

УДК 582.923.6.582.675.3.582.632.1

СОХРАНЕНИЕ IN VITRO БИОРАЗНООБРАЗИЯ ВИДОВ СЕМЕЙСТВ ASCLEPIADACEAE, BERBERIDACEAE И BETULACEAE

Елена Шиша, Валерия Белокурова, Иосиф Сікура, Николай Кучук

Збереження in vitro біорізноманіття видів родин Asclepiadaceae, Berberidaceae та Betulaceae.-О. Шиша, В. Белокурова, І. Сікура, М. Кучук- Наведені матеріали з питань збереження ex situ – in vitro представників 3 родин, 7 родів та 22 видів різного ботаніко-географічного походження та екологічної природи.

Ключові слова: банк in vitro, Asclepiadaceae, Berberidaceae, Betulaceae.

Адреса: Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, відділ біотехнології і геноміки; вул. Заболотного, 148, Київ, ДСП-22, Україна, e-mail: elenashysha@mail.ru

Conservation in vitro biodiversity of species of the Amaranthaceae, Amaryllidaceae and Apocynaceae families.-

E. Shysha, V. Belokurova, J. Szikura, N. Kuchuk-The results of preservation ex situ – in vitro of the 3 families, 7 genera and 22 species of different botanic-geographical origin and ecological nature are presented.

Keywords: bank of in vitro, Asclepiadaceae, Berberidaceae, Betulaceae.

of different botanic-geographical origin and ecological nature are presented

Address: Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of NAS of Ukraine, department of biotechnology and genomic; street of Zabolotnoho, 148, Kiev, DSP-22, Ukraine, e-mail: elenashysha@mail.ru

Вступление

В наши дни особенно остро стоит вопрос охраны растительного мира и его генетического (биологического) разнообразия. Сегодня эта проблема стала уже планетарной, поскольку существование не только человека, но и жизни на Земле невозможны без растений.

Однако, технический прогресс, урбанизация, безмерное, необдуманное, но и не всегда обоснованное использование химических веществ - во всем мире оказывает значительное, порой и губительное влияние на окружающую среду и, в том числе и на растительность. Не только флора Европы, но и флора всего мира за предыдущие 50 лет и особенно за последние годы существенно обеднела. Это наиболее ощутимо в экономически развитых странах Европы. Например, в Великобритании из 1500 видов природной флоры по данным за 1971 год исчезло 20 видов, а по данным за 1977 год уже 26 видов. Из флоры Голландии, насчитывающей 1300 видов, исчезло 55; 429 видов находятся под угрозой исчезновения. Из флоры Бельгии, насчитывающей также около 1300 видов, исчезло 59; 72 находятся под угрозой исчезновения. Из флоры Германии, насчитывающей 1750 видов, исчезло 459 видов (26 %). Из флоры Венгрии (3686 видов) исчезло 19, а 420 находятся под угрозой исчезновения. В настоящее время флоры Болгарии, Польши, Румынии нуждаются в охране 95, 38, 119 видов

соответственно. Только в системе карпатских гор в настоящее время, по нашим подсчетам, нуждаются в охране и сохранении их биологического разнообразия более 1200 видов [1] (Сікура и др., 1977). Во флоре Украины (в различных ее регионах), по нашим подсчетам, нуждаются в охране около 1600 видов.

Существуют различные методы охраны, сохранения биоразнообразия. Самый лучший из них – это в естественной среде обитания вида (in situ), но опыт показывает, что по различным причинам в природе невозможно сохранить тот или иной вид. В различных уголках Земли существуют ботанические сады, где издавна создаются живые коллекции полезных растений различных групп. Кроме того, во многих ботанических садах занимаются сохранением генетического и биологического разнообразия флоры – этот метод получил название ex situ, то есть вне ареала вида, но в естественных почвенно-климатических условиях конкретного ботанического сада, то есть in vivo.

В последние годы стали широко использовать как вспомогательный метод – сохранение вида в замкнутом пространстве на искусственной питательной среде в стерильных условиях и этот метод называется in vitro, но тоже вне ареала вида – ex situ.

Материал и методика исследований

В данном сообщении мы рассмотрим результаты нашей работы по сохранению *in vitro* биоразнообразия представителей 3-х семейств, 7 родов и 22 видов различного ботанико-географического происхождения и экологической природы.

Исходным материалом для введения в культуру *in vitro* ряда представителей вышеуказанных семейств служили семена.

Стерилизацию семян проводили в несколько этапов в стеклянной емкости размером от 50 до 200 мл, то есть в зависимости от количества семян. Затем, в зависимости от тектоморфологической характеристики семян, их переносили от 5 до 30 минут в 25 % коммерческий отбеливатель с добавлением 2 капель Tween для смачивания семян и помещали на шейкер для взбалтывания. Потом семена трижды по 1 минуте и дважды по 20 минут промывали в стерильной дистиллированной воде, после чего помещали на агаризованную безгормональную питательную среду, содержащую соли по прописи Murashige and Skoog для проращивания.

Через 5-7 дней после появления проростков их делили на сегменты и высаживали на питательные среды, обогащенные регуляторами роста цитокининовой и ауксиновой природы для индукции побегов или получения каллусных тканей. Основой всех сред также являлись минеральные соли по Мурасиге и Скугу, которые содержали необходимые для роста растений макро- (N, P, K, Ca, Mg, S) и микроэлементы (Fe, B, Mn, Zn, Cu, Na, Co, Mo, Cl, Ni). Кроме того, в их состав входили витамины, аминокислоты и регуляторы роста растений.

Обсуждение материала

Семейство *Asclepiadaceae* – очень близкое к Кутровым (*Aprocynaceae*) и по своему сходству по географическому распространению. Для примера скажем, что 250 родов и 2000 видов этого семейства распространены за пределами тропиков, исключая Южную Африку, Арктику, часть северной лесной зоны и Новую Зеландию, где Ластовневые полностью отсутствуют [2]. Ниже представленные виды были успешно введены в культуру *in vitro*.

***Asclepias curassavica* Lour.** (*Tachocarpus wightianus*) – декоративный тропический кустарник, который распространен на Гавайях [2] (рис. 1). В коллекции нашего института этот вид представлен в виде каллусной культуры, которая хранится на среде 4X. С интервалом 5-6 недель культура каллуса пересаживается на свежую среду 4X (рис.2).



Рис. 1. *A. curassavica* тропический декоративный кустарник

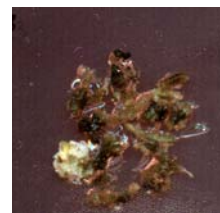


Рис. 2. *A. curassavica*, каллус

***Vincetoxicum fuscatum* Rechb.** – этот вид распространен в Восточной Европе и Малой Азии. Введен в культуру *in vitro* в 1993 г. и сохраняется в виде каллусной культуры на питательной среде К. Каллус плотный, желтовато-зеленый (рис. 3).

***Vincetoxicum scandens* Somm. et Levier.** (*Cynanchum scandens* Kuzn.) – введен в культуру *in vitro* в 1995 г. и хранится в виде каллусной культуры на среде 4X. Каллус рыхлый, беловато-зеленый (рис. 4).



Рис. 3 Каллус *V. fuscatum*

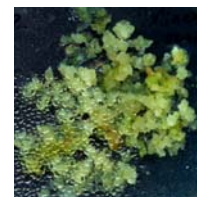


Рис. 4 Каллус *V. scandens*

Семейство *Berberidaceae*. (порядок *Ranunculales*). Это семейство близкородственное семейству *Ranunculaceae*, содержащее древесные и травянистые виды. Пыльники расположены 3-мя или реже, 2-я кругами. Завязь верхняя и состоит из одного плодолостика, которая после оплодотворения превращается в ягоду. Как представителя семейства, можно выделить род *Berberis*, виды которого декоративные, лекарственные, красители, промежуточный хозяин ржавчинных грибов [2].

***Berberis angulosa* Wall.** – это редкий гималайский вид с крупными цветками. Особенно декоративен осенью, из-за окраски листьев. Плоды съедобны и не такие кислые как у барбариса обыкновенного [3]. В коллекции института с 1993 г. Сохраняется в виде каллуса на питательных средах LS и 4X.

Berberis candidula C.K.Schneider – кустарник до 80 см высотой, листья сверху блестящие, снизу сизоватые, плоды пурпурно-красные. Декоративный вид [4]. Введен в культуру *in vitro* в 1993 г. Из проростков семян был индуцирован каллус, который поддерживается на питательной среде К (рис. 5).

Berberis carminea “Buccaneer” введен в культуру *in vitro* в 1997 г., на питательной среде 4X был индуцирован плотный, серовато-коричневый каллус с зачатками регенерации, жизнеспособность, которого поддерживается на вышеуказанной среде (рис. 6).

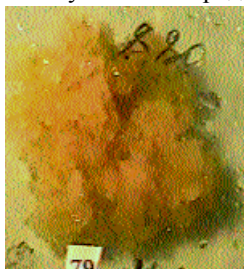


Рис. 5. Каллус *Berberis candidula*



Рис. 6. Каллус и регенерация *B. carminea*

Berberis crataegina DC. – лекарственное растение – противовоспалительное имеющее свойства анальгетика. В культуре *in vitro* с 1997 г. Каллус плотный, темно-зеленый содержится на среде 4X (рис. 7).

Berberis henryana C.K. Schneider – декоративное растение. Испытано на Буковине в Черновицком ботаническом саду [3]. В культуре *in vitro* с 1993 г. хранится в виде каллусной культуры желтовато-белого цвета на питательной среде К (рис. 8).



Рис. 7. Каллус *B. crataegina*

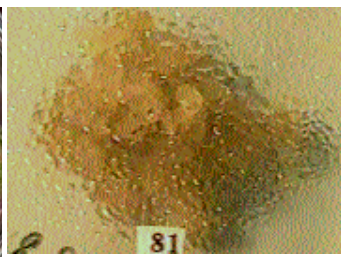


Рис. 8. Каллус *B. henryana*

Berberis prattii C.K. Schneider – введен в культуру *in vitro* в 1993 г. и сохраняется в виде каллуса на питательных средах 4X, LS.

Berberis serrata Schneid. – введен в культуру *in vitro* в 1993 г. На питательной среде 4X был получен рыхлый светло-желтого цвета каллус (рис. 9).

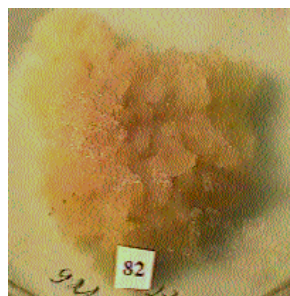


Рис. 9. Каллус *B. serrata*



Рис. 10. Плоды *M. aquifolium*

Mahonia aquifolium Nutt. (*Berberis aquifolium*). Декоративный кустарник до 1 м высотой. В природе образует заросли, располагаясь благодаря корневым отпрыскам. Цветки желтые. Ягоды синева-черные с сизым восковым налетом (рис. 10). Распространен на Западе Северной Америки [3]. В коллекции института с 1996 г. в виде каллусной культуры, поддерживается на питательной среде 4X. Каллус плотный, темно-зеленый (рис. 11).

Nandina domestica Thunb. Вечнозеленое дерево до 6 м высотой, иногда приобретает форму кустарника. Листья триждынепарноперистые, 30-40 см длиной, осенью приобретают красную окраску. Цветки белые, ягоды ярко-красные. Выращивают в тропических районах в качестве декоративного растения. Распространен в Китае и Японии [4]. Введен в культуру *in vitro* в 1993 г. Инициация каллуса происходила на питательной среде 4X. Каллус ярко-зеленый (рис. 12).

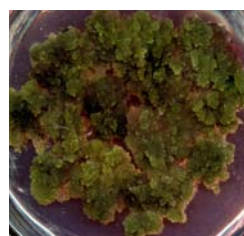


Рис. 11. Каллус *M. aquifolium*

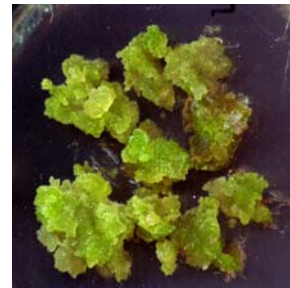


Рис. 12. Каллус *N. domestica*

Семейство *Betulaceae* (порядок *Fagales*). Представители этого семейства деревья и кустарники с поочередным расположением листьев. Пыльники на верхушке вильчато разветвлены. Плод – орешек, голый или окутан мягким покрывалом листового происхождения.

На основании проведенных молекулярных исследований, подтверждено раннее разделение семейства на два подсемейства, которое основывалось на морфологических признаках:

-*Betuloideae* – мужские цветки образуют соцветие из 3-х цветков, орешек расположен в пазухах одревесневших прицветников. Сюда относятся роды: *Alnus* [*A. glutinosa*, *A. (Duschekia) viridis*]; на корнях видов рода *Ольха*

находятся лучистые грибы, которые способны фиксировать азот из воздуха. Интересно, что виды рода Ольха в Андах являются лесообразующими видами.

-*Coryloideae* – мужские цветки одинокие, орешки окутаны листообразным покрывалом. К этому подсемейству относятся роды: *Corylus*, *Carpinus*, *Ostrya* [2].

Род *Betula* включает более 500 (525) таксонов. Виды рода распространены в Европе, Азии, Северной Америке, Восточной Индии, Северной Африке.

Betula cordata Loisel. (*Alnus cordifolia*) дерево до 15 м высотой. Молодые ветки клейкие, опушенные, красновато-коричневые. Листья округлые или широкоовальные, до 10 см длиной, основание сердцевидное. Распространен в Италии, на Корсике [4]. В коллекции института с 1995 г. Инициация каллуса произошла на среде 4X. Затем на среде MS с добавлением 2 мг/л БАП удалось инициировать образование побегов (рис. 13).

Betula costata Trautv. (*B. ulmifolia* Sieb. et Zucc. var. *costata* Regel) – дерево до 30 м высотой, с блестящей светло-желтой или желтовато-коричневой корой, расслаивающейся на тонкие полоски. Распространен на Дальнем Востоке, Китае, Северной Корее. Лесообразующий вид; декоративен [3]. Введен в культуру *in vitro* в 1995 г. На питательной среде 4X произошло образование зеленовато-белого каллуса (рис. 14).

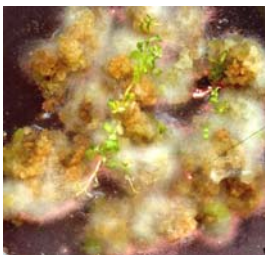


Рис. 13. Каллус и регенерация *B. cordata*

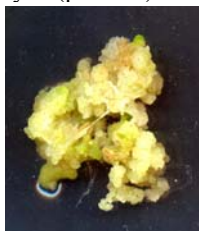


Рис. 14. Каллус *B. costata*

Betula davurica Pall. (*B. maackii* Rupr.) – дерево до 20 м высотой. Считается индикатором отсутствия болота и пригодности почвы для земледелия. Распространен в Восточной Сибири и на Дальнем Востоке. Декоративное дерево. Культивируется и в Украине [3]. Введен в культуру *in vitro* в 1995 г. В коллекции сохраняется в виде каллуса. Каллус плотный, кремового цвета (рис. 15).

Betula ermani Cham. – береза Эрмана или каменная. Дерево до 20 м высотой, кора часто висит лохмотьями, лист до 15 см длиной. Твердая древесина применяется для поделок; используется в парковых насаждениях и в лесополосах в лесостепной зоне. Распространен на побережье Охотского моря, на Камчатке и на островах Тихого океана, в том числе и на южно-Курильских [3]. Введен в культуру *in vitro* в 1995

г. Каллус был получен на питательной среде 4X. Каллус плотный, зеленый с оттенками красного цвета, что указывает на возможное, присутствие антоцианов (рис. 16).

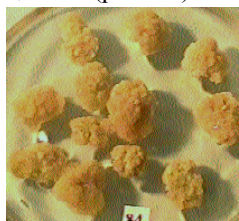


Рис. 15. Каллус *B. davurica*



Рис. 16. Каллус *B. ermani*

Betula kamtschatica (Regel) Jansson (*B. alba* L. var. *kamtschatica*). Дерево до 20 м высотой. Декоративное [3]. В культуре *in vitro* с 1995 г. сохраняется в виде каллуса на питательной среде 4X. Каллус плотный, зеленовато-коричневый (рис. 17).

Betula manshurica (Regel) Nakai – дерево до 20 м высотой, с белой корой. Распространен на Дальнем Востоке и Китае [3]. Введен в культуру *in vitro* в 1995 г. На питательной среде 4X был индуцирован каллус кремового цвета (рис. 18).



Рис. 17. Каллус *B. kamtschatica*



Рис. 18. Каллус *B. manshurica*

Betula microphylla Bunge – дерево 4-9 м высотой. Распространен в Западной Сибири и на Алтае. Введен в культуру *in vitro* в 1995 г. На питательной среде К был инициирован каллус светло-зеленого цвета (рис. 19).

Betula nana L. – приземистый кустарник, до 50 см высотой (рис. 20). Растет на торфяных болотах Севера [3]. В культуре *in vitro* с 1997 г. Каллус был индуцирован на питательной среде 4X.

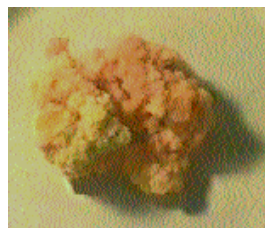


Рис. 19. Каллус *B. microphylla*



Рис. 20. Веточка *B. nana*

Betula obscura A.Kotula введён в культуру in vitro в 1995 г. На питательной среде 4X образовался каллус зеленого цвета (рис. 21).



Рис. 21. Каллус *B. obscura*

Betula papyrifera March. (*B. papyracea* Ait.) – дерево до 20 м высотой и до 1 м в диаметре [3]. Кора белая или розовая с очень длинными (до 20 см) чечевичками, расслаивающаяся на очень тонкие лоскутки (рис. 22). Распространен на востоке Северной Америки. Декоративное. В культуре in vitro с 1995 г. Каллус был индуцирован на питательной среде 4X. Каллус плотный, кремового цвета (рис. 23).



Рис. 22. Кора *B. papyrifera*

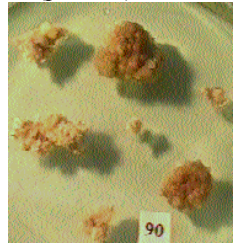


Рис. 23. Каллус *B. papyrifera*

Duschekia viridis Opiz – вид, образующий криволесье в Центральной и Западной Европе. В культуре кустарник вертикального роста, а в горах под непрерывным давлением снежного покрова приобретает стелющуюся форму, т.е. это не жизненная, а только механическая форма этого вида. Декоративное [5]. Введен в культуру in vitro в 1995 г. На питательной среде NB был индуцирован морфогенный каллус кремово-

желтого цвета (рис. 24). О питательных средах мы сообщали в наших предыдущих работах [6].

Авторы выражают благодарность своим коллегам: Н.И. Кравняк, Л.А. Лалакиной и Л.В. Юзефович за оказанную техническую помощь.

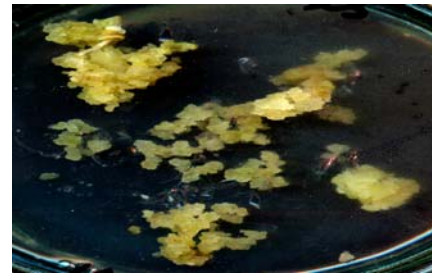


Рис. Каллус *D. viridis*

Выводы

1. Сравнив каллусы по окраске, по степени прироста биомассы, а также по временным промежуткам, необходимых для формирования первых зачатков каллуса и другим признакам, нами замечено, что они в какой-то степени сходны и эти признаки являются похожими у видов рода *Betula*, то есть прослеживается некая родоспецифичность. По перечисленным выше признакам, каллусы похожи у представителей разных родов, например, каллусы очень похожи у видов рода *Mahonia* и *Nandina*. Здесь речь может идти о признаках каллуса уже для семейства в целом. Однако, этот вопрос требует дальнейших исследований на более широком материале.

2. Что касается искусственной питательной среды, то наиболее универсальной следует считать питательную среду 4X. Из 22 видов, на питательной среде 4X у 16 видов образовался каллус и на этой же среде отмечена регенерация.

3. Сохранение ex situ – in vitro генетического и биологического разнообразия растений следует считать эффективным вспомогательным методом, наряду, с другими существующими в наше время методами.

1. Сікура Й.Й., Гамор Ф.Д., Маханець І.А., Пожило ва А.Й. Створення міжнародного генетичного банку флори Карпат ex situ (калусна культура, банк насіння, жива колекція рослин). // Міжнародні аспекти вивчення та охорони біорізноманіття Карпат (Матеріали міжнародної науково-практичної конференції, присвяченої 550 річчю м. Рахова, 25-27 вересня 1997 р.), Рахів-1997. – С. 186-187.
2. Borhidi Attila. A Zárwatermők rendszertana. A malekularis fologenetika szemszögéből. Pécsi Tudományegyetem Növényrendszertani és Geobotanikai Tanszéke. Pécs, 2007. – 158 p.

3. Качалов А.А. Деревья и кустарники. Изд-во Лесная промышленность, 1959. – 408 с.
4. Rehder Alfred. Manual of Cultivated trees and shrubs / Hardy in North America, 2 ed., New York, The Macmillan Company, 1949. – 996 p.
5. Сікура Й.Й. Переселення рослин природної флори Середньої Аїни на Україну (итоги інтродукції) Київ, Наук.ка, 1982. – 208 с.
6. Сікура Й.Й., В.Б. Белокурова., Е.Н. Шиша, Н.В. Кучук. Сохранение ex situ – in vitro

Отримано: 11 березня 2009 р.
Прийнято до друку: 12 травня 2009 р.