

БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ*Гуля Наталья Ивановна*

студентка

Маслова Елена Владимировна

канд. биол. наук, доцент

ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный
национальный исследовательский университет»

г. Белгород, Белгородская область

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОГО СПОСОБА СТЕРИЛИЗАЦИИ
РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСПЛАНТОВ РЕДКОГО ВИДА *ASTRAGALUS
DASYANTHUS PALL (FABACEAE)* ВО ФЛОРЕ БЕЛГОРОДСКОЙ
ОБЛАСТИ ДЛЯ ВВЕДЕНИЯ ЕГО В КУЛЬТУРУ *IN VITRO***

Аннотация: в статье исследовано влияние различных режимов стерилизации на получение стерильных эксплантов с целью введения в культуру *in vitro* редкого вида во флоре Белгородской области *Astragalus dasyanthus*. Авторами показано, что использование ступенчатой стерилизации с применением 0,1%-го раствора нитрата серебра с предварительной обработкой 5%-ным раствором биоцида и 70%-ным раствором спирта дает высокий процент стерильного жизнеспособного растительного материала.

Ключевые слова: биотехнология растений, клональное микроразмножение растений, культура *in vitro*, стерилизация растительных эксплантов, сохранение редких растений, *Astragalus dasyanthus Pall.*

Наиболее значимой задачей в области охраны природы является решение проблемы сохранения и восстановления биологического разнообразия редких и исчезающих видов растений. В качестве мер по сохранению биоразнообразия флоры используются методы *ex situ* и *in situ*. Метод *in situ* представляет собой восстановление популяций редких и исчезающих растений в природоохранных

зонах, в то время как метод *ex situ* – поддержание объектов биологического разнообразия вне естественных местообитаний с обязательным изъятием интересующего растительного объекта из экосистемы [1].

Восстановление биоразнообразия флоры в природоохранных зонах ограничивается лимитирующими факторами природной среды: низкой всхожестью и длительным периодом прорастания семян, нерегулярным плодоношением, уничтожением плодов растений животными. В связи с этим становится актуальным создание и усовершенствование инструментов *ex situ*.

Одним из таких инструментов может стать использование современных методов биотехнологии растений, а в частности метода клонального микроразмножения, основанного на культивировании изолированных органов и тканей растений в условиях *in vitro*. Данный метод вегетативного размножения имеет ряд преимуществ по сравнению с традиционными методами размножения редких и исчезающих растений в природных экосистемах: получение посадочного материала с однородным генотипом; оздоровление растений от патогенов грибковой, бактериальной и вирусной природы; высокий коэффициент размножения растений; возможность проведения работ в течение всего года [2, с. 2].

Метод микрклонального размножения растений основан на явлении тотипотентности – свойства клеток реализовывать генетическую информацию ядра, обеспечивающую их дифференцировку и развитие до целого организма. Таким образом, становится возможным регенерировать полноценное растение в стерильных условиях на питательных средах с последующей адаптацией к почвенному грунту [3, с. 1].

Выбор объекта исследования продиктован тем, что *Astragalus dasyanthus Pall* – многолетнее травянистое растение, которое широко используют в медицине. Все части растения содержат флавоноиды, полисахариды, гликозиды, соединения железа, кальция, алюминия, магния, стронция, молибдена, ванадия, марганца, натрия, кремния, фосфора, бария. Настой Астрагала шерстистоцветкового применяют при гипертонии и хронической сердечной недостаточности [4, с. 98].

A. dasyanthus является редким и исчезающим видом во флоре Белгородской области, имеет III категорию статуса редкости. *A. dasyanthus* относится к семейству Бобовых (Fabaceae) и представляет собой редкий Европейский степной вид, встречающийся по степным склонам и меловым обнажениям. На территории Белгородской области вид распространен в Губкинском и Красненском районах [5, с. 169].

В связи с широким медицинским применением и с целью восстановления природных популяций *A. dasyanthus* становится актуальной разработка технологии клонального микроразмножения данного вида. На сегодняшний день исследованы особенности каллусогенеза в культуре вегетативных органов *A. dasyanthus* in vitro на питательной среде Мурасиге-Скуга, содержащей 2,4-Д, 6-БАП и кинетин (Бугара И.А., 2008), но не подобраны эффективные режимы стерилизации, дающие максимальное количество неинфицированных жизнеспособных растительных эксплантов данного вида.

Целью данной работы является определение наиболее эффективного режима стерилизации растительных эксплантов исчезающего вида во флоре Белгородской области Астрагала шерстистоцветкового (*Astragalus dasyanthus* Pall) для введения его в культуру in vitro.

Исследования проводили на растительном материале, выращенном в Ботаническом саду Белгородского государственного национального исследовательского университета. В качестве эксплантов для введения в культуру in vitro были выбраны семена. На этапе введения в культуру *A. dasyanthus* отработывали различные приемы стерилизации. В ходе эксперимента был подобран оптимальный режим стерилизации семян.

Перед началом работы были отобраны здоровые, не имеющие повреждений семена. Семена очистили от излишних тканей, тщательно отмыли мылом, промыли несколько раз проточной и автоклавированной дистиллированной водой. Вся дальнейшая стерилизация проводилась в ламинарном боксе после его облучения ультрафиолетовой лампой в течение 1 часа и обработки рабочей поверхности 70%-ным спиртом.

В исследовании применялись три режима стерилизации: первый вариант стерилизации предполагал выдерживание семян *A. dasyanthus* в 5%-ном растворе биоцида в течение 5 минут, последующие выдерживание в 70%-ном растворе спирта в течение 1 минуты, стерилизация 3%-ным раствором лизоформина в течение 10 минут; второй вариант – выдерживание в 5%-ном растворе биоцида в течение 5 минут, последующие выдерживание в 70%-ном растворе спирта в течение 1 минуты, стерилизация 5%-ным раствором гипохлоритом натрия в течение 20 минут; третий вариант – в 5%-ном растворе биоцида в течение 5 минут, последующие выдерживание в 70%-ном растворе спирта в течение 1 минуты, стерилизация 0,1% раствором нитрата серебра в течение 15 минут.

После окончания времени стерилизации семена отмывали от растворов автоклавированной дистиллированной водой. Стерильные растительные объекты были введены в ламинарном боксе в культуру изолированных тканей на питательную среду MS и помещены в климатостат для проращивания при температуре 22–25°C, с фотопериодом 16 часов день, 8 часов ночь.

Результаты исследования представлены в таблице 1.

Таблица 1

Влияние различных режимов стерилизации
на получение стерильных эксплантов *A. dasyanthus*

Стерилизующий агент	Концентрация стерилизующего агента, %	Временная экспозиция, мин.	Количество стерильных эксплантов, %
Лизоформин	3	10	30,0 ± 2,4
Гипохлорид натрия	5	20	43,3 ± 9,6
Нитрат Серебра	0,1	15	86,6 ± 2,4

Установлено, что наиболее эффективным режимом стерилизации семян *A. dasyanthus* является применение 0,1% раствора нитрата серебра с предварительной обработкой 5%-ным раствором биоцида и 70%-ным раствором спирта. По разработанной схеме ступенчатой стерилизации получен достаточно высокий процент стерильного жизнеспособного материала (86,6 ± 2,4%).

Таким образом, в результате проведения экспериментов были подобраны наиболее эффективные режимы стерилизации для культивирования в условиях *in vitro* семян редкого вида во флоре Белгородской области *A.dasyanthus*.

Список литературы

1. Пронькина Г.А. Стратегия сохранения растений – путь к сохранению растительного мира / Г.А. Пронькина [Электронный ресурс]. – Режим доступа: www.inesa.ru
2. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: учебное пособие / Р.Г. Бутенко; ред. И.П. Ермаков. – М.: ФБК-Пресс, 1999. – 160 с.
3. Семенова В.А. Особенности размножения волчегонника Борового в культуре *in vitro*: Научная статья // Фундаментальные исследования / В.А. Семенова, К.А. Карпеченко, В.Н. Калаев, Л.А. Лепешкина, З.П. Муковнина, В.И. Серикова. – М.: Академия Естествознания, 2012. – 6 с.
4. Белоусов В.Н. Виды рода *Astragalus* L. и их роль в растительном покрове Предкавказья: диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / В.Н. Белоусов. – Ставрополь: Ставропольский государственный университет, 2005. – 174 с.
5. Пучков В.В. Красная книга Белгородской области. Редкие и исчезающие растения, грибы, лишайники и животные: официальное издание / В.В. Пучков, Е.Г. Глазунов, Л.Я. Дятченко, Е.Ф. Дубравный, А.Ф. Колчанов, В.П. Криушин, В.Е.Мазуров, В.С. Пашков, А.В. Присный, А.В. Турьянский, В.А. Хрисанов; ред. А.В. Присный. – Белгород, 2005. – 525 с.