CULTURE *IN VITRO*

A. Cutcovschi-Mustuc, N.Ciorchina, M. Lozinschi

National Botanical Garden (Institute) of Republic of Moldova, Chisinau, Republic of Moldova, alinacutcovschi@mail.ru

Abstract. *Bellevalia sarmatica* (Georgi) Woronov bulbous steppe ornamental plant, included in the Red Book of Moldova, protected by the state. The method of *in vitro* cultivation allows long-term preservation and cultivation under special conditions with strictly established parameters on artificially prepared nutrient medium. One of the main conditions for successful micro-cloning is sterilization of the plant and nutrient medium.

Keywords: *Bellevalia sarmatica*, *in vitro*, nutrient medium