

Масленников Андрей Викторович

канд. биол. наук, доцент, профессор

Дмитриев Кирилл Олегович

студент

Торутанов Павел Сергеевич

лаборант-исследователь

ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный
педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

г. Ульяновск, Ульяновская область

DOI 10.31483/r-111798

**РЕДКИЙ ОХРАНЯЕМЫЙ ВИД КОПЕЕЧНИК КРУПНОЦВЕТКОВЫЙ
(HEDYSARUM GRANDIFLORUM PALL.)
КАК ОБЪЕКТ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ**

Аннотация: в статье исследуются подходы к разработке методики микроклонального размножения редкого и охраняемого вида Ульяновской области копеечника крупноцветкового (*Hedysarum grandiflorum* Pall.) *in vitro*. Работа по отработке методики получения каллусной культуры копеечника начата в 2023 году. В 2023 году из семенных эксплантов *Hedysarum grandiflorum* Pall. были получены каллусные культуры.

Ключевые слова: культура клеток, каллусная культура, биотехнология, микроклонирование, редкие и охраняемые виды, *Hedysarum grandiflorum* Pall.

Восстановление численности популяций редких и охраняемых видов растений в природе актуально, но часто попытки введения их в культуру затруднены по целой совокупности причин. Следовательно, для уязвимых и хозяйственно перспективных видов растений (с точки зрения их практической значимости для человека), нужно искать возможности их массового размножения для возвращения в естественные экосистемы. Одними из способов решения задачи могут стать методы биотехнологии, позволяющие провести микроклонирование –

размножение редких видов растений и видов, находящихся под угрозой вымирания в культуре *in vitro* [1, с. 28; 2, с. 24; 7, с. 839; 9, с. 14].

Представление о важности сохранения биологического разнообразия привело к тому, что в последние годы развиваются направления исследований, которые ведут к сохранению численности редких и уязвимых видов, формируются банки-депозитарии, помогающие сберечь биоразнообразие регионов и создать новые способы разумного и безопасного для природных видов использования биологического материала [3, с. 69; 8, с. 11].

Копеечник крупноцветковый (*Hedysarum grandiflorum* Pall.) – редкий и уязвимый вид, сокращающий свою численность, в настоящий момент занесен в Красную книгу Ульяновской области [4, с. 114] и Красные книги соседних регионов. В лабораторных условиях он неплохо размножается обычными способами: семена имеют хорошую всхожесть, но проростки часто могут быть поражены грибковыми и вирусными заболеваниями. Наши исследования показали, что для его эффективного размножения, в качестве перспективного метода, можно использовать метод микроклонального размножения.

Актуальность проведенных исследований заключается в том, что до настоящего времени из-за редкости копеечника крупноцветкового, до сих пор не предпринималось попыток провести его микроклональное размножение, вследствие этого, полученные нами результаты по его клонированию – первый шаг по размножению этого вида *in vitro*.

Опыт микроклонального размножения и культивирования редких и охраняемых растений нашего региона скабиозы исетской (*Scabiosa isetensis* L.) [6, с. 36] и валерианы русской (*Valeriana rossica* P.) [5, с. 53] помог подобрать условия культивирования и выращивания эксплантов *Hedysarum grandiflorum* Pall. на твердых агаризованных средах.

Отработка протокола микроклонального размножения *in vitro* редкого и охраняемого вида *Hedysarum grandiflorum* Pall. показала, что семена, посаженные в условиях климатической камеры при температуре +26°C и шестнадцатичасовом световом дне на твердой агаризованной питательной безгормональ-

ной среде Мурасиге-Скуга (MS), прорастают через 6 суток при +26°C на свету, что показывает возможность выращивания и размножения данного редкого и ценного вида в условиях *in vitro* (таблица 1).

Таблица 1

Состав безгормональной питательной среды Мурасиге-Скуга (MS), используемой при культивировании *in vitro*

Компоненты среды	Формула	Концентрация компонента (мг/л)
Макросоли		
Нитрат аммония	NH_4NO_3	1650
Хлорид кальция	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
Сульфат магния	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
Дигидроортофосфат калия	KH_2PO_4	170
Нитрат калия	KNO_3	1900
Микросоли		
Борная кислота	H_3BO_3	6,2
Хлорид кобальта (II)	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
Сульфат меди (II)	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
Сульфат марганца (II)	$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	22,3
Йодид калия	KI	0,83
Молибдат натрия	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
Сульфат цинка	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6
Раствор хелатного железа		
Натрий-железная соль этилендиаминтетрауксусной кислоты	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $\text{NaEDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5
Витамины и органические вещества		
Мио-инозитол (мезоинозит)	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	100
Никотиновая кислота (витамин PP)	$\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$	0,5
Пиридоксин*HCl (витамин B ₆)	$\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_3$	0,5
Тиамин*HCl (витамин B ₁)	$\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{OS}$	0,1
Глицин	$\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$	2
Сахароза	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	30000

Сеянцы копеечника крупноцветкового, выращенные на безгормональной среде Мурасиге-Скуга растут нормально, образуя полноценные побеговую и корневую системы, что говорит о возможности использования их для получения стеблевых, листовых и почечных стерильных эксплантов для микроклонального размножения (таблица 2). В процессе изучения выяснено, что главным условием, вследствие которого у копеечника крупноцветкового происходит дедифференцировка тканей и превращение их в каллус является добавление

в питательную среду фитогормонов: ауксинов и цитокининов в оптимальной концентрации: ИУК – 0,5 мг/л и кинетина – 1 мг/л.

Таблица 2

Культивирование семян копеечника крупноцветкового
на безгормональной питательной среде Мурасиге-Скуга (MS)

Неделя наблюдения	Общее количество посаженных семян (шт.)	Количество проросших семян (шт.)	Количество проросших семян (в %)
0-ая (посев)	36	0	0
1-ая	36	1	2,8
2-ая	36	2	5,6
3-ая	36	12	33,3
4-ая	36	14	38,9
5-ая	36	15	41,7
6-ая	36	19	52,8
7-ая	36	21	58,3
8-ая	36	21	58,3
9-ая	36	22	61,1
10-ая	36	23	63,9
11-ая	36	23	63,9
12-ая	36	23	63,9
13-ая	36	24	66,7
14-ая	36	24	66,7
15-ая	36	24	66,7
16-ая	36	25	69,4

В ходе оптимизации протокола культивирования и получения регенерантов из клеток изолированных тканей органов копеечника крупноцветкового (*Hedysarum grandiflorum* Pall.) в стерильных условиях выявлено, что наиболее успешно идет развитие каллусов, отобранных с корневой шейки. В среднем время их полного развития составляет 90–100 суток и микрклональное размножение каллусными эксплантами можно проводить спустя 40–50 дней развития каллусов.

Использование каллусных эксплантов показало, что выращивание копеечника крупноцветкового методами клонального микроразмножения *in vitro* достаточно перспективно и увеличивает возможности по восстановлению его популяций в степных экосистемах Приволжской возвышенности.

Список литературы

1. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе / Р.Г. Бутенко. – М.: ФБК-Пресс, 1999. – 160 с.
2. Дитченко Т.И. Культура клеток, тканей и органов растений / Т.И. Дитченко. – Минск: БГУ, 2007. – 102 с. EDN TKVDIB
3. Егорова Т.А. Основы биотехнологии: учеб. пособие для вузов по спец. «Биология» / Т.А. Егорова, С.М. Клунова. – М.: Академия, 2003. – 207 с. EDN QNDNQX
4. Красная книга Ульяновской области / под науч. ред. Е.А. Артемьевой, А.В. Масленникова, М.В. Корепова; Правительство Ульяновской области. – М.: Буки Веди, 2015. – 550 с.
5. Масленников А.В. Современное состояние популяций редкого охраняемого ресурсно-значимого вида – валерианы русской (*Valeriana rossica* P.Smirn.) и возможности её клонального микроразмножения *in vitro* / А.В. Масленников, Л.А. Масленникова // Природа Симбирского Поволжья: сб. научн. трудов. Вып. 18. – Ульяновск, 2017. – С. 50–54. – EDN XWVFFJ
6. Масленников А.В. Редкий охраняемый вид скабиоза исетская (*Scabiosa isetensis* L.) как объект клеточных технологий / А.В. Масленников, С.С. Сорокина, С.С. Филиппова // Фундаментальные и прикладные исследования по приоритетным направлениям биоэкологии и биотехнологии: материалы Всерос. науч. конф. – Чебоксары: Среда, 2019. – С. 34 – 37. EDN SDUDHU
7. Носов А.М. Культура клеток высших растений – уникальная система, модель, инструмент / А.М. Носов // Физиология растений. – 1999. – С. 837–844.
8. Носов А.М. Использование клеточных технологий для промышленного получения биологически активных веществ растительного происхождения / А.М. Носов // Биотехнология. – 2010. – Т. 5. – С. 8–28. EDN ONHFFF
9. Сельскохозяйственная биотехнология / под ред. В.С. Шевелухи. – М., 2003. – 416 с.